

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Isabele Campos Costa-Amaral

Estudo da exposição ocupacional e ambiental ao benzeno em baixas concentrações sob a perspectiva dos efeitos genotóxicos

v. 1

Rio de Janeiro

2017

Isabele Campos Costa-Amaral

Estudo da exposição ocupacional e ambiental ao benzeno em baixas concentrações sob a perspectiva dos efeitos genotóxicos

v. 1

Trabalho de Conclusão de Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, do Departamento de(o) Toxicologia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora na Área de Ciências da Saúde e subárea de concentração Toxicologia.

Orientador(a): Ariane Leites Larentis

Coorientador(a): Paula de Novaes Sarcinelli
Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

Rio de Janeiro

2017

Ficha Catalográfica

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica

Biblioteca de Saúde Pública

Costa-Amaral, Isabele Campos.

Estudo da exposição ocupacional e ambiental ao benzeno em baixas concentrações sob a perspectiva dos efeitos genotóxicos / Isabele Campos Costa-Amaral — 2017.

nº.f. 148

Orientadores: Ariane Leites Larentis

Paula de Novaes Sarcinelli

Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2017.

1. Benzeno. 2. Exposição crônica. 3. Genotoxicidade. 4. DNA-formamidopirimidina glicosilase. 5. Saúde do Trabalhador. I. Título.

Isabele Campos Costa-Amaral

Estudo da exposição ocupacional e ambiental ao benzeno em baixas concentrações sob a perspectiva dos efeitos genotóxicos

Trabalho de Conclusão de Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, do Departamento de(o) Toxicologia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora na Área de Ciências da Saúde e subárea de concentração Toxicologia.

Dra. Jamila Alessandra Perini Machado, UEZO

Dra. Maria de Fátima Moreira, CESTE/ENSP

Dr. Sérgio Alves Rabello, CESTE/ENSP

Dra. Monica Stuck de Oliveira, IRD

Dra. Maria Juliana Moura Correa, Secretaria Municipal de POA

Dr. Herbert Ary Arzabe Antezama Costa Nóbrega Sisenando, UFF

Rio de Janeiro

2017

Ao meu querido companheiro Eros I. Amaral e ao meu querido filho Miguel C. Costa Amaral por todo amor, carinho, paciência, companheirismo e contribuição durante os importantes momentos da minha vida e na realização deste trabalho.

Aos meus queridos pais Sergio L. Costa e Vania Maria C. Costa (in memoriam) pelo amor incondicional e dedicação em toda minha vida.

Ao meu irmão pela amizade e parceria em toda minha trajetória.

Ao meu sobrinho e aos meus afilhados lindos pelos momentos de alegria e descontração.

Aos meus avós, primos, tios e amigos pelo apoio e incentivo em todos os momentos deste estudo.

Vocês sempre estarão presentes em meu coração!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida e oportunidade de concretizar este trabalho, o qual realizo com muito amor e dedicação.

Às minhas queridas orientadoras e amigas Dra. Ariane Leites Larentis, Paula de Novaes Sarcinelli e Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos, pela dedicação e ensinamento durante minha formação acadêmica.

Ao Professor Dr. Adriano Caldeira de Araújo (in memoriam) pela parceria, disponibilidade e pela contribuição na submissão de meu plano de trabalho de Doutorado Sanduíche na Universidade de Oslo-Noruega.

Ao Professor Dr. Andrew Richard Collins pela disponibilidade, dedicação e ensinamento durante a realização de meu Doutorado Sanduíche no Exterior em seu Laboratório na Universidade de Oslo-Noruega.

Aos trabalhadores que participaram deste estudo, pois sem a participação dos mesmos esta tese não teria se concretizado.

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 dos trabalhadores, além da sua agradável companhia nos dias de trabalho de campo.

Aos funcionários do Ambulatório que proporcionaram o acolhimento dos trabalhadores e possibilitaram a realização da avaliação clínica.

Ao amigo Mário, por todo trabalho e cuidado com nossas vidrarias.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia do CESTEH, em especial aos do Setor de Indicadores de Efeito e Solventes, Leandro, Vinício, Angélica, Daniel, Victor, Vinicius, Joyce, Eline e Renato, por toda ajuda e apoio na realização do nosso projeto de pesquisa.

Aos familiares e amigos de longa jornada, Mariana, Ronaldo, Adriana, Gilka, Adeilson, Maria, Severina, Clarissa, Davidson, Renata, Kivia, Ingrid, Wilma, Luciana, Sayonara, Priscilla, Ana Luíza, Mônica, Carlinha, Hayra, Thales, Jéssica, dentre outros, por estarem sempre ao meu lado acompanhando meu crescimento profissional e tornarem esta longa e difícil caminhada, divertida e prazerosa.

“Quando o espírito se apresenta para à cultura científica, nunca é jovem. Aliás, é bem velho, porque tem a idade de seus preconceitos. Aceder à ciência é rejuvenescer espiritualmente, é aceitar uma busca mutação que contradiz o passado.”

*Gaston Bachelard
(A formação do espírito científico)*

“O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, mas a ilusão do conhecimento.”

Stephen Hawking

RESUMO

As vulnerabilidades ambiental e ocupacional relacionadas ao benzeno presente na gasolina constituem uma grande preocupação das autoridades internacionais e nacionais, devido ao fato do benzeno ser comprovadamente cancerígeno para seres humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar a exposição crônica ocupacional e ambiental ao benzeno, sob a perspectiva dos efeitos genotóxicos, em trabalhadores de postos revendedores de combustíveis (PRC), localizados na Zona Oeste do Município do Rio de Janeiro, e em trabalhadores das Portarias da Fundação Oswaldo Cruz - RJ, respectivamente. Para tanto, foi realizado um estudo transversal por meio da avaliação dos dados sociodemográficos; da determinação do indicador de exposição ambiental benzeno no ar atmosférico e do biomarcadores de exposição de dose interna ácido *trans,trans*-mucônico (ATTM); dos biomarcadores de estresse oxidativo catalase (CAT), glutatona *S*-transferase (GST), superóxido desmutase (SOD), grupamento tiol (TIOL) e malondialdeído (MDA); e dos biomarcadores de genotoxicidade ensaio cometa (EC) com uso da enzima DNA-formamidopirimidina glicosilase (FPG) e aberrações cromossômicas (AC). Participaram do estudo 86 trabalhadores, sendo 51 oriundos dos PRC e 35 trabalhadores das Portarias, os quais foram categorizados em ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno, respectivamente. As avaliações ambientais identificaram concentrações de benzeno no ar atmosférico dentro dos valores permitidos pela legislação brasileira, sendo essa exposição caracterizada por uma maior oscilação de concentrações nos PRC, em decorrência do processo de trabalho. Entretanto, o ATTM não foi sensível a essa diferença, demonstrando que todos os dois grupos de trabalhadores apresentavam semelhança na exposição ao benzeno. Nenhuma diferença clínica foi encontrada entre os grupos avaliados, porém 15% ($n = 13$) dos trabalhadores apresentaram resultados de leucócitos menores que $4.500 \text{ células/mm}^3$, devendo ser monitorados. Os biomarcadores TIOL, MDA e AC apresentaram diferenças entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno a baixas concentrações, sendo observada uma maior frequência de AC no grupo de trabalhadores de PRC, caracterizando um maior risco de adoecimento em decorrência da exposição ocupacional. Uma regressão linear multivariada foi observada entre a concentração de ATTM e os biomarcadores AC ($R^2 = 0,187$, $\beta = 0,0001$, $p = 0,034$) e GST ($R^2 = 0,198$, $\beta = 0,017$, $p = 0,024$), em que 20% do aumento do número de Metáfases com AC e da atividade da GST podem ser explicados pelo aumento de ATTM. O EC com uso da enzima endonuclease FPG não se mostrou sensível na diferenciação dos grupos avaliados. Uma relação significativa entre a variável tempo de trabalho na atual ocupação e os biomarcadores EC, AC, GST e MDA foram relacionados com os efeitos genotóxicos e citotóxicos causados pela exposição ao benzeno. Apesar de ambas as populações serem expostas cronicamente ao benzeno, os trabalhadores dos PRC estão submetidos a momentos de alta exposição durante o exercício de suas atividades de trabalho, caracterizando um maior risco de adoecimento. Porém, isso não significa que os trabalhadores ambientalmente expostos ao benzeno não sejam também levados ao adoecimento pela exposição.

Palavras-chave: Benzeno, exposição ocupacional, exposição ambiental, estresse oxidativo, genotoxicidade, DNA-formamidopirimidina glicosilase.

ABSTRACT

Environmental and occupational vulnerabilities related to benzene present in gasoline are a major concern of international and national authorities, due to the fact that benzene is proven carcinogenic to humans. The objective of this study was to evaluate the chronic occupational and environmental exposure to benzene, from the perspective of genotoxic effects, in workers from filling station (PRC) in the West Zone of the Municipality of Rio de Janeiro and in workers from entrance and exit accesses of *Campus-Castelo Mourisco/ Fundação Oswaldo Cruz - RJ*, respectively. For that, sociodemographic data of the workers were evaluated; the concentration of benzene in atmospheric air and the biomarker of individual *trans,trans*-muconic acid (ATTM) were evaluated; the biomarkers of oxidative were measured by catalase (CAT), glutathione *S*-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), thiol grouping (TIOL) and malondialdehyde (MDA); biomarkers of genotoxicity were measured by comet assay (CA-FPG) using the enzyme formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) and chromosomal aberrations (CA). A total of 86 workers participated in the study, 51 were from the PRC and 35 were workers from entrance and exit accesses of *Campus-Castelo Mourisco/ Fiocruz*, which were categorized in occupationally and environmentally exposed to benzene, respectively. Environmental assessments identified benzene concentrations in atmospheric air within the limits allowed by Brazilian legislation and this exposure was characterized by a greater oscillation of concentrations in filling stations, because of the work process. However, ATTM was not sensitive to this difference, demonstrating that the two groups of workers had similar exposures of benzene. No clinical differences were found among the both groups evaluated, but 15% ($n = 13$) of the workers had leukocyte results lower than $4,500 \text{ cells} / \text{mm}^3$ and should be monitored. The biomarkers TIOL, MDA and AC showed differences between the occupationally and environmentally exposed groups of benzene at low concentrations, and a higher frequency of CA was observed in the group of PRC workers, characterizing a higher risk of illness due to occupational exposure. Multivariate linear regression was obtained between ATTM and the biomarkers CA ($R^2 = 0.187$, $\beta = 0.0001$, $p = 0.034$) and GST ($R^2 = 0.198$, $\beta = 0.017$, $p = 0.024$), so that 20% of the increase in the number of Metastases with CA and of the GST activity could be explained by the increase in ATTM. EC-FPG was not sensitive in the differentiation of the evaluated groups. Significant relationship between the working time in the current occupation and the biomarkers EC, AC, GST and MDA were related to the genotoxic and cytotoxic effects caused by benzene exposure. Although both populations were chronically exposed to benzene, filling station's workers are exposed to high exposure times during the exercise of their work activities, characterizing an increased risk of becoming ill. However, this does not mean that workers who are environmentally exposed to benzene are not also taken to disease by exposure.

Keywords: Benzene, occupational exposure, environmental exposure, oxidative stress, genotoxicity and formamidopyrimidine DNA glycosylase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Composição química do petróleo.	14
Figura 2 - Produtos derivados a partir do petróleo e suas características.	14
Figura 3 - Tipos de gasolina comercializadas no Brasil e suas composições.	16
Figura 4 - Linhagens Hematopoiéticas.	22
Figura 5 - Esquema das vias metabólicas do benzeno.	24
Figura 6 - Diferentes MoA de leucogênese induzida pelo benzeno, com seus principais eventos potenciais, fatores modificadores e efeitos toxicológicos.	26
Figura 7 - Representação esquemática da interação do sistema enzimático de defesa antioxidante.	29
Figura 8 - Reação em cadeia do processo de peroxidação lipídica.	30
Figura 9 - Áreas de Planejamento do Município do Rio de Janeiro.	40
Figura 10 - Município do Rio de Janeiro dividido por Área de Planejamento e suas respectivas Regiões Administrativas, estando detalhadas as áreas AP3 e AP5.	42
Figura 11 - Distribuição de postos revendedores de combustíveis.	43
Figura 12 - Diagrama da seleção da população ocupacionalmente exposta ao benzeno.	44
Figura 13 - Diagrama da seleção da população ambientalmente exposta ao benzeno.	46
Figura 14 - Esquema de diluição da enzima FPG a partir do seu extrato cru.	54
Figura 15 - Sistema de incubação da técnica de ensaio cometa com FPG para 12 géis por lâmina.	56
Figura 16 - Esquema metodológico do teste de EC utilizando enzima endonuclease FPG.	57
Figura 17 - Resultados do teste de EC para verificação da concentração ótima da enzima de restrição FPG.	71
Figura 18 - Gráfico de dispersão dos resultados dos biomarcadores ATTM, GST e Metáfases com AC.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes LEOs para 8 horas diárias de exposição de algumas instituições internacionais e nacional.	33
Tabela 2 - Frequência dos dados sociodemográficos dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.	60
Tabela 3 - Frequência das informações sobre doenças crônicas, histórico familiar de neoplasias, tabagismo e etilismo dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.	61
Tabela 4 - Descrição das médias de idade e tempo de trabalho na atual ocupação dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.	62
Tabela 5 - Média das concentrações de benzeno no ar atmosférico nos locais de trabalho dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos.	62
Tabela 6 - Concentrações de benzeno no ar atmosférico, em percentil, nos locais de trabalho dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos.	63
Tabela 7 - Média das concentrações de ATTM dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.	64
Tabela 8 - Concentrações de ATTM, por percentil, dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.	64
Tabela 9 - Média das concentrações de ATTM dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente exposto ao benzeno, de acordo com a categoria tabagismo.	65
Tabela 10 - Descrição dos resultados hematológicos da avaliação clínica dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.	66
Tabela 11 - Descrição dos resultados bioquímicos da avaliação clínica dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.	67
Tabela 12 - Resultado dos valores de leucócitos agrupados por faixas de concentração dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.	67
Tabela 13 - Resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.	68
Tabela 14 - Resultados do teste de AC dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.	70
Tabela 15 - Resultados de EC dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

Abs – absorvância

AC - Aberrações cromossômicas

ACGIH - *American Conference of Industrial Hygienists*

AhR - receptor aril hidrocarboneto

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Am - amostra

ANP - Agencia Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

AP - Área Programática

ASFOR - Fábrica de Asfalto de Fortaleza

ATTM - ácidos *trans*, *trans*-mucônico

Br – branco

BTEX - benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos

CAT - enzima catalase

CENPES - Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da Petrobras

CEP - Comitê de Ética e Pesquisa

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

Cl⁻ - íons cloreto

CNP - Conselho Nacional do Petróleo

CNPE - Conselho Nacional de Política Energética

CTE - chumbo tetraetila

CTM – chumbo tetrametila

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cr - Creatinina

CTH - células-tronco hematopoiéticas

CO - monóxido de carbono

CYP - enzima citocromo P 450

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNPM - Departamento Nacional de Produção Mineral

DTNB - ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)

EC - ensaio cometa

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico)

EIA - Estudo de Impacto Ambiental
EMS - etilmetanesulfonato
ER - espécies reativas
ERN - espécies reativas de nitrogênio
ERO - espécie reativa de oxigênio
EUA – Estados Unidos da América
FID - detector por ionização em chama
FPG - enzima DNA-formamidopirimidina glicosilase
g - grama
GGT - Gama glutamil transpeptidase
GPx - enzima glutaciona peroxidase
GR – enzima glutaciona redutase
GS-DNB - complexo (analito) formado da reação entre CDNB e GSH
GSH - glutaciona
GST - enzima glutaciona S-transferase
GSSG – glutaciona oxidada
GS-TNB - complexo (analito) formado da reação entre os grupamentos tiol e DTNB
H⁺ - íons de hidrogênio
HC - hidrocarbonetos
HClO - ácido hipocloroso
HNO₂ - ácido nitroso
HO• - radical hidroxila
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HPA - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC - High Performance/Pressure Liquid Chromatography
HSE - Health and Safety Executive
IAD - Índice Antidetonante
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBMP - Índices Biológicos Máximo Permitido
INEA - Instituto Estadual do Ambiente
km² - quilômetros quadrados
LEOs - Limites de Exposição Ocupacional
LI - Licença de Instalação

LMA - Leucemia Mieloide Aguda
LO - Licença de operação
LP - Licença Previa
LT - Limites de Tolerância
mA - miliampere
MA - Monitoramento Ambiental
MB - Monitoramento Biológico
mg - miligrama
L - litro
M - molar
MDA – malondialdeído
MDA-TBA - complexo (analito) formado da reação entre os grupamentos malondialdeído e ácido tiobarbitúrico
min - minuto
mL - mililitro
mM - milimolar
mmol/L - milimol por litro
MN - micronúcleo
MOA - modo de ação
mol/L - mol por litro
MGE - eletroforese em microgel
MMS - metilmetanesulfonato
MPO - enzima mieloperoxidase
NAD(P)H – coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaCl - cloreto de sódio
NaOH - hidróxido de sódio
NIOSH - *National Institute for Occupational Safety and Health*
NQO1- enzima NAD(P)H quinona oxidoreductase
nm – nanômetros
NO• - radical óxido nítrico
NO₂⁻ - ânion nitrito
NO₃⁻ - ânion nitrato
N₂O₃ - óxido nitroso
NO_x - óxidos de nitrogênio

NR - Norma Regulamentadora
 $O_2^{\bullet-}$ - radical ânion superóxido
 1O_2 - oxigênio singlete
OELV - *Occupational Exposure Limits Value*
OGG1 – enzima 8-oxoguanina glicosilase
OMS - Organização Mundial de Saúde
 $ONOO^-$ - ânion peroxinitrito
OPEP - Organização dos Países Produtores de Petróleo
OSHA - *Occupational Safety and Health Administration*
PA - Pró-Análise
pBQ - p-benzoquinona
pBQ-dA - 1, N^6 -benzeteno-2'-dA
pBQ-dC - 3, N^4 -benzeteno-2'-dC
pBQ-dG - 1, N^2 -benzeteno-2'-dG
PEL - *Permissible Exposure Limit*
pH - potencial hidrogeniônico
PHA - fitohemaglutinina
ppm - parte por milhão
PPRA - Programa de Prevenção de Riscos Ambientais
PROÁLCOOL - Programa Nacional do Alcool
PROCAP - Programa de Inovação Tecnológica e Desenvolvimento Avançado em Águas Profundas
PSF – Programa Saúde da Família
RA - Regiões Administrativas
REDUC - Refinarias de Duque de Caxias
REFAP – Refinaria Alberto Pasqualini
REGAP – Refinaria Gabriel Passos
RIMA - Relatório de Impacto Ambiental
RLAM – Refinaria Landulpho Alves
RNA - ácido ribonucleico
 RO^{\bullet} - radical alcoxila
 ROO^{\bullet} - radical peroxila
RPBC – Refinaria Presidente Bernardes
rpm - rotações por minuto

SCG - Single-Cell Gel
SCGE - Single-Cell Gel Eletrophoresis
SCOEL - Scientific Committee on Occupational Exposure Limits
SDS - dodecil sulfato de sódio
SGMB - Serviço Geológico e Mineralógico do Brasil
SPE - Solid phase extraction
SH - grupo sulfidril
SINPOSPETRO-RJ - Sindicato dos Empregados em Postos de Serviços de Combustíveis e Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro
S-MA - ácido S-fenilmercaptúrico
SMD - Síndromes Mielodisplásticas
SOD - enzima superóxido dismutase
SPC - separação prematura centromérica
TBA - ácido tiobarbitúrico
TEMADRE – Terminal Marítimo de Madre de Deus
TGP - transaminase glutâmica pirúvica
TGO - transaminase glutâmica oxalacética
TLV - Threshold Limit Values
Tris-Cl - Tris (hidroximetil) aminometano – cloreto
U/L - unidades por litro
U - unidade internacional de atividade enzimática
UV-Vis - ultra-violeta e visível
V - Volts
V/cm - Volts por centímetro
VRT - Valor de Referência Tecnológico
WEL - *Workplace Exposure Limits*
 Δ Abs/min - variação de absorvância por minuto
°C - graus Celsius
 ϵ - coeficiente de absorvidade molar (em $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
% - percentual
 μL - microlitro
 μM - micromolar
 $\mu\text{mol}/\text{min}$ - micromol por minuto
8OHdA - 5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina

8OHdG - 5'- 8-ciclo-2'-desoxiguanosina

8-oxoG - 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosídeo

8-oxoA - 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiadenosídeo

pBQ-dC - 3,N4-benzeteno-2'-dC

pBQ-dA - 1,N6-benzeteno-2'-dA

pBQ-dG - 1,N2-benzeteno-2'-dG

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUÇÃO	13
I.1. Vulnerabilidade ambiental e ocupacional relacionada aos postos revendedores de combustíveis (PRC)	17
I.2. Legislação brasileira sobre PRC e Saúde do Trabalhador	19
I.3. Efeitos do Benzeno à Saúde Humana	21
I.3.1. Toxicocinética e Toxicodinâmica do benzeno	23
I.3.2. Interação entre Estresse oxidativo e danos no DNA	27
I.4. Avaliação toxicológica por biomarcadores	31
II. OBJETIVO	39
Objetivo Geral	39
Objetivos Específicos	39
III. METODOLOGIA	40
III.1. Caracterização das áreas de estudo	40
III.2. População ocupacionalmente exposta ao benzeno	43
III.3. População ambientalmente exposta ao benzeno	45
III.4. Avaliação sociodemográfica e do processo de trabalho	46
III.5. Avaliação ambiental	47
III.5.1. Indicador de exposição ambiental	47
<u>Quantificação do Benzeno no ar atmosférico</u>	47
III.6. Avaliação clínica	48
III.7. Avaliação dos biomarcadores	48
III.7.1. Biomarcador de exposição	48
<u>Determinação do Ácido <i>trans, trans</i>-mucônico (ATTM)</u>	48
III.7.2. Biomarcadores de efeito	49
III.7.2.1. Biomarcadores do estresse oxidativo	49
<u>Atividade enzimática da Catalase (CAT)</u>	50
<u>Atividade enzimática da Glutathione S-transferase (GST)</u>	50
<u>Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)</u>	51
<u>Grupamento Tiol (TIOL)</u>	52
<u>Malondialdeído (MDA)</u>	52
III.7.2.2. Biomarcadores de genotoxicidade	53
<u>Ensaio Cometa (EC)</u>	53
<u>Aberrações cromossômicas (AC)</u>	58
III.8. Análise estatística	58
III.9. Aspectos éticos	59
IV. RESULTADOS	60

V. DISCUSSÃO	74
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO I - <u>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)</u>	102
ANEXO II - <u>Questionário Individual</u>	106
ANEXO III - <u>Questionário de Avaliação do Ambiente de Trabalho de PRC</u>	119
ANEXO IV - <u>Questionário Clínico</u>	128

I. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da civilização humana está diretamente relacionado com a apropriação do conhecimento e das diferentes matrizes energéticas existentes, pelo homem. O setor energético é um dos principais interesses de Estado, estando relacionado com o funcionamento do parque industrial econômico, o sistema de transportes de cargas e passageiros, assim como, com as disputas de domínios geopolíticos (IBP, 2004).

O uso dos combustíveis fósseis como fonte de energia em larga escala teve início na I Revolução Industrial ocorrida na Inglaterra no final do século XVIII, com o uso carvão mineral como o primeiro combustível fóssil utilizado para a produção de vapor nas máquinas de Watt, por combustão direta. Assim, a I Revolução Industrial ficou caracterizada pelo desenvolvimento científico com o uso do carvão como fonte de energia e o desenvolvimento de máquina à vapor e locomotiva, como as primeiras invenções que modernizaram os setores produtivos e de transporte, dinamizando a distribuição de matéria-prima, pessoas e mercadorias, propiciando um novo panorama para o surgimento do sistema capitalista (FARIAS, 2011).

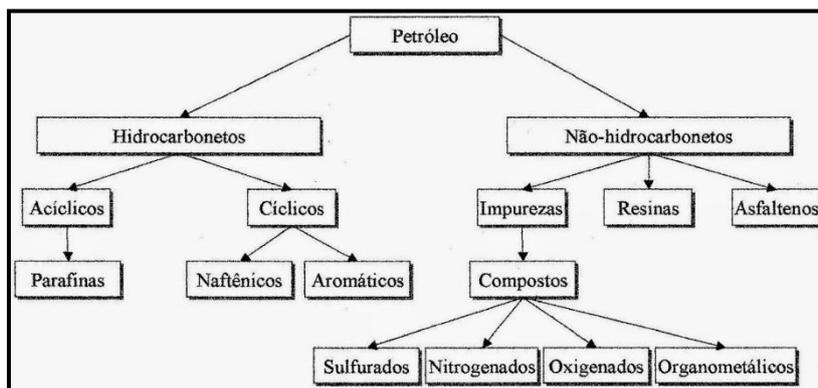
O carvão mineral foi a principal fonte de energia mundial até o período entre final do século XIX e meados do século XX, quando o mundo vivenciou uma série de avanços tecnológicos e medicinais que impulsionaram a II Revolução Industrial, caracterizada pelo uso do petróleo, do motor a combustão, da utilização do aço e do surgimento de grandes indústrias como as usinas hidrelétricas, siderúrgicas, metalúrgicas, petroquímicas, automobilísticas, transporte ferroviário e naval (FARIAS, 2011; BARROS, 2007).

O petróleo em seu estado natural é um combustível fóssil composto por uma mistura de hidrocarbonetos e, em menor proporção, por derivados oxigenados, nitrogenados e sulfurados (Figura 1). Esses componentes podem variar em quantidade, podendo o petróleo ser classificado de acordo com os teores de seus constituintes, como por exemplo, parafínico, naftênico, aromático, parafínico-naftênico, aromático-naftênico e aromático-asfáltico (GeoPG, 2014).

Em sua forma bruta, o petróleo possui pouquíssimas aplicações, sendo necessário passar pelo processo de refinamento para a obtenção de seus diversos derivados, como gás liquefeito, naftas, óleo diesel, querosenes, óleos combustíveis, asfaltos, lubrificantes, solventes, parafinas, coque de petróleo, resíduos e, dentre os mais

cobiçados, a gasolina (Figura 2) (FARIAS, 2011; BARROS, 2007). O refino de petróleo constitui-se de uma série de processos de natureza física ou química, cujo objetivo é a obtenção da maior quantidade de derivados com alto valor comercial, máxima qualidade e ao menor custo operacional possível.

Figura 1 - Composição química do petróleo.



Fonte:GeoPG (2014).

Figura 2 - Produtos derivados a partir do petróleo e suas características.

Produtos	Número de átomos de carbono	Ponto de ebulição (°C)	Uso
Gás	C ₁ , C ₂	<20	Usados como combustíveis para aquecimento; matéria-prima para fabricação de borracha, fabricação de plástico e na síntese de compostos orgânicos;
GLP (Gás liquefeito de petróleo)	C ₃ , C ₄	<35	
Éter de petróleo	C ₅ , C ₆	20-60	Usados como solventes orgânicos e na fabricação de tintas e anilina;
Ligroina ou Nafta	C ₆ , C ₇	60-100	
Benzina	C ₅ a C ₇	90-105	Fração mais importante, utilizada como combustível em motores a explosão;
Gasolina	C ₅ a C ₁₀	35-140	
Querosene	C ₁₂ a C ₁₈	150-250	Usado como combustível para iluminação ou em aviões a jato, o que é mais comum; submetido ao craqueamento, transforma-se em gasolina;
Óleo diesel	C ₁₂ ...	250-360	Usado em motores a diesel;
Óleo lubrificante	C ₂₀ a C ₃₄	Líquido não volátil	Utilizada na lubrificação de máquinas;
Resíduo: parafina, vaselina, piche, asfalto.	-	Sólidos não voláteis	Conforme o tipo do petróleo pode ser: base asfáltica → asfalto (resíduo) base parafínica → parafina (resíduo)

Fonte: GeoPG (2014).

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 (MME, 2014). O óleo diesel, constituído por hidrocarbonetos e baixa quantidade de enxofre, nitrogênio e oxigênio, possui como característica principal o número de cetanos. Quanto maior o número de cetanos, menor será o retardo de ignição e, por conseguinte, melhor será capacidade do óleo diesel incendiar-se. As emissões de particulados características dos motores a diesel são compostas por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que estão relacionados a precursores de câncer em seres humanos, sendo um problema de saúde pública (TSITOU et al., 2015).

A gasolina automotiva¹, por sua vez, corresponde a frações líquidas leves do petróleo, contendo uma mistura complexa de aproximadamente 150 a 200 hidrocarbonetos, os quais variam de quatro a doze átomos de carbono e pontos de ebulição entre 30 e 225°C. A gasolina pode conter aditivos que conferem características específicas importantes para desempenho satisfatório dos motores. Esses aditivos podem ser dos tipos antioxidante, antidetonante, detergente, anticongelante, desativador de metal, corante, entre outros e complementam o processamento da gasolina nas refinarias, permitindo a obtenção de maior nível de desempenho do produto (MAGNANELLI, 2012; MENDES et al., 2017). Existem duas classificações de gasolina automotiva comercializadas no Brasil: A² (Premium e Podium, dependendo do fabricante) e C³ (gasolina comum e aditivada), todas com misturas de diferentes tipos de hidrocarbonetos (Figura 3). A partir dessas duas especificações, as distribuidoras podem ofertar gasolinas comerciais que atendam ou superem os parâmetros da categoria em que estão enquadradas. A gasolina aditivada possui adição de detergentes e dispersantes à sua composição, que promovem limpeza do sistema de alimentação do veículo, incluindo bicos injetores e válvulas de admissão, enquanto que a gasolina comum não

¹ Gasolina automotiva compreende a(s) gasolina(s) especificada(s) pela ANP (gasolinas tipos A, Premium e todas as demais), exceto a gasolina de aviação e a gasolina para uso em competição automotiva (Portaria ANP nº 72, de 2000).

² Gasolina A é a gasolina produzida no País, sendo importada ou formulada pelos agentes econômicos autorizados para cada caso, isenta de componentes oxigenados e que atenda ao Regulamento Técnico (Resolução ANP nº 40, de 25/10/2013).

³ Gasolina C é constituída de gasolina A e etanol anidro combustível, nas proporções e especificações definidas pela legislação em vigor e que atenda ao Regulamento Técnico (Resolução ANP nº 40, de 28/10/2013).

possui esses detergentes especiais. As gasolinas Premium ou Podium de alto Índice Antidetonante (IAD), além de conterem os detergentes que a gasolina aditivada, possuem também uma maior octanagem, permitindo melhor aproveitamento do potencial do motor (ANP, 2000; ANP 2013).

Figura 3 - Tipos de gasolina comercializadas no Brasil e suas composições.

COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÃO SOBRE INGREDIENTES		COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÃO SOBRE INGREDIENTES	
PREPARO		PREPARO	
Natureza química:	Hidrocarbonetos e álcool.	Natureza química:	Hidrocarbonetos e álcool.
Sinônimos:	Gasolina C aditivada.	Sinônimos:	Gasolina C aditivada.
Ingredientes ou impurezas que constituem perigo:	Hidrocarbonetos saturados: 27-47% (p/p) Hidrocarbonetos olefínicos: 15-28% Hidrocarbonetos aromáticos: 26-35% Álcool etílico anidrido combustivel (CAS 64-17-5): 13-25% (p/p) Benzeno (CAS 71-43-2): <1% (p/p); Aditivos: máx. 0,5%	Ingredientes ou impurezas que constituem perigo:	Hidrocarbonetos saturados: 27-47% (p/p) Hidrocarbonetos olefínicos: 15-28% Hidrocarbonetos aromáticos: 26-35% Álcool etílico anidrido combustivel (CAS 64-17-5): 13-25% (p/p) Benzeno (CAS 71-43-2): <1% (p/p); Aditivos: máx. 0,5%
			
PREPARO		PREPARO	
Natureza química:	Hidrocarbonetos e álcool.	Natureza química:	Hidrocarbonetos e álcool.
Sinônimos:	Gasolina Premium.	Sinônimos:	Gasolina A Premium aditivada
Ingredientes ou impurezas que constituem perigo:	Hidrocarbonetos saturados: 20-53% (p/p) Hidrocarbonetos olefínicos: 19-32% Hidrocarbonetos aromáticos: 28-48% Benzeno (CAS 71-43-2): <2% (p/p);	Ingredientes ou impurezas que constituem perigo:	Hidrocarbonetos saturados: 20-53% (p/p) Hidrocarbonetos olefínicos: 19-32% Hidrocarbonetos aromáticos: 28-48% Benzeno (CAS 71-43-2): <1% (p/p); Aditivos: máx. 0,5%
			

Fonte: MAGNANELLI, 2012.

Os hidrocarbonetos presentes na gasolina podem ser classificados em parafínicos (n-hexano, pentanos), olefínicos (hepteno), naftênicos (ciclohexano, metilciclohexano) e aromáticos (benzeno, tolueno, xileno e 1,2,4-trimetilbenzeno), cujas proporções relativas dependem dos petróleos e dos processos de produção utilizados. Atualmente, os vários tipos de gasolina, após passarem pelos processos de refino, saem das refinarias constituídas de misturas criteriosamente balanceadas desses hidrocarbonetos, visando atender aos requisitos de desempenho nos motores (ANP, 2013; MAGNANELLI, 2012).

Os hidrocarbonetos aromáticos se destacam dentre os principais componentes dos combustíveis fósseis, pois possuem grande estabilidade em suas ligações químicas além de serem potencialmente carcinogênicos. Entre esses hidrocarbonetos aromáticos mais leves estão benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos (BTEX), os quais agem como poderosos depressores do sistema nervoso central e apresentam toxicidade crônica, mesmo em pequenas concentrações da ordem de partes por bilhão (ppb) (TSITOU et al., 2015).

Cabe ressaltar, que além das emissões relacionadas à queima dos combustíveis fósseis estarem historicamente associada à poluição atmosférica, as instalações dos sistemas de armazenamento subterrâneos de combustíveis também configuram situações capazes de gerar contaminações ambientais, urbanas e ocupacionais. Essas contaminações ocorrem em função de possíveis vazamentos nos tanques de armazenamento ou tubulações, assim como derramamentos produzidos por acidentes no transporte e manuseio destes produtos, e geram uma grande preocupação das autoridades responsáveis (OSTERREICHER-CUNHA et al., 2004; OKUMURA & STRADIOTTO, 2007; TUNSARINGKARN et al., 2012).

I.1. Vulnerabilidade ambiental e ocupacional relacionada aos postos revendedores de combustíveis (PRC)

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, aos riscos relacionados à saúde humana decorrentes da exposição aos solventes presentes nos combustíveis, em especial, ao benzeno. (OSTERREICHER-CUNHA et al., 2004; OKUMURA & STRADIOTTO, 2007; TUNSARINGKARN et al., 2012).

A vulnerabilidade ambiental de solo e águas subterrâneas está relacionada a falhas estruturais e operacionais, como por exemplo, vazamentos devido à corrosão de tubulações e tanques subterrâneos, a ausência de pavimentação nos mesmos, ao abastecimento de veículos e ao descarregamento dos caminhões-tanque nos PRC (INEA, 2013). Os registros de áreas ambientais contaminadas revelam que PRC são um dos principais causadores de contaminação no país, o que justifica a preocupação das autoridades nacionais e da sociedade em geral. De acordo com a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2011), ligada à Secretaria do Meio Ambiente do governo de São Paulo, foram registrados 4.131 cadastros de áreas contaminadas somente no Estado de São Paulo, em 2011, sendo 3.217 (78%) desses registros relacionados a contaminações oriundas de PRC, seguidos das atividades industriais (14%), comerciais (4%), instalações para destinação de resíduos (3%) e casos de acidente, agricultura e fonte de contaminação de origem desconhecida (1%). No Estado do Rio de Janeiro, o Instituto Estadual do Ambiente (INEA) noticiou, em

2013, o monitoramento de 160 áreas contaminadas por indústrias e PRC (INEA, 2013b). Entretanto, esse problema ainda não é tratado de maneira sistematizada pelas autoridades e a situação é ainda mais preocupante quando essa contaminação está relacionada aos efeitos à saúde humana, decorrentes da exposição crônica aos solventes constituintes da gasolina (GOUVEIA et al., 2007). Nos outros diversos estados do Brasil, são escassos, ou até mesmo nenhum, os estudos relacionados às áreas contaminadas por combustíveis.

Como já mencionado, a gasolina é uma mistura complexa contendo cerca de 150 a 200 hidrocarbonetos entre C5 a C12, estando dentre eles o benzeno, composto de grande relevância toxicológica devido às suas propriedades carcinogênicas. Mesmo o benzeno estando em concentrações menores que 1% na gasolina e em outros produtos acabados, 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 (IARC, 1982; WHO, 2000; WHO, 1993; ANP, 2001; ACGIH, 2003; TUNSARINGKARN et al., 2012).

Dados da década de 90 estimaram que, mundialmente, cerca de dois milhões de trabalhadores foram expostos ocupacionalmente ao benzeno por ano e que 95% desses trabalhadores estavam expostos a níveis inferiores ou igual a 1 ppm, Valor de Referência Tecnológico (VRT) estabelecido pela NR 15 (Anexo 13-A) (COSTA & COSTA, 2002; COUTRIM, 2000). No Brasil, de acordo com Moura-Correa et al. (2014), a exposição ocupacional ao benzeno relacionada a PRC atinge 184.733 frentistas distribuídos em 39.450 PRC em todo o país. Com o objetivo de assegurar uma melhoria na qualidade de vida desses trabalhadores, estratégias para reduzir o nível de exposição ao benzeno têm sido realizadas, como, por exemplo, a melhoria de tecnologia dos meios de produção, a pressão das políticas de vigilância à saúde ocupacional, a tendência mundial de substituição do benzeno como solvente nos processos industriais e o avanço tecnológico para a sua quantificação em concentrações muito baixas no ar (COUTRIM et al., 2000). Apesar desses esforços de regulação das emissões do benzeno, um vasto número de trabalhadores continua sendo exposto em diversas situações precárias de trabalho, especialmente nos ambientes de PRC (MACHADO et al., 2003).

A população em geral também se expõe ambientalmente devido à volatilização dos solventes presentes na gasolina oriunda tanto dos PRC, durante o abastecimento de tanques e veículos, quanto das emissões veiculares, o que por sua vez, gera uma difusão universal. Essas emissões são fontes representativas, principalmente, se considerarmos a população residente nas adjacências de determinadas indústrias e PRC (CARRIERI et al., 2006). Entretanto, o volume de estudos contemplando a exposição de populações brasileiras, tanto ambientalmente quanto ocupacionalmente, ainda é, lamentavelmente, incipiente frente à real situação do risco (VALENTE et al., 2017).

I.2. Legislação brasileira sobre PRC e Saúde do Trabalhador

As atividades relacionadas aos PRC envolvem diferentes processos de trabalho, como abastecimento, troca de óleo, lavagem de veículo, recebimento de caminhão-tanque, análise de amostras-controle da gasolina, revenda de mercadorias, entre outras, para as quais são necessárias medidas de gestão ambiental e ocupacional, no intuito de se evitar a ocorrência de impactos ao meio ambiente e a saúde do trabalhador, respectivamente.

De acordo com a atual vigência do Decreto nº 6.514 de 2008, que regulamenta a Lei Federal 9.605/98, a contaminação ambiental é considerada um crime ambiental federal e sobre suas infrações deve-se estabelecer processo administrativo federal. A legislação brasileira exige para o exercício da função dos PRC o licenciamento por órgão ambiental estadual competente ou do IBAMA em caráter supletivo, por meio de um Estudo de Impacto Ambiental (EIA) e um Relatório de Impacto Ambiental (RIMA) detalhado. Após a realização do EIA/RIMA, o estabelecimento poderá iniciar os processos de obtenção da Licença Prévia (LP), da Licença de Instalação (LI), e da Licença de operação (LO), que são obrigatórias para seu funcionamento (CONAMA N° 001/86).

Segundo a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 319, de 2002, os equipamentos e sistemas destinados ao armazenamento e a distribuição de combustíveis, assim como de montagem e instalação, devem ser avaliados quanto à sua conformidade no âmbito do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade com periodicidade não superior a cinco anos. Além disso, a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (NBR 13.786:2014) estabelece que um PRC deve instalar no mínimo 3 poços de monitoramento em lugares estratégicos, com a finalidade de se verificar a

existência de contaminantes em fase livre ou dissolvida na água subterrânea, independentemente da profundidade do lençol freático.

As atividades que envolvem a exposição dos trabalhadores aos riscos relacionados à saúde humana decorrentes da exposição aos solventes presentes nos combustíveis, em especial ao benzeno presente na gasolina, constituem-se como uma grande preocupação para o campo da Saúde do Trabalhador. Além das atividades relacionadas ao armazenamento e manuseio de inflamáveis líquidos serem classificadas como perigosas (NR-16), a exposição crônica ao benzeno possui grande relevância toxicológica, sendo preconizado o monitoramento ambiental e biológico. Dessa forma, a Instrução Normativa de N° 1 de 1995, considerando a obrigatoriedade da realização do Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA), estabelece, no anexo sobre "Avaliação das Concentrações de Benzeno em Ambientes de Trabalho", a caracterização completa de um determinado ambiente ou da exposição ocupacional de trabalhadores, por meio de um processo periódico e sistemático da avaliação da concentração de benzeno no ar do ambiente de trabalho.

Complementarmente, a Portaria N° 34 de 2001 estabelece o "Protocolo para a Utilização de Indicador Biológico da Exposição Ocupacional ao Benzeno" por meio da determinação do ácido *trans, trans*-mucônico (ATTM) na urina coletada no final da jornada de trabalho e a partir do terceiro dia consecutivo de exposição. Além disso, a Portaria N° 776 de 2004 dispõe sobre a regulamentação dos procedimentos relacionados à vigilância da saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno, estabelecendo as diretrizes do diagnóstico da intoxicação ocupacional ao benzeno, por meio do protocolo de investigação de danos relacionados à exposição ao benzeno. Esse protocolo preconiza juntamente com exame físico, procedimentos e informações da história clínica atual e pregressa de exposição à mielotóxicos; da história ocupacional atual; levantamento de dados hematológicos e exames complementares para conclusão diagnóstica (MENDES, et al. 2017).

É importante ressaltar, que as normas referentes à exposição ocupacional ao benzeno citadas anteriormente foram estabelecidas para atividades industriais, não incluindo até então as atividades de armazenamento, transporte, distribuição, venda e uso de combustíveis derivados do petróleo realizados por PRC. Recentemente, foi publicada a Portaria N° 1.109, de 21 de setembro de 2016, que 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, estabelecendo, assim, os requisitos mínimos de segurança e saúde no trabalho para as atividades com exposição ocupacional ao benzeno em PRC. Esses complementam as exigências e orientações já previstas na legislação de Segurança e Saúde no Trabalho em vigor no Brasil.

I.3. Efeitos do Benzeno à Saúde Humana

O benzenismo corresponde ao conjunto de sinais e sintomas decorrentes da exposição ao benzeno. O diagnóstico de benzenismo, de natureza ocupacional, é eminentemente clínico e epidemiológico, se fundamentando na história de exposição ocupacional e na observação de sintomas e sinais clínicos e laboratoriais (BRASIL, 2006; BRASIL, 2004).

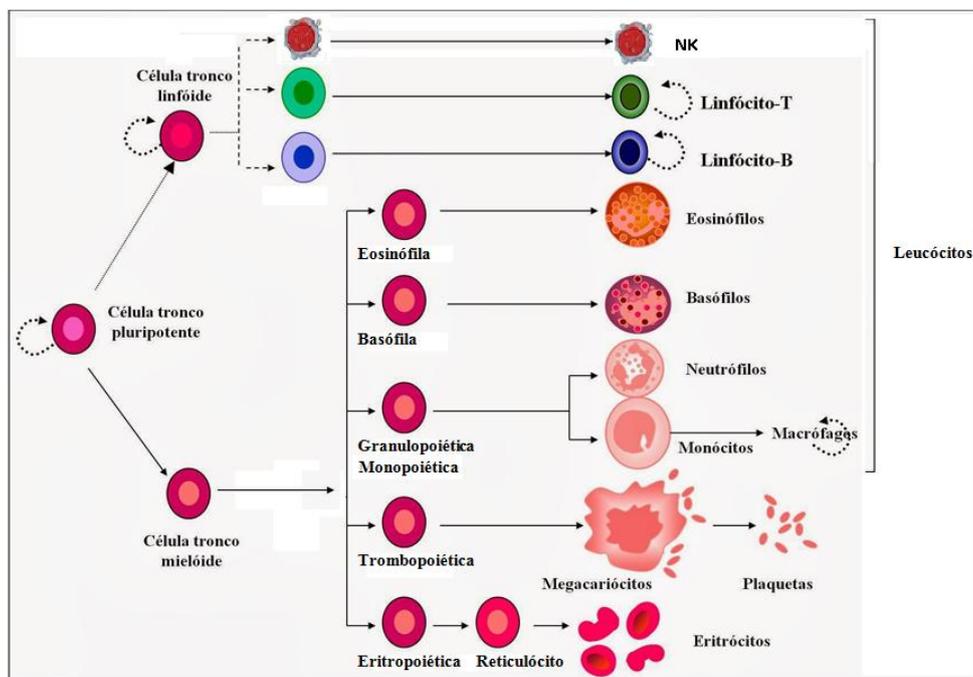
Para a avaliação dos potenciais efeitos toxicológicos à saúde humana das diversas substâncias químicas, incluindo o benzeno, deve-se levar em consideração fatores relacionados ao composto (características físico-químicas), à exposição (dose e frequência) e ao indivíduo (suscetibilidade individual). Com isso, as complicações observadas decorrentes das exposições agudas ou crônicas são diferentes. Considerando a exposição aguda, o benzeno provoca efeitos tóxicos no sistema nervoso central, causando de acordo com a quantidade absorvida, narcose e excitação, seguida de sonolência, tonturas, cefaleia, náuseas, taquicardia, dificuldade respiratória, tremores, convulsões, perda da consciência e morte. Além disso, o benzeno é um irritante moderado de mucosas oculares e respiratórias, podendo causar edema pulmonar quando aspirado em altas concentrações. Contudo, é na exposição crônica que são observados os maiores agravos à saúde humana, com vários tipos de lesões no tecido da medula óssea que, conseqüentemente, acarretam as subseqüentes alterações do sistema hematopoiético (AUGUSTO & NOVAES, 1999; TUNSARINGKARN et al., 2012).

O sistema hematopoiético medular é formado por células-tronco hematopoiéticas (CTH), as quais possuem a capacidade de se autorrenovar e se diferenciar em células especializadas do tecido sanguíneo e células do sistema imune, por meio da geração de progenitores multipotentes, que originam os progenitores comuns das linhagens mieloide e linfoide. As células da linhagem mieloide correspondem aos eritrócitos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos,

e as da linhagem linfóide são os linfócitos B e T e células NK (Figura 4) (SILVA JÚNIOR et al., 2009).

As principais lesões no sistema hematopoiético em decorrência da exposição ao benzeno são as displasias, como hipoplasia e aplasia. A hipoplasia de medula óssea corresponde à diminuição da atividade de formação do tecido hematológico e pode ocasionar, no sangue periférico, citopenia(s), como leucopenia, neutropenia, plaquetopenia, sendo a neutropenia a principal repercussão hematológica da hipoplasia secundária. A aplasia da medula óssea, que corresponde à depressão de todas as linhagens hematológicas, se expressa no sangue periférico por meio de pancitopenia (leucopenia, plaquetopenia e anemia). Além disso, o caráter leucemogênico do benzeno é amplamente reconhecido, sendo a Síndromes Mielodisplásticas (SMD) e a Leucemia Mielóide Aguda (LMA) as mais frequentes. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que o risco de desenvolver leucemia seja de 6 casos por milhão entre pessoas que tenham sido expostas ao longo da vida a concentrações de 1 mg/m^3 . Além de leucemogênica, a toxicidade por benzeno está também relacionada ao surgimento de outras formas de doenças onco-hematológicas, como Linfoma não- Hodgkin, Mieloma Múltiplo e Mielofibrose, embora em menor frequência (VLAANDEREN et al., 2011).

Figura 4 - Linhagens Hematopoiéticas.



Fonte: Adaptado THEML et al., 2004.

Além disso, a exposição ao benzeno também pode causar alterações neuropsicológicas e neurológicas, sendo observadas alterações de atenção, percepção, memória, habilidade motora, viso-espacial, viso-construtivo, função executiva, raciocínio lógico, linguagem, aprendizagem e humor. Disfunções cognitivas como astenia, cefaleia, depressões, insônia, agitação e alterações de comportamento também são relatadas e, no sistema auditivo, podem ser observadas perdas auditivas neurossensoriais, zumbidos, vertigens e dificuldades no processamento auditivo (VYSKOCIL et al., 2012; BRASIL, 2006; AUGUSTO et al., 1999).

I.3.1. Toxicocinética e Toxicodinâmica do benzeno

Os estudos de toxicocinética e toxicodinâmica são importantes para o entendimento da relação entre a exposição, a mensuração das concentrações do benzeno e/ou seus metabólitos na corrente sanguínea e seus efeitos à saúde humana (ARNOLD et al., 2013). O benzeno é um hidrocarboneto aromático, de odor característico, líquido, volátil, incolor, altamente inflamável, explosivo, lipossolúvel e seu vapor é mais denso que o ar (ARNOLD et al., 2013).

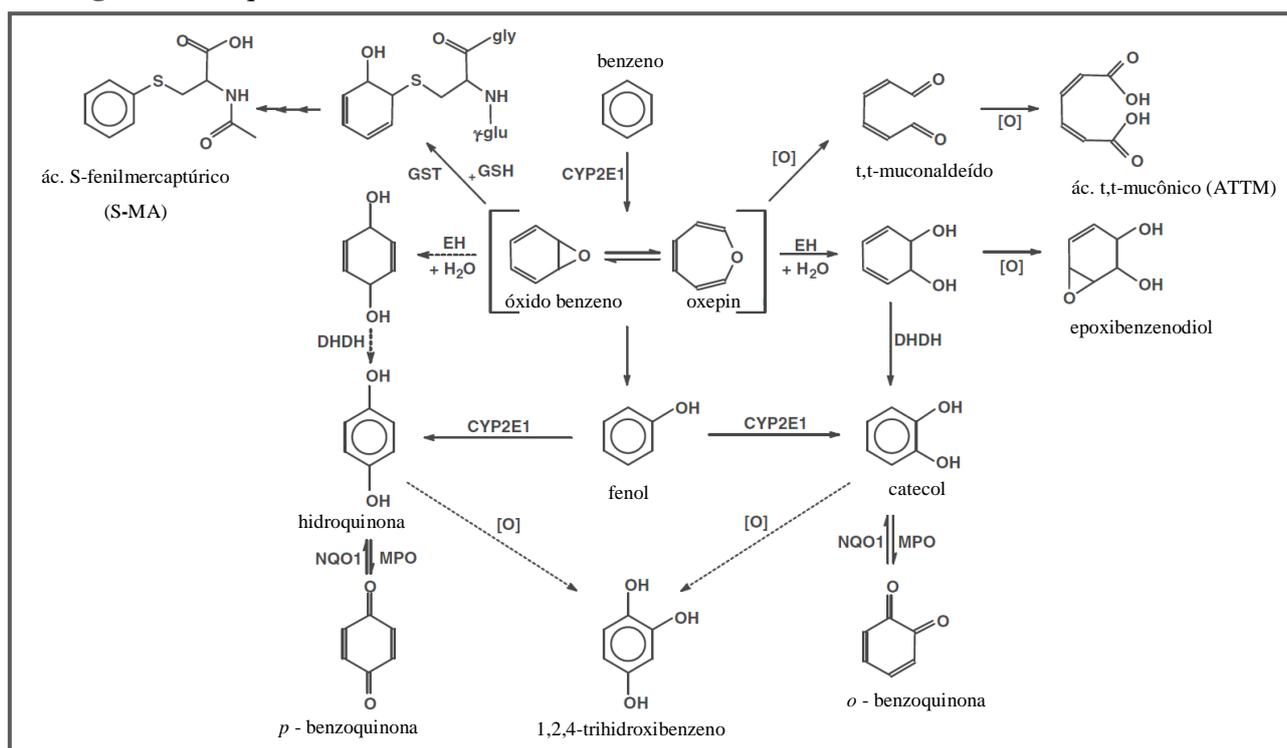
A principal via de absorção do benzeno é o trato respiratório, podendo também ser absorvido por via oral e cutânea, em especial quando estiver na forma líquida. A maior quantidade do benzeno inalado é absorvida rapidamente, com aproximadamente 70% ou mais, durante os primeiros minutos de exposição. Entretanto, após 1 hora, a absorção do benzeno é reduzida, juntamente com o declínio do gradiente de concentração entre o benzeno no ar e no sangue. Uma parte do benzeno absorvido é eliminada pela expiração ou pela urina, antes de ser metabolizado, e a parte remanescente se distribui em tecidos com alto teor lipídico, principalmente, cérebro, rim, tecido adiposo, fígado, placenta, dentre outros tecidos (WHO, 1993a; ARNOLD et al., 2013). A metabolização do benzeno distribuído pelo organismo ocorre primeiramente no fígado e a excreção de seus metabólitos ocorre pela urina. Estudos evidenciam que os metabólitos do benzeno são hematotóxicos (WHO, 1993a; ARNOLD et al., 2013). O esquema das vias metabólicas do benzeno, juntamente com seus metabólitos, está ilustrado na Figura 5.

A primeira etapa da metabolização do benzeno corresponde à reação de oxidação, que forma o intermediário óxido benzeno, catalisado pela enzima citocromo P 450 2E1 (CYP2E1). O óxido benzeno, que está em equilíbrio com o oxepin, pode sofrer

(1) rearranjo não enzimático formando o fenol; (2) hidrólise formando dihidrodio; (3) abertura do anel formando o ácido t,t-mucônico ou (4) reagir com a glutatona, formando o ácido S-fenilmercaptúrico (S-MA) (ARNOLD et al., 2013).

O fenol, metabólito formado por rearranjo, pode sofrer novamente reações de oxidação, pelo intermédio da enzima CYP2E1, formando os metabólitos hidroquinona e catecol. A hidroquinona e o catecol, por sua vez, formam um equilíbrio com suas formas oxidadas (*p*-benzoquinona e *o*-benzoquinona, respectivamente), através de enzimas peroxidases, sendo a reação de oxidação catalisada pela enzima mieloperoxidase (MPO) e a reação de redução de retorno catalisada pela enzima NAD(P)H quinona oxidoreductase (NQO1). Os diversos metabólitos do benzeno possuem diferentes potenciais toxicológicos, sendo a hidroquinona e a *p*-benzoquinona os principais metabólitos apontados como sendo responsáveis pela sua ação hematotóxica (BOOGAARD, 2009).

Figura 5 - Esquema das vias metabólicas do benzeno.



Fonte: Adaptado de BOOGAARD, 2009.

Embora o principal local de oxidação do benzeno pela CYP2E1 ocorra no fígado, o metabolismo adicional também ocorre na medula óssea, que é rica em fonte da enzima peroxidase MPO. Essa enzima MPO foi identificada em altas concentrações em

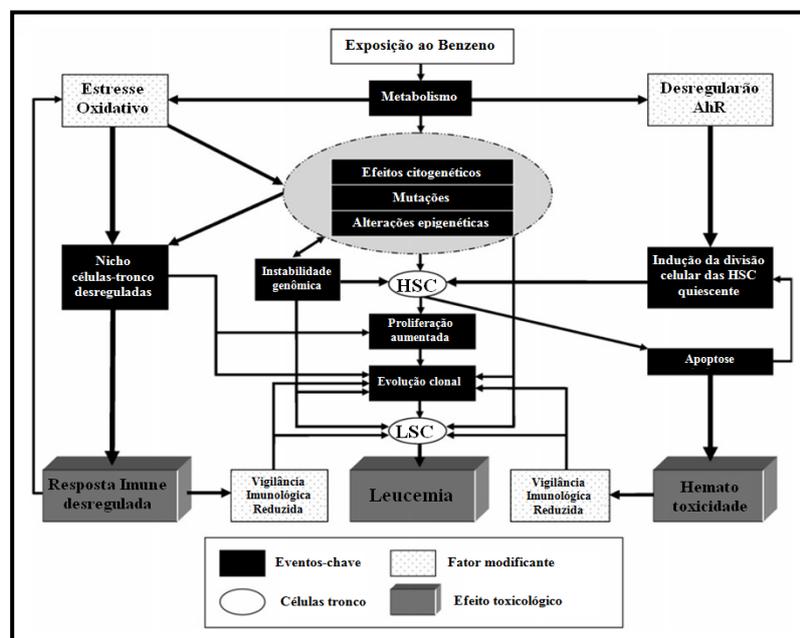
células granulócitas precursoras e pode oxidar vários metabólitos polifenólicos do benzeno, tendo, portanto, um importante papel na toxicidade hematopoiética do mesmo (RANA & VERMA, 2005; HAYS et al., 2012). O mecanismo de ação de toxicidade hematopoiética do benzeno é em grande parte desconhecido, tanto no desenvolvimento de citopenias periféricas quanto na indução de LMA (MEEK & KLAUNIG, 2010; HAYS et al., 2012). Entretanto, de modo simplificado, existem alguns eventos-chaves bem definidos que parecem ser necessários para que esse aromático possa exercer a sua toxicidade. Esses eventos-chaves são utilizados na descrição do modo de ação (MoA) do benzeno, sendo eles: (1) metabolização do benzeno a óxido benzeno; (2) interação do metabólito com células cruciais da medula óssea; (3) estímulo das células da medula óssea; (4) proliferação clonal das células iniciadas e (5) desenvolvimento da leucemia (MEEK & KLAUNIG, 2010; HAYS et al., 2012). A etapa crítica descrita por Meek & Klaunig (2010) inclui necessariamente um dano oxidativo adicional ao DNA e às macromoléculas celulares importantes, induzindo mutações e proliferação clonal das células mutadas. Evidências indicam que os metabólitos do benzeno podem interferir no ciclo celular, assim como, induzir a apoptose de células precursoras do sistema hematopoiético, além de alterar importantes vias de sinalização celular do mesmo, resultando em citotoxicidade (YOON et al., 2001; HAYS et al., 2012).

No entanto, múltiplas vias estão envolvidas no mecanismo de ação e no processo leucogênico de benzeno e seus metabólitos, sendo difícil definir por meio de um simples MoA. De acordo McHale et al. (2011), diferentes fatores e potenciais eventos-chave podem contribuir para os efeitos toxicológicos do benzeno. Dentre esses eventos leucomogênicos benzeno-induzido estão incluídos o direcionamento de genes críticos através da indução de fatores genéticos, as anormalidades cromossômicas ou epigenéticas em células-tronco hematopoiéticas (HSC); a instabilidade genômica; a desregulação de células do estroma; a apoptose das HSC e das células do estroma; e a proliferação e diferenciação de células alteradas, que conduzem à geração de células-tronco leucomogênicas (LSC). Além disso, também estão incluídos os eventos-chave modulados pelo estresse oxidativo, pela desregulação do receptor Aril Hidrocarboneto (AhR) e pela redução da imunovigilância, que levam a hematotoxicidade e leucemia (Figura 6).

A toxicidade do benzeno tem se mostrado maior em células que se dividem rapidamente em comparação com células que estejam em estado quiescente do ciclo.

Hipóteses incluem a inibição da topoisomerase II, cuja função é remover torções nas fitas de DNA, evitando nós que, conseqüentemente, bloqueiam a replicação celular e causam apoptose (MONDRALA & EASTMOND, 2010; HAYS et al., 2012). Existe um consenso geral de que o metabolismo do benzeno tem um papel importante na sua toxicidade, entretanto, não é definido quais de seus metabólitos são responsáveis por pelos efeitos tóxicos. Esses efeitos podem ser gerados por meio da inclusão de ligação covalente em biomoléculas importantes, como proteínas e DNA; da geração de espécies oxidantes resultando em estresse oxidativo; de danos nas tubulina, proteínas histonas, topoisomerase II e no próprio DNA, por DNA-proteína, cross-linking ou quebras das fitas do mesmo; da interferência na segregação dos cromossomos durante a mitose e de aberrações cromossômicas, especialmente, nos cromossomos 5 e 7, que são afetados no desenvolvimento da LMA. Entretanto, a relação entre o potencial genotóxico dos metabólitos do benzeno e sua relação com os efeitos carcinogênicos ainda precisa ser mais bem elucidada (SNYDER, 2004; SNYDER, 2007; SNYDER, 2012; HAYS et al., 2012).

Figura 6 - Diferentes MoA de leucogênese induzida pelo benzeno, com seus principais eventos potenciais, fatores modificadores e efeitos toxicológicos.



Fonte: Adaptado de McHALE et al., 2011.

Nota: AhR - Receptores aril hidrocarboneto
HSC - células-tronco hematopoiéticas
LSC - células-tronco leucêmicas

I.3.2. Interação entre Estresse oxidativo e danos no DNA

Mesmo que a relação entre a genotoxicidade dos metabólitos do benzeno e seus efeitos carcinogênicos ainda não esteja totalmente elucidada, a mesma parece ser modulada pelo estresse oxidativo. Reações de oxidação são fundamentais para o metabolismo de diversos organismos aeróbicos, incluindo os seres humanos, e geram como produtos os radicais livres ou espécies reativas. O termo radical livre se refere a uma espécie química, podendo ser átomo ou molécula, que possui um elétron desemparelhado no seu orbital de valência, conferindo uma alta reatividade química, especialmente como agente oxidante, pela tendência de adquirir o segundo elétron para se estabilizar (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Por sua vez, o termo espécies reativas inclui não apenas os radicais livres, mas também compostos altamente reativos que não tenham elétrons desemparelhados. Geralmente, essas espécies reativas contêm átomos de nitrogênio e oxigênio, com pares de elétrons livres, que são nomeadas espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de oxigênio (ERO), respectivamente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Ambas as espécies reativas se encontram envolvidas naturalmente nos processos fisiológicos do metabolismo celular aeróbico, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, a produção excessiva dessas espécies reativas pode apresentar efeitos prejudiciais, como peroxidação dos lipídios de membrana e danos a proteínas, enzimas, carboidratos e DNA, estando relacionadas com várias patologias, como por exemplo, artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS et al., 2006).

Dessa forma, atualmente, há um grande interesse em estudos sobre os efeitos oxidativos causados por essas espécies reativas no organismo. Tanto as ERO como as ERN são moléculas instáveis, quimicamente reativas e apresentam tempo de meia-vida curta (McCord, 2000). As principais ERO são o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HClO) e os radicais hidroxila ($\text{HO}\bullet$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$), alcóxila ($\text{RO}\bullet$) e ânion superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$). Dentre os exemplos das ERN estão o radical óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), o óxido nitroso (N_2O_3), o ácido nitroso (HNO_2), o nitrito (NO_2^-), o nitrato (NO_3^-) e o peroxinitrito (ONOO^-) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005).

A produção elevada e contínua dessas espécies reativas e/ou sua inadequada remoção podem suprimir o sistema de defesa antioxidante e resultar no estresse oxidativo, devido a um desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, conduzindo a danos celulares. A intensidade deste desequilíbrio depende das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com moléculas-alvo e da compartimentalização celular destes processos, onde fatores de solubilidade e difusibilidade são determinantes (SIES, 1991; VASCONCELOS et al., 2007).

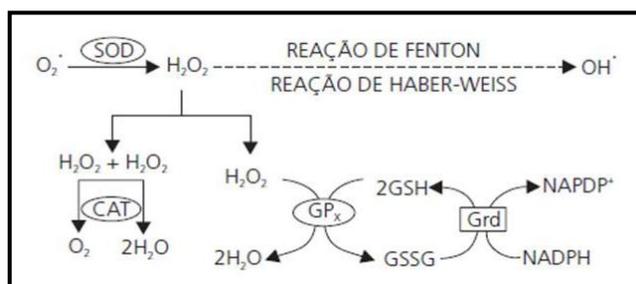
Por outro lado, as espécies reativas formadas no organismo podem ser combatidas por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, os quais correspondem àqueles produzidos pelo corpo ou absorvidos na dieta, respectivamente. Entre os antioxidantes produzidos pelo corpo estão os classificados como enzimáticos, a exemplo das enzimas glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), e os não enzimaticamente, como glutaciona (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), melatonina, ácido diidrolipóico, ubiquinonas, metalotioneína e polifenóis (flavonoides e poliflavonoides). Além disso, o organismo também utiliza os antioxidantes provenientes da dieta como o β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E) (BARREIROS et al., 2006; OGA et al., 2008; BARBOSA et al., 2010).

A SOD catalisa a reação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) convertendo-o em oxigênio (O_2) e H_2O_2 . Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contendo Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox, presente no citosol, e a segunda contendo Mn^{2+} como centro redox, estando presente nas mitocôndrias (BARBOSA et al., 2010). Por sua vez, a CAT atua na dismutação do H_2O_2 em O_2 e água (H_2O). A molécula de H_2O_2 pode se difundir facilmente através das membranas celulares (nuclear e mitocondrial), sendo considerada uma das principais responsáveis pelos diversos danos celulares. Além disso, devido as células possuírem metais de transição em seu interior, o H_2O_2 pode ser convertido em radical hidroxil ($HO\bullet$) e ânion hidroxila (HO^-), por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, que por sua vez, podem causar danos a macromoléculas como DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares (BARBOSA et al., 2010).

A GPx também converte o H_2O_2 à água, por meio da oxidação da glutaciona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). A enzima glutaciona redutase (GR), responsável

pela recuperação da GSH, possibilita a manutenção da integralidade do ciclo redox da GSH e, conseqüentemente, do equilíbrio adequado entre os sistemas de defesa enzimáticos. A GSH é um tripeptídeo, formado pelos aminoácidos glicina, ácido glutâmico e cisteína, e constitui o tiol redutor mais abundante no meio intracelular. A manutenção dos níveis adequados de GSH é feita pela GR, a qual utiliza equivalentes redutores de NAD(P)H para manter a GSH na forma reduzida, como substrato para a GPx. Assim, a atuação eficiente da GPx exige um sistema enzimático sequencial que envolve a GR e as enzimas que mantêm níveis de NAD(P)H, nos compartimentos citossólico e mitocondrial (RIBEIRO et al., 2005). Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), altamente polarizável, tornando-a um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da GSH um bom redutor (Figura 7) (GURER-ORHAN et al., 2004; BARBOSA et al., 2010).

Figura 7 - Representação esquemática da interação do sistema enzimático de defesa antioxidante.

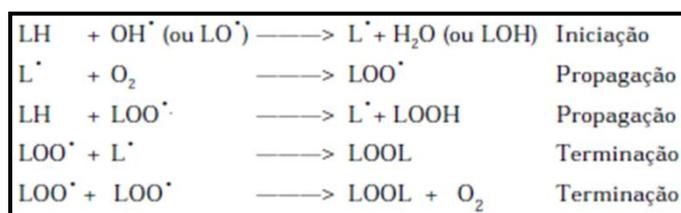


Por sua vez, a GST, enzima de metabolização de fase II, corresponde a uma família de enzimas com diferentes localizações celulares, que também auxilia na resposta ao estresse oxidativo por meio da detoxificação de xenobióticos nocivos. De maneira geral, a GST catalisa a conjugação do grupamento GSH com substratos eletrofílicos. Esses substratos 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 (HAYES et al., 2005; HUBER et al., 2008). Cabe ressaltar, que as alterações das atividades fisiológicas das enzimas antioxidantes podem ter, como consequência, um grande efeito sobre a resistência celular aos danos induzidos por espécies reativas. Portanto, o sistema antioxidante tem um papel preventivo fundamental às diversas biomoléculas celulares, inibindo ou

retardando o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral (MATÉS et al., 1999; BARREIROS et al., 2006).

Dentre as biomoléculas celulares suscetíveis às ações das espécies reativas, a membrana é uma das mais atingidas por meio de reações de peroxidação lipídica (Figura 8), que acarreta alterações em sua estrutura e permeabilidade celulares. Conseqüentemente, ocorre a perda da seletividade na troca iônica e a liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, formando produtos citotóxicos/genotóxicos, como aldeídos α,β -insaturados 4-hidroperoxi-2-nonenal, 4-hidroxi-2-nonenal, 4-oxo-2-nonenal e 4,5-epóxi-2(E)-decenal, culminando em morte celular. Além disso, a decomposição dos ácidos graxos com três ou mais insaturações gera o aldeído malônico ou malondialdeído (MDA), que também possui genotóxica se ligando ao 2'-desoxiguanosídeo gerando pirimidol-[1,2a]purin-10-ona desoxiguanosídeo. A peroxidação lipídica também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Figura 8 - Reação em cadeia do processo de peroxidação lipídica.



Fonte: FERREIRA & MATSUBARA, 1997.

Nota: LH - Ácido graxo;
 LO[•] e L[•] - Radicais lípidicos;
 LOO[•] - Radical peroxíla;
 LOOL - Hidroperóxido lípidicos.

Os outros dois grupos de biomoléculas danificadas sob condições de estresse oxidativo são o material genético e os aminoácidos/proteínas (HUBER et al., 2008). Dentre os radicais produzidos no estresse oxidativo, um dos mais danosos ao DNA é o HO[•] que ataca tanto as bases nitrogenadas quanto ao seu açúcar desoxirribose. O ataque ao açúcar é realizado por meio da abstração de um dos átomos de hidrogênio pelo HO[•], levando a formação de radicais adutos que rapidamente são complexados formando os produtos 5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina (8OHdA) e 5'- 8-ciclo-2'-desoxiguanosina

(8OHdG). A eletrofilicidade da hidroxila também possibilita sua interação com as bases nitrogenadas, por reação de adição em sítios de alta densidade eletrônica e desta forma, dependendo da base nitrogenada e da posição do ataque são formados diferentes compostos estáveis. Os ataques as bases purínicas ocorrem nas posições de C-4, C-8, e em menor proporção em C-5, formando 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyG), 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapyA), 8-*oxo*-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosídeo (8-*oxo*G), 8-*oxo*-7,8-dihidroadenosine (8-*oxo*A). O ataque às bases pirimidínicas ocorre, por adição à ligação dupla Δ e produz como produto intermediário os radicais livres nas posições C-6 e C-5 nas proporções são aproximadamente 70% e 30%, respectivamente. Em seguida, esses intermediários podem gerar os produtos 5-hidroxi-6-hidrocitosina, 6-hidroxi-5-hidrocitosina, 5-hidroxi-6-peroxicitosina, 6-hidroxi-5-peroxicitosina, 5-hidroxi-6-oxocitosina e 6-hidroxi-5-oxocitosina, referentes a citosina; e 5-hidroxi-6-hidrotimina, 6-hidroxi-5-hidrotimina, 5-hidroxi-6-oxotimina e timinaglicol, referentes a timina. Além disso, o HO• também reage com aminoácidos (cisteína, histidina, triptofano, metionina, fenilalanina, arginina e asparagina) e proteínas de cadeia lateral. Essas reações originam ligações cruzadas e quebras de ligações com ou sem formação de fragmentos, podendo causar como consequência a perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo das membranas celulares, citólise e morte celular (BARREIROS et al., 2006).

O ataque intenso e frequente de espécies reativas pode originar graves alterações celulares, mutações no DNA e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de doenças e cânceres. Nesse contexto, a utilização dos parâmetros enzimáticos do estresse oxidativo associados aos biomarcadores de genotoxicidade, são utilizados de forma estratégica em estudos científicos que avaliam diversos tipos de exposição.

I.4. Avaliação toxicológica por biomarcadores

Os biomarcadores, também conhecidos como indicadores biológicos, são ferramentas de fundamental importância na avaliação dos danos à saúde humana, causados pela exposição às diversas substâncias químicas. Idealmente, esses biomarcadores fornecem informações sobre os níveis relevantes de exposição a determinado composto químico, pela determinação das concentrações desse mesmo composto ou de seus metabólitos em diversas matrizes biológicas e, posteriormente, correlação com os efeitos adversos à saúde. A utilização desses biomarcadores, no

processo de avaliação toxicológica de trabalhadores expostos a diferentes compostos químicos, tem como objetivo proporcionar dados de investigação científica na vigilância e na estimativa de risco à saúde humana (WHO 1993; WHO, 2000; WHO 2001).

Com isso, a vigilância da saúde de trabalhadores expostos a compostos químicos, enquanto determinante das preocupações preventivas, preconiza o planejamento e a realização do monitoramento ambiental e biológico, por meio da utilização e aplicação de biomarcadores. Esses biomarcadores podem ser categorizados em três tipos principais: exposição, efeito e susceptibilidade. Os biomarcadores de exposição podem corresponder à mensuração de um determinado composto nas diversas matrizes ambientais ou à mensuração do composto e/ou de seus metabólitos nas diferentes matrizes biológicas dos indivíduos expostos, sendo nesse último caso também denominado biomarcador de dose interna. Por sua vez, os biomarcadores de efeito indicam alterações presentes no organismo e permitem avaliar o prognóstico da doença, enquanto que os biomarcadores de susceptibilidade caracterizam diferenças ou alterações genéticas que tornam os indivíduos mais ou menos propensos ao desenvolvimento de determinadas doenças (WHO 1993; WHO 2001; DE PALMA et al., 2013). Desta forma, nos estudos de vigilância e de estimativa de risco à saúde humana, esses biomarcadores são utilizados como ferramentas nos processos de monitoramento ambiental e biológico de populações expostas.

O Monitoramento Ambiental (MA) consiste na avaliação de risco à saúde humana através da quantificação da exposição, por meio da mensuração dos compostos no ambiente de trabalho, comparando-os com os Limites de Exposição Ocupacional (LEOs) estabelecidos legalmente. Diferentes LEOs são preconizados por agências não governamentais dos diversos países, tais como TLV (*Threshold Limit Values* - ACGIH/ EUA), PEL (*Permissible Exposure Limit* - OSHA/ EUA), OELV (*Occupational Exposure Limits Value* – SCOEL/ União Europeia) e WEL (*Workplace Exposure Limits* – HSE/ Reino Unido), cujos valores são pré-estabelecidos com critérios de aceitabilidade, baseado-se nos efeitos causados à saúde pelas exposições aguda e crônica dos variados compostos. Com relação ao limite de exposição do benzeno, há um esforço mundial em restringi-lo o máximo possível. Os diferentes LEOs para 8 horas diárias de exposição de algumas instituições internacionais e nacional estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Diferentes LEOs para 8 horas diárias de exposição de algumas instituições internacionais e nacional.

LEOs	LT (VRT) (MTE/Brasil)	TLV (ACGIH/EUA)	PEL (OSHA/EUA)	OELV (SCOEL/UE)	WEL (HSE /UK)
Benzeno	1ppm	0,5ppm	1ppm	1ppm	1ppm

Fonte: BUSCHINELLI, 2014.

No Brasil, são estabelecidos os Limites de Tolerância (LT) através dos Anexos 11 e 12 da Norma Regulamentadora nº15 do Ministério do Trabalho e Emprego (MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO, NR-15). Entretanto, para a exposição ao benzeno, foi adotado o Valor de Referência Tecnológico (VRT), no lugar do LT, assumindo legalmente, que mesmo estabelecendo um valor ambiental em termos de vigilância sanitária, não se excluiu o risco causado à saúde humana dos trabalhadores expostos nesse mesmo ambiente.

O Monitoramento Biológico (MB), por sua vez, também consiste na avaliação de risco à saúde humana, porém, por meio da avaliação dos compostos químicos e/ou seus metabólitos em tecidos, secreções, excreções, ar exalado ou outras matrizes biológicas, tomando como referência comparativa os Índices Biológicos Máximos Permitidos (IBMP), cujos valores supõem-se não causar danos à saúde da maior parte da população ocupacionalmente exposta (BUSCHINELLI, 2014). Por levar em consideração a variabilidade individual na exposição, o MB possui vantagens com relação ao MA, pois o MB complementa o MA, especialmente, quando não existirem ações de controle nos ambientes de trabalho ou quando os controles realizados forem insuficientes. Além disso, o MB também pode utilizar exames médicos ocupacionais que podem ser utilizados como histórico de notificação dos agravos à saúde perante a Previdência Social (BUSCHINELLI, 2014).

Para a exposição ao benzeno, que ocorre sobretudo pela via respiratória, a mensuração do próprio composto químico, no ar, no sangue ou na urina, pode ser utilizado como biomarcador de exposição. Os metabólitos do benzeno, ácido t,t-mucônico (ATTM) e ácido S-fenil mercaptúrico (S-MA), também são biomarcadores de exposição de dose interna que podem ser analisados utilizando-se a urina como matriz biológica (BUSCHINELLI, 2014). 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 no material genético mesmos em doses muito baixas, não tendo exposição segura para as mesmas (WHO 1993; WHO 2001). Por isso, é crescente a utilização, complementar aos biomarcadores de exposição clássicos, de biomarcadores de efeito, tanto relacionados ao estresse oxidativo quanto aos efeitos genotóxicos.

Os métodos mais utilizados para análise dos biomarcadores do estresse oxidativo são os espectrofotométricos e cromatográficos, que avaliam os parâmetros de atividade enzimática das enzimas SOD, CAT, GPx, GR, GST e as concentrações dos tripeptídeos GSH, GSSG e do aldeído MDA (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Por sua vez, os biomarcadores de genotoxicidade analisam o perigo das exposições ao material genético, por meio da avaliação de mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. Alguns desses ensaios genotóxicos são aberrações cromossômicas (AC), troca de cromátides irmãs, mutações pontuais e oncogênicas, micronúcleos (MN) e o ensaio cometa (EC), sendo este último utilizado para avaliar lesões no DNA (MORO et al., 2013; COLLINS & AZQUETA, 2012b; HAYS et al. 2012; RIBEIRO., 2003).

As alterações no genoma humano, decorrentes do ambiente, estilo de vida, dieta e de atividades ocupacionais, geram preocupação quanto à adoção de medidas de proteção da população. Sendo assim, a utilização dos ensaios de genotoxicidade é extremamente útil no rastreamento de compostos com potenciais oncogênico e mutagênico; na caracterização do risco; e nas avaliações da relação dose-resposta e da exposição. Esses resultados geram informações sobre a incidência de efeitos na população exposta a determinadas condições específicas, podendo estabelecer possibilidades de proteção ou redução desses efeitos, sendo de extrema importância para a Saúde Pública (COLLINS & AZQUETA, 2012b; MORO et al., 2013; HAYS et al. 2012).

A técnica de AC baseia-se no estímulo da mitose pela fitohemaglutinina (PHA), seguido do seu bloqueio, na metáfase do ciclo celular, pela colchicina. Através desse teste é possível identificar alterações como deleções, aneuploidias, separação prematura centromérica (SPC). (CELIK & Akbas, 2005) A frequência de AC em linfócitos de sangue periférico pode servir não só de indicador relacionado à exposição a mutagênicos, como também à danos genéticos com relevância no processo carcinogênico. (HAGMAR et al., 2001)

O MN, por sua vez, corresponde a fragmentos de cromátides e/ou cromossomos acêntricos ou aberrantes que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da mitose, sendo resultados de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentais induzidas. Sendo assim, o teste de MN distingue citologicamente, quebras ou perdas cromossômicas e é extensivamente usado em estudos de avaliação da exposição a diferentes substâncias químicas, refletindo a incidência de eventos genotóxicos. O teste do MN de mucosa oral é considerado um procedimento rápido, não oneroso e não invasivo, sendo, por isso, muito utilizado no MB de indivíduos sob risco carcinogênico. (LEÓDIDO et al., 2013; CARRARD et al., 2007)

O EC, também conhecido como Single-Cell Gel (SCG) ou Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE), foi descrito pela primeira vez por Östling e Johanson (1984), como uma técnica microeletroforética para visualização direta de danos no DNA em células individuais. Posteriormente, Singh et al. (1988) introduziram condições alcalinas na etapa eletroforética aumentando a sensibilidade de detecção à presença de quebras de fita única de DNA e de lesões de sítios álcali sensíveis e, deste então, o teste de EC vem sendo muito crescentemente utilizado em estudos de toxicogenética (SINGH, et al. 1988). Desta forma, o EC é uma técnica eletroforética de alta sensibilidade, reprodutibilidade, simples e rápida para avaliação de dano e de reparo do DNA em células proliferantes e não proliferantes, em nível individual, podendo ser empregado em amostras celulares com volume extremamente pequenos (LORENZO et al., 2013; COLLINS, 2014; AZQUETA & COLLINS, 2013). A técnica de EC é um teste de genotoxicidade para detecção de lesões no DNA. Tais lesões genômicas, após serem processadas pelo aparato enzimático celular de reparo do DNA, podem ser corrigidas ou levadas a mutações e a danos cromossômicos, como por exemplo, a formação AC e MN (COLLINS, 2014; AZQUETA & COLLINS, 2013).

Uma vez que danos no DNA são frequentemente célula- e tecido-específicos, uma técnica como a do EC, que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (COLLINS, 2014; AZQUETA & COLLINS, 2013; RIBEIRO, 2003). Sendo assim, o teste de EC não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferente das mutações, as lesões detectadas podem ser também utilizadas em estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a

cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir sobre a fidedignidade do processo de reparo. A inclusão de enzimas específicas, que lesionam o DNA em locais de bases oxidadas, aumenta ainda mais a sensibilidade do teste (AZQUETA, et al. 2013, AZQUETA, et al. 2009; AZQUETA & COLLINS, 2013).

Oxidações nas bases nitrogenadas do DNA relacionadas à exposição aos diversos compostos químicos e ao estresse oxidativo, também, podem ter graves consequências mutagênicas. Essas bases oxidadas no DNA podem ser medidas por cromatografia; entretanto, há limitações quanto à quantificação dessas oxidações a baixos níveis. Uma abordagem confiável derivada do EC é empregar endonucleases específicas para bases oxidadas, as quais introduzem quebras no DNA que foi oxidado e, em seguida, pode-se medir estas quebras utilizando a técnica clássica do ensaio de cometa. As duas enzimas mais comumente utilizadas, são a DNA-formamidopirimidina glicosilase (FPG), que detecta principalmente 8-*oxo*-7,8-dihidroguanina (8-*oxo*G), e endonuclease III, que reconhece pirimidinas oxidadas (AZQUETA, et al. 2009; COLLINS & AZQUETA, 2012a).

Entretanto, a enzima FPG não é específica para bases purinas oxidadas. Speit et al. (2004) encontraram, através da técnica de EC com FPG, um aumento significativo na detecção de danos por metilmetanosulfonato (MMS) e etilmetanosulfonato (EMS), mas não por etilnitrosouréia. Levando-se em conta o espectro de lesões para esses compostos químicos avaliados, eles concluíram que a enzima endonuclease FPG estava atacando adutos de alquilação em N7-guanina. Além disso, a FPG também está associada à quebra do DNA em locais de perda de base (sítios AP – [purínico/pirimidínico]). Sendo assim, a inclusão da endonuclease FPG na técnica de EC é um complemento útil para os testes padrões de genotoxicidade, contribuindo para detectar compostos químicos genotóxicos que não induzem diretamente quebras no DNA (AZQUETA, et al. 2013). Outras enzimas, como a T4 endonuclease V (para pirimidinas dimerizadas induzida por UV); AlkaA (aumenta drasticamente o rendimento de quebras de DNA em células tratadas com MMS) e a 8-oxoguanina glicosilase (OGG1, homóloga a FPG de mamífero, porém com uma maior especificidade para 8-oxoguanina), também têm sido utilizadas (AZQUETA, et al. 2013).

Portanto, o EC tem amplas aplicações, como testes de genotoxicidade *in vitro*, *in vivo*, no biomonitoramento ambiental e no monitoramento populacional humano (COLLINS & AZQUETA, 2012b). A aplicação do EC no monitoramento populacional

humano tem como objetivos avaliar o nível dos efeitos no DNA provocado por exposição ambiental e/ou ocupacional a compostos tóxicos; estudar os efeitos ou fatores que contribuem para o aparecimento de doença; e investigar variações individuais, como por exemplo, a capacidade de reparação do DNA ou resistência antioxidante (AZQUETA & COLLINS, 2013).

Estudos sugerem que ERO, por intermédio de danos oxidativos no DNA (quebras, adutos), estejam associadas a diversas exposições a compostos químicos, como benzeno, e ao aparecimento de várias doenças, sendo necessários biomarcadores sensíveis no monitoramento populacional, como o EC. A produção elevada e contínua de ERO e/ou sua inadequada remoção podem suprimir o sistema de defesa antioxidante e resultar no estresse oxidativo, devido a um desequilíbrio entre os antioxidantes e oxidantes, em favor dos oxidantes (GURER-ORHAN et al., 2004). Além disso, outros estudos também revelam que muitas doenças têm um componente inflamatório e essa resposta inflamatória envolve a produção de ERO por macrófagos. Enquanto macrófagos ativados desempenham um papel essencial na defesa do organismo, há efeitos colaterais danosos inevitáveis dessas espécies liberadas. No caso do câncer, também há fortes evidências circunstanciais associado com o dano oxidativo. Bases oxidadas, tais como 8-oxoguanina (8-oxoG) são potencialmente mutagênicas, através de uma alteração nas propriedades de emparelhamento (8-oxoG tendendo a emparelhar com adenina), além de mutações somáticas em genes críticos serem a causa da maioria dos cânceres (GROLLMAN & MORIYA, 1993; COUSSENS & WERB, 2002). Sendo assim, como causa ou efeito, o estresse oxidativo parece ser um fator comum em muitas doenças crônicas degenerativas, sendo a técnica de EC muito utilizada em diversos estudos para avaliar estes danos oxidativos ao DNA, incluindo monitoramento à saúde humana (COLLINS, 2009).

O benzeno é reconhecidamente um carcinógeno para seres humanos que causa alterações no sistema hematopoiético como SMD, podendo evoluir para LMA. Entretanto, a relação entre o potencial genotóxico dos seus metabólitos e sua relação com os efeitos carcinogênicos ainda permanecem desconhecidas. A metabolização do benzeno forma diferentes espécies reativas tóxicas, como a hidroquinona e p-hidroquinona que possuem alta reatividade com o DNA em experimentos in vitro e levam a formação de anéis benzeno derivados de bases exocíclicas como 3,N⁴-benzeteno-2'-dC (pBQ-dC), 1,N⁶-benzeteno-2'-dA (pBQ-dA) e 1,N²-benzeteno-2'-dG

(pBQ-dG). A formação desses adutos de DNA é claramente prejudicial à integridade genômica, e supõem-se ter um papel central na carcinogênese química (GULIAEV et al. 2004).

A maioria dos compostos genotóxicos não induz diretamente quebras no DNA, mas sim formam adutos de DNA ou alterações de base. Esta limitação pode ser pelo menos parcialmente superada pelo uso criterioso de enzimas, comumente enzimas de reparo de DNA de origem bacteriana que, com diferentes graus de especificidade, permitem converter lesões a quebras (GULIAEV et al. 2004). A aplicação da técnica de EC com endonucleases vem sendo introduzida no monitoramento biológico a seres humanos expostos a compostos químicos em geral, com objetivo de melhor avaliar as substâncias com o mecanismo de ação não totalmente esclarecido, como é o caso do benzeno.

No Brasil, estudos de avaliação toxicológica de trabalhadores de PRC expostos aos solventes derivados da gasolina, especialmente ao benzeno, são insuficientes e escassos frente à demanda desses trabalhadores e à real situação de risco, principalmente relacionados ao monitoramento biológico desses trabalhadores. Mesmo o benzeno sendo muito usado industrialmente e estudado há bastante tempo, o mecanismo de sua ação tóxica ao sistema hematopoiético continua sendo desconhecido, tanto para o desenvolvimento de citopenias periféricas, quanto para o de LMA, entre outras doenças leucemogênicas e oncogênicas.

Portanto, esta tese faz 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 é avaliar a exposição ocupacional ao benzeno em postos revendedores de combustíveis no Município do Rio de Janeiro, através de uma abordagem multidisciplinar integrada para ações de vigilância em saúde do trabalhador e ambiental, como ferramenta estratégica para atuação do SUS no território.

II. OBJETIVO

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a exposição ocupacional e ambiental ao benzeno a baixas doses sob a perspectiva dos efeitos genotóxicos em trabalhadores de postos revendedores de combustíveis (PRC), localizados na zona oeste do município do Rio de Janeiro, e em trabalhadores das Portarias do *Campus* - Castelo Mourisco da Fiocruz - RJ da Fundação Oswaldo Cruz - RJ.

Objetivos Específicos

- Avaliação sociodemográfica e clínica das populações do estudo;
- Avaliação da exposição ambiental por meio da análise de benzeno no ar atmosférico;
- Avaliação do biomarcador de exposição ácido t,t-mucônico na urina (ATTM);
- Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo por meio das análises da catalase (CAT), glutatona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), grupamento tiol (TIOL) e malondialdeído (MDA);
- Avaliação dos biomarcadores de genotoxicidade ensaio cometa (EC) com uso da enzima de restrição DNA-formamidopirimidina glicosilase (FPG) e aberrações cromossômicas (AC);
- Avaliação da associação entre os resultados de avaliação ambiental, biomarcadores e dados clínicos dos trabalhadores;
- Avaliação da técnica de EC com uso da enzima de restrição FPG como biomarcador nas populações ocupacionalmente e ambientalmente expostas ao benzeno a baixas doses.

III. METODOLOGIA

O respectivo estudo foi do tipo transversal, no qual foi realizada a comparação da avaliação da exposição e dos parâmetros toxicológicos de estresse oxidativo e de genotoxicidade entre duas populações expostas a baixas concentrações de benzeno, sendo uma exposta ocupacionalmente e outra ambientalmente. 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.

III.1. Caracterização das áreas de estudo

De acordo com a Secretaria Municipal de Urbanismo (2015), o município do Rio de Janeiro é dividido em cinco grandes Áreas de Planejamento (AP) comumente conhecidas como, AP1, AP2, AP3, AP4 e AP5, que correspondem, respectivamente, as grandes áreas de Centro e Paquetá; Tijuca e Zona Sul; Zona Norte; Jacarepaguá e Barra da Tijuca; e, por fim, Zona Oeste (Figura 9).

Figura 9 - Áreas de Planejamento do Município do Rio de Janeiro.



Fonte: Secretaria Municipal de Urbanismo – RJ.

Nota: AP1 - Regiões Administrativas I, II, III, VII, XXI, XXIII (Centro / Paquetá)
AP2 - Regiões Administrativas IV, V, VI, VIII, IX, XXVII (Tijuca e Zona Sul)
AP3 - Regiões Administrativas X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XX, XXII, XXV, XXVIII, XXIX, XXX e XXXI (Zona Norte)
AP4 - Regiões Administrativas XVI, XXIV e XXXIV (Jacarepaguá e Barra da Tijuca)
AP5 - Regiões Administrativas XVII, XVIII, XIX, XXVI e XXXIII (Zona Oeste)

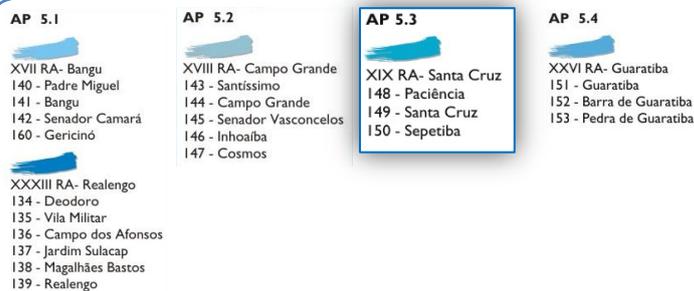
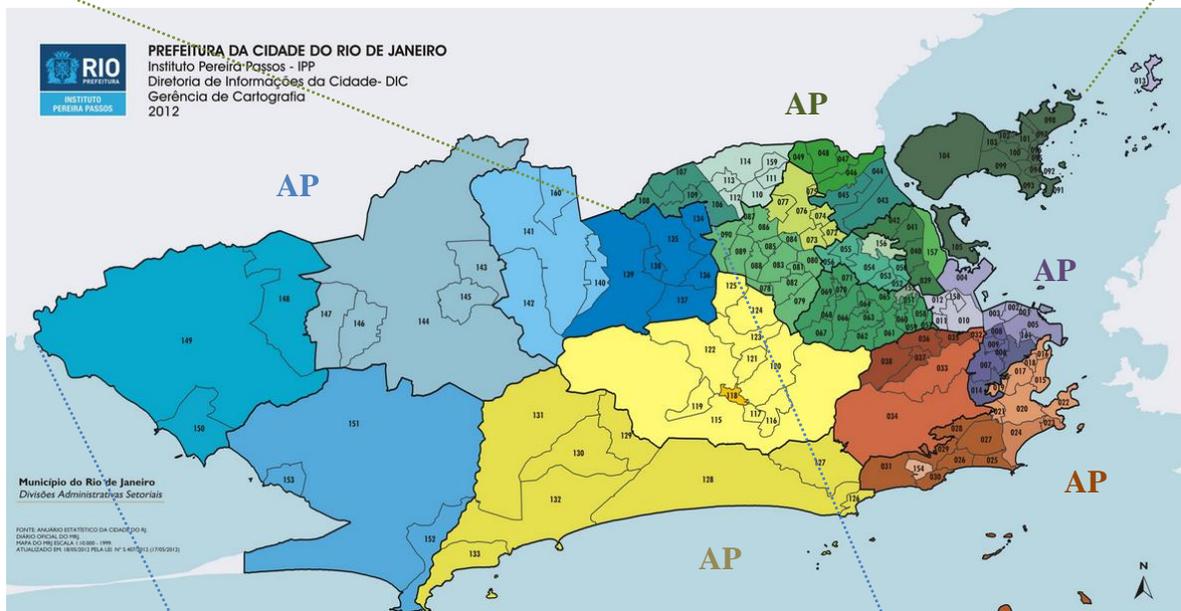
Essa divisão setorial é utilizada desde 1981, tendo as Gerências de Planejamento Local a atribuição de desenvolver estudos urbanísticos; propor e articular soluções para os problemas locais, assim como, monitorar sistematicamente a aplicação da legislação em vigor visando sua reformulação. Dessa forma, devido à necessidade de uma divisão setorial, as AP são subdivididas por Regiões Administrativas (RA) geograficamente delimitadas por seus respectivos bairros ou regiões de favelas, como por exemplo, Rocinha, Maré e Complexo do Alemão. Com isso, atualmente, o Município do Rio de Janeiro é administrativamente dividido em cinco AP, 33 RA e 160 Bairros (Figura 10).

Considerando essa divisão do Município do Rio de Janeiro, a AP5, que corresponde a Zona Oeste, é composta por cinco RA, sendo elas XVII RA (Bangu), XXXIII RA (Realengo), XXVIII RA (Campo Grande), XXVI RA (Guaratiba) e XIX RA (Santa Cruz). Essa última, XIX RA - Santa Cruz corresponde a AP5.3, área representada pelos bairros de Santa Cruz, Paciência e Sepetiba e onde estão localizados os PRC do atual estudo (Figura 10).

Além disso, a AP3, que representa a Zona Norte, é constituída pelas Regiões Administrativas X RA (Ramos), XXX RA (Complexo da Maré), XIII RA (Méier), XXVIII RA (Jacarezinho), XIV RA (Irajá), XV RA (Madureira), XII RA (Inhaúma), XXIX RA (Complexo do Alemão), XI RA (Penha), XXXI RA (Vigário Geral), XXII RA (Anchieta), XXV RA (Pavuna) e XX RA (Ilha do Governador). O *Campus* - Castelo Mourisco da Fiocruz, local onde foram selecionados os trabalhadores ambientalmente expostos ao benzeno, está localizado na X RA da AP3.1(Figura 10).

Segundo dados da Secretaria de Fazenda do Estado do Rio de Janeiro, no município do Rio de Janeiro localizam-se 130 empresas de médio e grande porte, destacando-se a Companhia Siderúrgica do Atlântico (CSA, do grupo Thyssen-Krupp), a Gerdau, a Fábrica Carioca de Catalisadores, a Casa da Moeda do Brasil, a Pan-americana, entre outras. Essa informação corrobora com os resultados do relatório de qualidade do ar realizado no Município do Rio de Janeiro, em 2009, pelo INEA, que aponta a Região Metropolitana do Rio de Janeiro como sendo área crítica em termos de poluição do ar e tendo a segunda maior concentração de população, de veículos, de indústrias e de fontes emissoras de poluentes do país. (BARROS et al., 2009).

Figura 10 - Município do Rio de Janeiro dividido por Área de Planejamento e suas respectivas Regiões Administrativas, estando detalhadas as áreas AP3 e AP5.



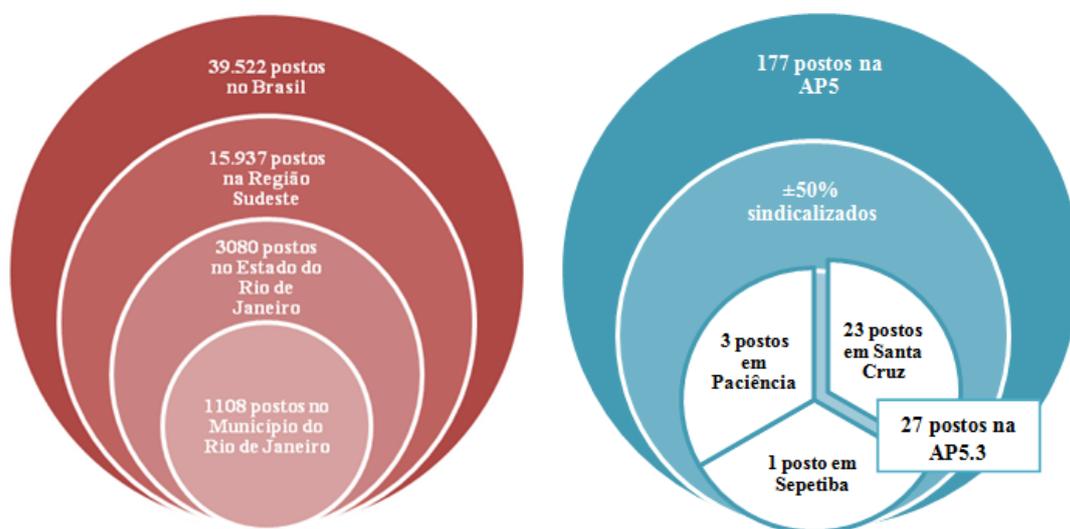
Fonte: Secretaria Municipal de Urbanismo – RJ.

III.2. População ocupacionalmente exposta ao benzeno

A população ocupacionalmente exposta ao benzeno foi composta por trabalhadores de PRC localizados na AP 5.3 do município do Rio de Janeiro, cujo recrutamento foi realizado juntamente com a seleção dos PRC 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).

Segundo informações do último levantamento da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), há 39.522 PRC registrados como autorizados em todo território nacional, sendo 15.937 postos situados na região Sudeste do país (ANP, 2014). De acordo com dados fornecidos pelo SINPOSPETRO-RJ, existem 3080 PRC no Estado do Rio de Janeiro, estando localizados 1108 no Município do Rio de Janeiro e, mais especificamente, 177 postos na AP 5. Além disso, aproximadamente, 50% dos PRC são sindicalizados e 27 postos estão localizados na AP 5.3, caracterizando o número total de postos da atual área de estudo (Figura 11).

Figura 11 - Distribuição de postos revendedores de combustíveis.



Fonte: ANP (2014) e SINPOSPETRO-RJ.

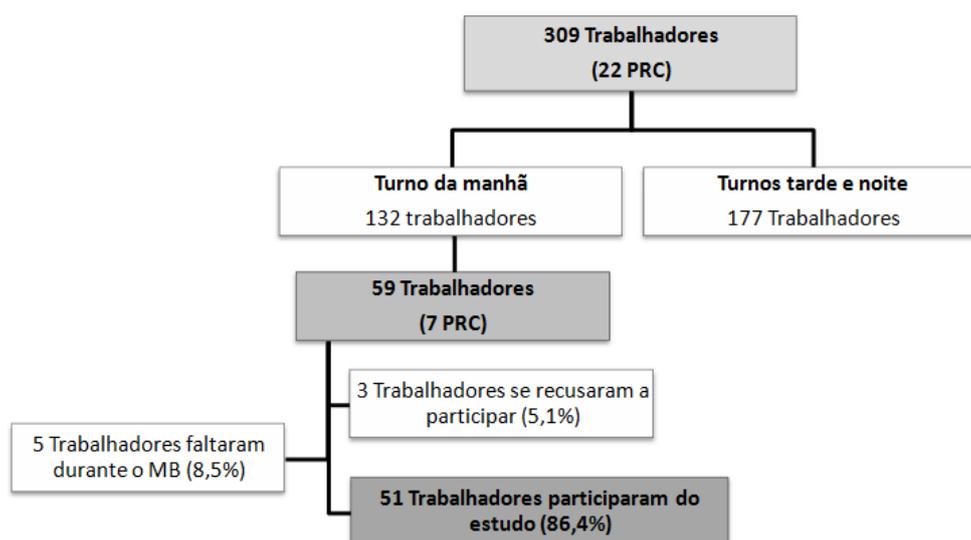
O número total de trabalhadores empregados desses 27 postos sindicalizados localizados na área AP5.3 foi de 309 trabalhadores, sendo 132 do turno da manhã, segundo registros do SINPOSPETRO-RJ, cuja jornada de trabalho era de 6h às 14h. Todos os 27 postos foram contactados e convidados a participar do estudo. Entretanto, durante as visitas aos PRC registrados, foi observado que 5 do total dos 27 PRC

estavam desativados, não apresentando trabalhadores e nem condições adequadas para uso das bombas, reduzindo, assim, o número total de PRC da área de estudo para vinte e dois. Dos 22 PRC localizados na AP5.3, apenas 7 (26%) tiveram o aceite dos proprietários em participar do estudo, sendo 3 desses localizados em Paciência e 4 em Santa Cruz. O único PRC, localizado em Sepetiba, apresentava apenas um funcionário, que não usava uniforme apropriado para o trabalho, sendo excluído da pesquisa. É importante informar, que 3 PRC pertenciam a um único dono que se recusou a participar do estudo. Além disso, devido a participação do SINPOSPETRO e conflitos entre trabalhadores e patrões, o proprietário de 1 dos PRC também se recusou em colaborar com a pesquisa.

Posteriormente ao aceite dos proprietários em colaborar com o estudo, todos os trabalhadores do turno da manhã dos 7 PRC foram convidados a participar da pesquisa, recebendo as devidas informações sobre a mesma e assinando voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I). Os critérios de inclusão adotados foram: idade superior a 18 anos, de ambos os sexos e aceitação em participar do estudo, através da assinatura do TCLE, sendo excluídas mulheres grávidas.

Do total de trabalhadores do turno da manhã dos 7 PRC ($n = 59$), apenas 3 (5%) se recusaram a participar (Figura 12). Com isso, foi obtido o aceite de 97% dos trabalhadores, entretanto, 5 desses não estavam presentes durante o MB, totalizando a participação de 51 trabalhadores (86,4%). A Figura 12 esquematiza em detalhes a seleção da população ocupacionalmente exposta ao benzeno do atual estudo.

Figura 12 - Diagrama da seleção da população ocupacionalmente exposta ao benzeno.



Portanto, a população ocupacionalmente exposta ao benzeno do atual estudo foi composta por 51 trabalhadores oriundos de 7 PRC localizados na AP 5.3 do município do Rio de Janeiro. Os 51 trabalhadores participantes correspondem a 38,6% dos trabalhadores de todos os PRC do turno da manhã e a 16,5% da população total de PRC da AP5.3.

III.3. População ambientalmente exposta ao benzeno

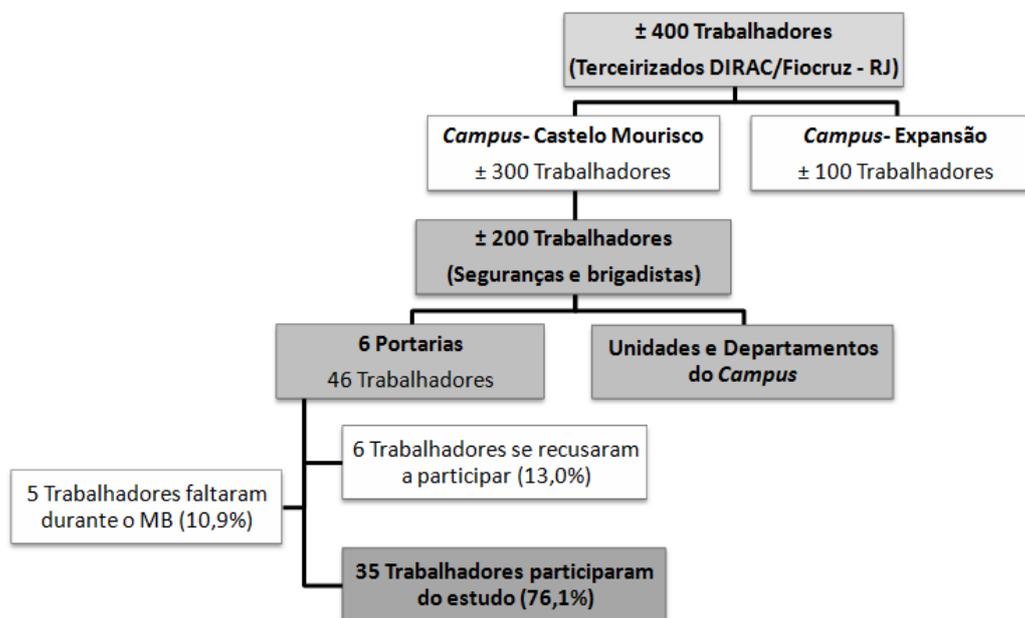
A população ambientalmente exposta ao benzeno foi composta por trabalhadores das Portarias do *Campus* - Castelo Mourisco da Fiocruz, terceirizados da DIRAC/Fiocruz, localizado na AP 3.1 do município do Rio de Janeiro. De acordo com o cadastro de funcionários da DIRAC, existem mais ou menos 400 trabalhadores terceirizados nos *Campi* Castelo Mouriscos e Expansão da Fiocruz, sendo cerca de 300 alocados no *Campus* - Castelo Mourisco. Aproximadamente 2/3 desses trabalhadores atuam como seguranças de locais fixos ou em ronda, sendo 46 trabalhadores alocados nas seis Portarias do *Campus* - Castelo Mourisco, cuja jornada de trabalho foi caracterizada por turnos de 12h, sendo divididos em diurnos e noturnos, com entrada e saída às 5h e 17h.

Seguindo o mesmo protocolo, todos os trabalhadores da população ambientalmente exposta ao benzeno foram convidados a participar da pesquisa, recebendo as devidas informações sobre a mesma, e assinaram voluntariamente o TCLE (ANEXO I). Assim como para a população ocupacionalmente exposta, o critério de inclusão foi ter idade superior a 18 anos, de ambos os sexos e aceitação em participar do estudo, através da assinatura do TCLE, sendo excluídas também mulheres grávidas. O critério de exclusão utilizado foi ter trabalhado em processos de trabalho com exposição ao benzeno. É importante ressaltar, que o trabalho nas portarias ocorrer em grande parte do tempo ao ar livre, o que caracteriza a influência da exposição ambiental. É importante ressaltar, que o *Campus* - Castelo Mourisco da Fiocruz está localizado em uma avenida de grande fluxo de carros e caminhões, sendo uma importante via de entrada e saída da cidade. Além disso, uma refinaria de petróleo está localizada ao lado do *Campus*, o que contribui para a exposição ambiental.

Todos os 46 trabalhadores das Portarias foram convidados a participar do estudo e seis (13,0%) desses recusaram o convite (Figura 13). Ademais, cinco (10,9%) trabalhadores não compareceram ao trabalho no dia do MB, totalizando a participação

de 35 trabalhadores (76,1%). A Figura 13 esquematiza em detalhes a seleção da população ambientalmente exposta ao benzeno do atual estudo.

Figura 13 - Diagrama da seleção da população ambientalmente exposta ao benzeno.



Portanto, a população ambientalmente exposta ao benzeno do atual estudo foi composta por 35 trabalhadores das 6 Portarias do *Campus* - Castelo Mourisco da Fiocruz - RJ, localizado na AP3.1 do município do Rio de Janeiro. Os 35 trabalhadores participantes correspondem a 17,5% do total de trabalhadores do *Campus* - Castelo Mourisco e a 8,8% do total de trabalhadores terceirizados nos *Campi* Castelo Mourisco e Expansão da Fiocruz - RJ.

III.4. Avaliação sociodemográfica e do processo de trabalho

A análise do processo de trabalho de ambas as populações expostas cronicamente ao benzeno foi realizada por intermédio de observação participante no ambiente de trabalho, juntamente com informações levantadas, através de um questionário individual (ANEXO II). Esse instrumento continha questões relativas a características sociodemográficas, histórico de exposição da população e identificação de possíveis fatores de confundimento, sendo um instrumento já validado pela Comissão Nacional do Benzeno e que vem sendo utilizado em inquéritos epidemiológicos e estudos-piloto sobre a exposição ao benzeno em todo o país.

Além disso, o questionário aborda questões específicas para trabalhadores de PRC, levantando informações sobre: i) procedimentos operacionais (etapas) realizados pelos frentistas durante a jornada de trabalho, quanto aos agentes de riscos inerentes ao benzeno; ii) uso dos Equipamentos de Proteção Individual e Coletivo utilizado pelos frentistas durante a jornada de trabalho; iii) fatores de riscos e os agravos à saúde decorrentes da exposição ao benzeno; iv) condições de trabalho; v) hábitos próprios dos trabalhadores, identificando outras possíveis vias de absorção; vi) ambiente de trabalho quanto aos agentes de riscos inerentes ao benzeno; vii) possíveis fontes de benzeno; e viii) possível exposição múltipla a diferentes substâncias.

III.5. Avaliação ambiental

A avaliação ambiental dos locais de trabalho foi realizada mediante a quantificação do benzeno no ar atmosférico. Essa avaliação foi realizada nos locais de trabalho (PRC e Portarias) de ambas as populações estudadas. Para a população ocupacionalmente exposta foi incluída a aplicação do questionário de avaliação do ambiente de trabalho de PRC (ANEXO III), com a participação dos gerentes de pista. Nesse questionário, foram envolvidas questões de caracterização das áreas, das operações e equipamentos utilizados nos PRC, assim como a demanda de consumo de combustíveis.

III.5.1. Indicador de exposição ambiental

Quantificação do Benzeno no ar atmosférico

A quantificação de benzeno no ar atmosférico foi realizada juntamente com a avaliação dos biomarcadores mediante a utilização de amostradores ativos. 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 benzeno, com auxílio de bombas coletoras de ar SKC (PCXR4) calibradas para vazão de $1,0 \text{ L min}^{-1}$. 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 40 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. Posteriormente, o benzeno coletado pelos amostradores foi extraído com diclorometano e determinado por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (FID), de acordo com o

método 1501 do Manual de Métodos Analíticos do *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) (NIOSH, 2003). O limite de detecção determinado para o benzeno foi de 0,68 mg.L⁻¹.

III.6. Avaliação clínica

A avaliação clínica de todos os participantes do estudo foi realizada por um médico clínico-geral no próprio local de trabalho, sendo utilizado um questionário de avaliação clínica (ANEXO IV) como roteiro. Complementarmente à avaliação clínica, exames hematológicos (hemograma completo e contagem de reticulócitos) e bioquímicos (TGP, TGO, Bilirrubina totais e frações, creatinina, GGT) foram pedidos e analisados pelo Ambulatório da ENSP/Fiocruz.

III.7. Avaliação dos biomarcadores

A avaliação dos biomarcadores de todos os participantes foi realizada por meio das análises dos biomarcadores de exposição de dose interna e dos biomarcadores de efeito de estresse oxidativo e de genotoxicidade. As análises dos biomarcadores, com exceção do EC, foram realizadas no Laboratório de Toxicologia do CESTE/IOCRUZ. O EC foi realizado no Laboratório do Professor Dr. Andrew Richard Collins vinculado ao Departamento de Nutrição da Universidade de Oslo. Os procedimentos analíticos dos biomarcadores utilizados estão descritos a seguir.

III.7.1. Biomarcador de exposição

Determinação do Ácido *trans, trans*-mucônico (ATTM)

As amostras de urina de todos os trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos foram coletadas no final da jornada de trabalho em frascos de polietileno e conservadas em freezer (-80° C) até o momento da análise. As amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo artificial, para o transporte até o laboratório. As amostras de urina coletadas foram utilizadas tanto para avaliação clínica quanto para a avaliação do biomarcador de exposição, sendo as mesmas fracionadas para as respectivas análises antes de seu armazenamento.

A determinação do ATTM foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC UV-Vis) com coluna C18 250 x 4,6 mm (tamanho de partícula = 5 micrômetros) e detecção por espectrofotômetro de absorção no UV em 264nm, de

acordo com a metodologia de Ducos et al. (1990) modificado por Costa (2001). Previamente a análise cromatográfica, as amostras de urina passam por etapa de extração em fase sólida (SPE) com resina de amina quaternária. 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; volume de amostra de 20 µL; temperatura do forno = 40 °C. A concentração das amostras foi calculada em mg/L (ppm) por regressão linear, utilizando uma curva do tipo $y = ax + b$. Os resultados foram corrigidos pela Creatinina e expressos em mg ATTM/ g Cr. O limite de detecção do ATTM determinado foi de 0,11 mg.L⁻¹.

III.7.2. Biomarcadores de efeito

Amostras sanguíneas utilizadas para a avaliação dos biomarcadores de efeito foram coletadas por profissional habilitado em 5 tubos a vácuo, sendo 3 desses contendo anticoagulante heparina sódica, 1 tubo contendo o anticoagulante EDTA e 1 tubo a vácuo sem anticoagulante. As amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo artificial para o transporte até o laboratório. O tubo com anticoagulante EDTA foi destinado às análises clínicas de hemograma completo e bioquímica. Os tubos com anticoagulante heparina foram imediatamente submetidos aos procedimentos de análise dos biomarcadores de genotoxicidade e o tubo sem anticoagulante foi destinado as análises dos biomarcadores de estresse oxidativo, utilizando-se o soro como matriz.

Alíquotas de 250 µL desse sangue total do tubo com anticoagulante heparina foram coletadas e armazenadas em freezer -80°C, sendo posteriormente utilizadas no Doutorado Sanduíche realizado na Universidade de Oslo. As amostras de sangue total armazenadas foram enviadas ao laboratório do Professor Dr. Andrew Richard Collins vinculado ao Departamento de Nutrição da Universidade de Oslo para serem utilizadas na realização do EC com uso da enzima FPG.

III.7.2.1. Biomarcadores do estresse oxidativo

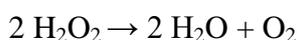
Todas as análises de estresse oxidativo utilizaram soro como matriz. Com isso, o tubo de sangue sem anticoagulante foi centrifugado a 3500 rpm por 10 min e o soro obtido foi separado em alíquotas individuais para cada análise. Estas alíquotas foram armazenadas a -80° C, em ultrafreezer, até o momento da análise. As análises laboratoriais das amostras para os biomarcadores de estresse oxidativo foram realizadas

por espectrofotometria no UV-Vis, com a utilização do espectrofotômetro Jasco V-530 (Kyoto, Japão) e Shimadzu UV-1601 (Kyoto, Japão), com leitores de microplacas Asys Expert Plus e Biotek ELx 800 (VT, EUA).

Atividade enzimática da Catalase (CAT)

A determinação da atividade da CAT em soro humano foi realizada baseando-se no método de Góth (1991), cuja quantificação da atividade da enzima CAT consiste da decomposição do H₂O₂ medida em comprimento de onda de 405nm.

Reação enzimática de decomposição



O meio reacional consistiu de 500 µL substrato de H₂O₂ 65 mM (preparado em Tampão fosfato 0,06 mol/L e pH = 7,4) + 100 µL de amostra de soro. Este meio foi incubado a 37 °C em banho-maria por 1 min. Após esse tempo, a reação foi paralisada com 500 µL de molibdato de amônio 32,4 mmol/L. Os cálculos de atividade enzimática foram realizados utilizando-se a fórmula a seguir em unidade internacional de atividade enzimática (U), que equivale a decomposição de 1 µmol de H₂O₂/min monitorada em um comprimento de onda de 405 nm.

$$\text{Atividade da catalase em soro (kU/L)} = \frac{\text{Abs (Amostra)} - \text{Abs (Branco 1)}}{\text{Abs (Branco 2)} - \text{Abs (Branco 3)}} \times 271$$

Onde,

kU = 1000 U

Branco 1: 500 µL de substrato de trabalho + 500 µL de molibdato + 100 µL de soro

Branco 2: 500 µL de substrato de trabalho + 500 µL de molibdato + 100 µL de tampão

Branco 3: 500 µL de tampão fosfato + 500 µL de molibdato + 100 µL de tampão

Atividade enzimática da Glutathione S-transferase (GST)

A determinação da atividade da GST em soro humano foi realizada baseando-se no método de Habig et al. (1974) e adaptado por Habdous et al. (2002), cuja quantificação da atividade enzimática consiste da formação do produto de reação GS-DNB, medido em comprimento de onda de 340nm, utilizando-se o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato universal.

Reação enzimática de formação



Nota:

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

GSH - Glutathiona

GS-DNB - complexo formado pela reação entre CDNB e GSH

O meio reacional foi composto por 700 μL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L (pH = 5,5) + 100 μL de CDNB 25 mM e 100 μL de GSH 50 mM. A reação foi disparada com a adição de 100 μL da amostra de soro e a formação do produto monitorada por 5 minutos. O resultado foi obtido em $\Delta\text{Abs}/\text{min}$. Os cálculos de atividade enzimática foram baseados na fórmula a seguir, utilizando a unidade internacional de atividade enzimática (U), que equivale a formação de 1 μmol de GS-DNB/min, monitorada em um comprimento de onda de 340 nm, por 300 segundos.

$$\frac{\Delta\text{Abs}/\text{min}}{\epsilon} \times \text{Volume da cubeta (final)} = \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min Am} - \Delta\text{Abs}/\text{min Br}) \times 3 \text{ mL}}{9,6}$$

Onde,

$$U = \Delta\text{Abs}/\text{min} \times 0,3125 \rightarrow (\mu\text{mol}/\text{min na cubeta})$$

$$\text{Volume de amostra} = 0,1 \text{ mL} \therefore U/\text{mL} = U \times 10 \therefore U/L = (U/\text{mL}) \times 1000$$

Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

Os kits para análise da atividade enzimática da SOD foram fornecidos pela empresa Cayman Chemical Company (Michigan, EUA), cuja quantificação baseia-se na reação de decomposição do superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), medido em comprimento de onda de 460nm.

Reação de decomposição



O meio reacional foi composto por 200 μL de detector de radicais + 10 μL de amostra de soro diluída 6x. A reação foi iniciada com 20 μL de xantina oxidase. Uma curva de calibração foi realizada com padrão de SOD. O limite de detecção determinado para atividade da SOD foi de 0,01 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os cálculos de atividade enzimática usam a regressão linear (curva do tipo $y = ax + b$) na fórmula a seguir, onde foi utilizada a

unidade internacional de atividade enzimática (U), que equivale a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da dismutação do radical superóxido:

$$\text{SOD (U/mL)} = [(\text{Abs amostra} - b/ax) \times (0,23 \text{ mL} / 0,01 \text{ mL})] \times \text{diluição da amostra}$$

Grupamento Tiol (TIOL)

A determinação da presença do grupamento tiol em soro humano foi realizada baseando-se no método de Hu (1994), cuja quantificação consiste da formação do produto de reação GS-TNB, medida em comprimento de onda de 412nm, utilizando-se o ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) como substrato universal.

Reação de formação



Nota:

DTNB - ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)

GS-TNB- complexo formado pela reação entre grupamento tiol e DTNB

O meio reacional foi composto por 1000 μL de Tampão Tris-Cl 0,25 mol/L + EDTA 0,02 mol/L + 25 μL de DTNB 0,01 mol/L + 25 μL de amostra de soro. Uma curva de calibração foi realizada com padrão de glutathiona reduzida (GSH) representando o padrão de grupamento tiol. O limite de detecção determinado para o grupamento TIOL foi de 0,18 mM. O cálculo da concentração de grupamentos tiol na amostra foi feito por regressão linear, com uso de uma curva do tipo $y = ax + b$, em mmol/L.

Malondialdeído (MDA)

A determinação da presença do MDA, produto de peroxidação de lipídeos de membrana, foi realizada utilizando-se kit fornecido pela empresa Cayman Chemical Company (Michigan, EUA), cuja quantificação baseia-se na formação do produto de reação MDA-TBA, medida em comprimento de onda de 532nm.

Reação de formação



Nota:

SDS- dodecil sulfato de sódio

TBA- ácido tiobarbitúrico

MDA-TBA- complexo formado pela reação entre MDA e TBA

O meio reacional foi composto por 1000 µL de TBA + 25 µL de SDS + 25 µL de amostra de soro. O limite de detecção determinado para a análise de MDA foi de 0,47 µM. Uma curva de calibração foi realizada com padrão de MDA. O cálculo da concentração de MDA nas amostras foi feito por regressão linear, com uso de uma curva do tipo $y = ax + b$, em µmol/L.

III.7.2.2. Biomarcadores de genotoxicidade

Ensaio Cometa (EC)

Os procedimentos detalhados a seguir foram realizados no laboratório do Professor Dr. Andrew Richard Collins vinculado ao Departamento de Nutrição da Universidade de Oslo, seguindo os protocolos determinados pela equipe do mesmo.

Preparo das células controles positivo e negativo para realização do ensaio cometa

Amostras sanguíneas foram coletadas por profissional habilitado em tubos a vácuo, contendo anticoagulante (citrato ou EDTA). O volume de sangue coletado foi misturado em igual volume de PBS e posteriormente acrescentado lentamente sobre uma camada de Lymphoprep contido em tubo falcon (50mL). Os tubos foram submetidos a centrifugação por 30 min e 700 g a temperatura ambiente. Posteriormente, o anel de linfócitos de cada tudo foi removido e transferido para outro tubo falcon contendo 30 mL de PBS. Os tubos foram centrifugados por 20 min e 700 g à temperatura ambiente, descartado o sobrenadante e as células ressuspendidas em 10 mL de PBS, para contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, os tubos foram divididos igualmente em duas porções:

A. Controle negativo (Padrão de referência)

As células foram centrifugadas por 10 min e 700 g à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. Posteriormente, 1 mL de meio de cultura foi adicionado para cada 10^6 células. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para microtubos, sendo os mesmos armazenados em freezer -80°C.

B. Controle positivo (Padrão de referência)

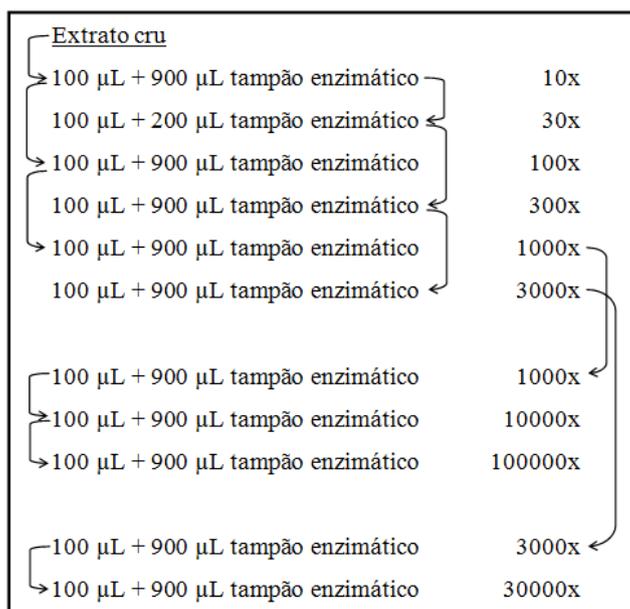
As células foram centrifugadas por 10 min e 700 g à temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensado em 1 mL de PBS com 0,5 μM do agente oxidante Ro 19-8022. As células foram submetidas a irradiação por 5 min à uma distância de 33 cm da lâmpada de halogênio. Finalizado o tratamento, as células foram centrifugadas por 10 min e 700 g à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. Posteriormente, 1 mL de meio de cultura foi adicionado para cada 10^6 células e alíquotas de 100 μL foram transferidas para microtubos, sendo os mesmos armazenados em freezer -80°C .

As células de linfócitos padrão de referência (controles positivo e negativo) foram utilizadas na determinação da concentração ótima da solução da enzima FPG e nas análises das amostras, assim como, nos demais testes realizados.

Determinação da concentração ótima da solução da enzima FPG

Um tubo contendo 1 mL extrato cru da enzima FPG, previamente preparado por meio de cultura de *Escherichia Coli* foi utilizado para diluição. As diluições, a partir de seu extrato cru, foram realizadas seguindo o esquema da Figura 14. As diversas diluições foram realizadas em triplicata.

Figura 14 - Esquema de diluição da enzima FPG a partir do seu extrato cru.



As soluções diluídas de FPG 300x, 1000x, 3000x, 10000x, 30000x e 100000x foram preparadas e utilizadas na realização da determinação da concentração ótima da solução da enzima FPG. Para tanto, as células de padrão de referência (controle positivo e controle negativo) foram tratadas com as respectivas soluções durante a realização do teste de EC.

Ensaio Cometa usando enzima FPG

O teste de EC foi padronizado para uso em amostras de sangue total ou de linfócitos isolados armazenadas em freezer -80°C ou nitrogênio líquido. Todas as amostras celulares utilizadas nos experimentos foram descongeladas e deixadas em gelo até o momento de sua utilização.

Preparo das células em agarose

A. Amostras de sangue total

As amostras de sangue total foram utilizadas, após o seu descongelamento, diluindo 5 µL de sangue total diretamente em 270 µL de solução de agarose baixo ponto de fusão (BPF) à 1% ou diluindo o *pellet* formado por células sanguíneas, após três sucessivas lavagens com PBS, em 125 µL de solução de agarose BPF à 1%. Em seguida, alíquotas de 5 µL das células suspensas em agarose BPF foram adicionadas às lâminas previamente cobertas com agarose ponto de fusão padrão. O processo de lavagem das células sanguíneas com PBS correspondeu, inicialmente, na diluição de 5 µL de sangue total em 45 µL de PBS com subsequente centrifugação a 1500 rpm por 7 min. O *pellet* formado foi ressuspenso em 45 µL de PBS e submetido à segunda centrifugação seguindo as mesmas condições. Por fim, mais uma lavagem foi realizada nas mesmas condições e o *pellet* formado utilizado na diluição com solução de agarose BPF (1%).

B. Amostras de linfócitos isolados

As amostras de linfócitos isolados dos padrões de referência (controles positivo e negativo) foram inicialmente descongeladas em gelo e transferidas para um tubo falcon (10 mL) contendo 3 mL de PBS e centrifugadas a 1500 rpm por 7 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 300 µL de PBS. Uma alíquota de 30 µL dessas células suspensas em PBS foi misturada a 140 µL

de agarose BPF. Posteriormente, 5 μ L das células suspensas em agarose BPF foram adicionadas sobre lâminas previamente cobertas com agarose ponto de fusão padrão.

Procedimento

Após a aplicação dos géis (células suspensas em agarose BPF), as lâminas foram deixadas em geladeira (4°C) por 5 min e em seguida imersas em solução de lise celular [NaCl 2,5 M; EDTA 0,1 M; Tris 10 mM; Triton 1% e pH 10] por pelo menos 1 h. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3x com tampão enzimático à 4 °C em recipiente coplin por 5 min e acrescentadas ao sistema de incubação, para incubação das células com a enzima endonuclease FPG ou tampão enzimático [HEPES 40 mM; KCl 0,1 M; EDTA 0,5 mM; BSA 0,2 mg/mL; pH 8,0]. A base da câmara de incubação proporciona trabalhar com 12-géis por lâmina. O sistema de incubação contém um suporte base de aço inox, onde se encaixa a lâmina que foi utilizada para aplicação das amostras e controles (12-géis). Sobre a lâmina se acrescenta uma borracha que fixa os poços circunscrevendo cada gel de amostra acrescentado à lâmina. Em seguida, o sistema foi coberto com uma tampa de acrílico e fixado com duas braçadeiras. Em cada poço, onde estavam localizados cada gel, foram adicionados 30 μ L de tampão enzimático ou solução contendo enzima FPG [tampão enzimático com FPG em concentração determinada experimentalmente]. As imagens desse sistema de incubação estão demonstradas na Figura 15.

Figura 15 - Sistema de incubação da técnica de ensaio cometa com FPG para 12 géis por lâmina.



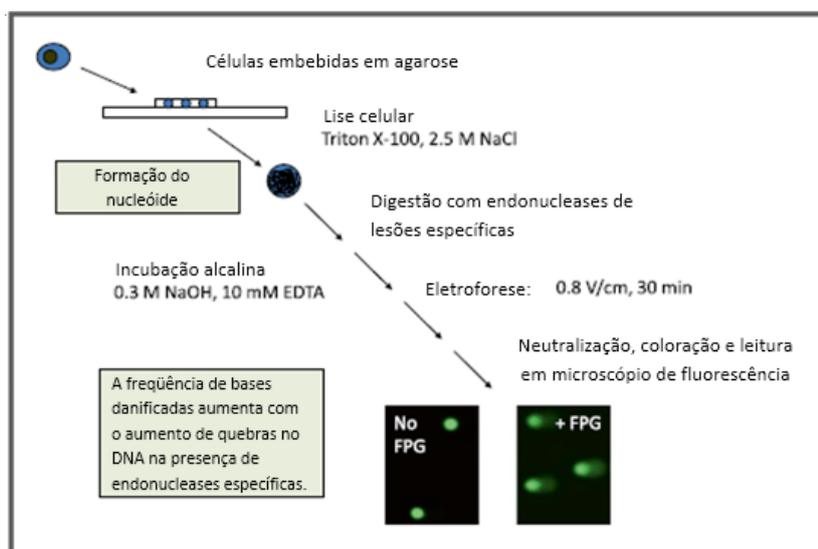
Posteriormente, o sistema de incubação foi transferido para uma câmara úmida à 37 °C e deixado por 30 min. Finalizada a incubação, a reação enzimática foi paralisada colocando o sistema de incubação sobre o gelo. Em seguida, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese. E previamente à eletroforese, as lâminas foram

mantidas em tampão alcalino por 25 min. As condições de eletroforese foram fixadas em 25 volts e corrente de 300 mA.

Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas 3x com PBS à 4°C em recipiente coplin por 5 min, seguido de imersão etanol PA à 4°C por 5 min e deixadas a temperatura ambiente para secagem. Para revelação, as lâminas foram imersas por aproximadamente 30 min em solução contendo SYBRGold (diluído 10000x) e, por fim lavadas 3x com água e colocadas à temperatura ambiente para secagem.

Os cometas foram visualizados em microscópio de fluorescência a um aumento de 40x utilizando o sistema de análise de imagens *Comet Assay IV* e os resultados expressos em intensidade da cauda ou % de DNA na cauda (*tail intensity*). O esquema metodológico do teste de EC utilizando a enzima endonuclease FPG está ilustrado na Figura 16. Os resultados das digestões com tampão enzimático e com enzima FPG foram comparados para a expressão dos resultados.

Figura 16 - Esquema metodológico do teste de EC utilizando enzima endonuclease FPG.



Fonte: Adaptada de AZQUETA, et al 2013.

Como para se realizar o teste de EC com FPG, as células analisadas passam por dois tipos de tratamento, ou seja, tratamento com tampão enzimático e tratamento com tampão enzimático mais a enzima FPG, os resultados de EC foram apresentados nas variáveis tampão enzimático (EC-Tampão), tampão enzimático mais a FPG (EC-FPG) e diferença entre EC-FPG e EC-Tampão (EC-Dif).

Aberrações cromossômicas (AC)

Toda a metodologia para o teste de AC foi realizada a partir de cultura celular de linfócitos de sangue periférico. Os linfócitos em cultura serão estimulados a entrar em divisão celular com fitohemaglutinina de acordo com a técnica de Moorhead et al. (1960) adaptada. Desta forma, o teste de AC consistiu na preparação de cultura celular obtida com alíquotas de 0,5 mL de sangue periférico total humano acrescido de 5mL de meio de cultura RPMI, já enriquecido com fitohemaglutinina e soro fetal bovino. Em seguida, os linfócitos foram incubados a 37 °C e após 48 horas, a divisão celular foi interrompida na etapa de metáfase com a adição de colchicina por 2 horas. Posteriormente à incubação, as células são tratadas com soluções hipotônica e fixadora, de modo a garantir uma suspensão límpida contendo apenas linfócitos em metáfase. Para a visualização das metáfases, essa suspensão foi distribuída em seis lâminas a serem analisadas e lidas em microscópio ótico com o auxílio do programa Metafer 4[®].

As metáfases foram quantificadas e a frequência de aberrações analisada, tendo como meta mínima a leitura de 100 células em metáfase por indivíduo, de forma a assegurar representatividade, de acordo com Carrano e Natarajan (1987). Entretanto, apesar da meta mínima estabelecida de 100 metáfases lidas por indivíduo, este valor não pôde ser alcançado em alguns sujeitos, fato que pode ser explicado pela complexidade das etapas do processo, baixo índice mitótico e por dificuldades do cumprimento, de forma homogênea, de todo o protocolo ao longo de todas as coletas. Os valores encontrados foram comparados entre os grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

III.8. Análise estatística

A análise descritiva foi realizada utilizando médias, desvios padrão, frequência e percentual de distribuição. A normalidade de 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 (*rho*) foram realizados para as variáveis contínuas com distribuição normal e não normal, respectivamente. As variáveis sexo, idade, tabagismo e etilismo foram utilizadas como variáveis controle. Testes de regressão linear foram realizados entre o

biomarcador de exposição ATTM e os biomarcadores de efeito de estresse oxidativo e de genotoxicidade. As variáveis sexo e idade foram utilizadas como variáveis controle. Todos os dados foram analisados com auxílio do programa SPSS for Windows versão 20.0.

III.9. Aspectos éticos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da ENSP (Parecer CEP/ENSP 434.418 e CAAE 17438013.5.0000.5240).

IV. RESULTADOS

Participaram do estudo 86 trabalhadores, sendo 51 oriundos dos PRC localizados na AP5.3 e 35 trabalhadores das Portarias do *Campus* -Castelo Mourisco da Fiocruz localizada na AP3.1, os quais foram categorizados em ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno, respectivamente. As características sociodemográficas das populações ocupacionalmente e ambientalmente expostas ao benzeno estão apresentadas na Tabela 2 e a frequência das questões referentes ao histórico familiar de neoplasias, tabagismo e etilismo na Tabela 3. Além disso, a descrição dos resultados de idade e tempo de trabalho na atual ocupação está apresentada separadamente na Tabela 4.

Tabela 2 - Frequência dos dados sociodemográficos dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Variáveis	Grupos de trabalhadores			
	Ocupacionalmente expostos		Ambientalmente expostos	
	N	%	N	%
Gênero				
Masculino	43	84,3	29	82,9
Feminino	8	15,7	6	17,1
Grupo étnico				
Branco	14	29,2	4	12,5
Negro	13	27,1	7	21,9
Pardo	20	41,7	21	65,6
Indígena	1	2,1	-	-
Situação conjugal				
Casado/união estável	32	62,7	24	82,8
Separado/divorciado	1	2,0	1	3,4
Solteiro	18	35,3	4	13,8
Escolaridade				
Fundamental Incompleto	6	11,8	3	10,3
Fundamental Completo	9	17,6	3	10,3
Médio Incompleto	16	31,4	4	13,8
Médio Completo	17	33,3	18	62,1
Superior Incompleto	3	5,9	1	3,4

Nota: DP = Desvio Padrão.

A população ocupacionalmente exposta ao benzeno foi composta de 84,3% de homens e 15,7% de mulheres com idade média total de 35 ± 11 anos, sendo 37 ± 11 e 29 ± 7 anos para homens e mulheres, respectivamente. A maioria dos entrevistados relatou fazer uso de bebida alcoólica (70,6%; $n = 36$) e não fumar (62,0%, $n = 31$). De acordo com os relatos sobre as funções ocupacionais exercidas, 72,5% ($n = 37$) dos

trabalhadores possuíam 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. Nenhum equipamento de proteção individual ou coletiva foi relatado como sendo utilizado durante a jornada de trabalho, inclusive durante o recebimento de combustíveis e seus respectivos testes de qualidade, que correspondem as atividades de maior exposição.

Por sua vez, a população ambientalmente exposta ao benzeno foi formada por 82,9% de homens e 17,1% de mulheres com idade média total de 43 ± 9 anos, correspondendo a 44 ± 9 anos para os homens e 39 ± 9 anos para as mulheres. A maioria da população declarou não fumar (57,1%) enquanto que metade relatou fazer uso de bebida alcoólica (50,0%). Com relação às funções ocupacionais, 96,6% (n = 28) dos trabalhadores exerciam a função de vigilantes e 3,4% (n = 1) de porteiros. Não foram observadas diferenças entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno para as respectivas características populacionais.

Tabela 3 - Frequência das informações sobre doenças crônicas, histórico familiar de neoplasias, tabagismo e etilismo dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Variáveis	Grupos de trabalhadores			
	Ocupacionalmente expostos		Ambientalmente expostos	
	N	%	N	%
Hipertensão arterial				
Sim	6	11,8	6	21,4
Não	45	88,2	22	78,6
Diabetes				
Sim	2	3,9	3	10,7
Não	49	96,1	25	89,3
Histórico familiar de câncer				
Sim	17	33,3	11	39,3
Não	34	66,7	17	60,7
Tabagismo				
Tabagista	10	20,0	6	21,4
Ex-tabagista	9	18,0	6	21,4
Nunca fumou	31	62,0	16	57,1
Etilismo				
Bebe	36	70,6	14	50,0
Bebia	3	5,9	3	10,7
Nunca bebeu	12	23,5	11	39,3

Tabela 4 - Descrição das médias de idade e tempo de trabalho na atual ocupação dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Grupos de trabalhadores	Idade e tempo de trabalho (anos)				
	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
Ocupacionalmente expostos					
Idade	51	35	11	17	62
Com que idade começou a trabalhar neste setor?	50	24	8	10	43
Há quanto tempo trabalha nesta ocupação?	51	7	9	0	34
Ambientalmente expostos					
Idade	35	43	9	22	59
Com que idade começou a trabalhar neste setor?	26	15	3	19	22
Há quanto tempo trabalha nesta ocupação?	29	12	8	0	29

Nota: DP = Desvio Padrão.

Os resultados das concentrações de benzeno no ar atmosférico categorizados por locais de trabalho dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos, estão apresentados na Tabela 5. Esses resultados também estão demonstrados por percentis de 25, 50, 75 e 95 na Tabela 6.

Tabela 5 - Média das concentrações de benzeno no ar atmosférico nos locais de trabalho dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos.

Locais de trabalho dos grupos de trabalhadores	Avaliação Ambiental				
	Benzeno no ar atmosférico ($\mu\text{g m}^{-3}$)				
	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
Ocupacionalmente expostos					
Posto 1	6	12,1*	13,6	\leq LD	29
Posto 2	7	\leq LD*•	-	\leq LD	\leq LD
Posto 3	10	22,1 [£] •	32,1	\leq LD	94
Posto 4	11	103,4	179,7	\leq LD	564
Posto 5	5	\leq LD	-	\leq LD	\leq LD
Posto 6	6	\leq LD [£]	-	\leq LD	\leq LD
Posto 7	-	-	-	-	-
TOTAL	45	31,8	96,6	\leq LD	564
Ambientalmente expostos					
Portaria 1	3	48,7	84,3	\leq LD	146
Portaria 2	4	45,0	90,0	\leq LD	180
Portaria 3	4	\leq LD	-	\leq LD	\leq LD
Portaria 4	4	\leq LD	-	\leq LD	\leq LD
Portaria 5	4	34,3	68,5	\leq LD	137
Portaria 6	2	\leq LD	-	\leq LD	\leq LD
TOTAL	21	22,1	55,8	\leq LD	180

Nota: DP = Desvio Padrão; N = número total de amostras coletadas; $p = p$ -valor (p -valor), [*•£ $p < 0.05$].

Tabela 6 - Concentrações de benzeno no ar atmosférico, em percentil, nos locais de trabalho dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos.

Locais de trabalho dos grupos de trabalhadores	Avaliação ambiental				
	Benzeno no ar atmosférico ($\mu\text{g m}^{-3}$)				
	N	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75	Percentil 95
Ocupacionalmente expostos	45	0,05	0,05	18,0	247,6
Ambientalmente expostos	21	0,05	0,05	0,05	176,6

Nota: N = número total de amostras coletadas.

A distribuição das concentrações de benzeno no ar atmosférico não se apresentou normal, por isso testes estatísticos não paramétricos foram utilizados na comparação dos grupos. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas para as concentrações de benzeno no ar atmosférico entre o Posto 2 e os Postos 1 e 3 e entre os Postos 3 e 6. Com relação às concentrações de benzeno no ar atmosférico entre as Portarias, nenhuma diferença foi encontrada. Além disso, não houve diferença de concentração de benzeno no ar atmosférico entre os grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos.

A avaliação da exposição desses trabalhadores também foi realizada por meio da análise do biomarcador de exposição ATTM, que corresponde a um dos metabólitos do benzeno eliminados na urina. Os resultados de ATTM podem ser observados na Tabela 7. Além disso, os resultados de ATTM apresentaram distribuição não normal, sendo necessário a logaritimização (LnATTM) do mesmo para as análises. Os valores médios de ATTM encontrados foram de $0,23 \pm 0,18 \text{ mg/g Cr}$ e $0,21 \pm 0,16 \text{ mg/g Cr}$ para os respectivos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno, não sendo observada diferença estatística entre os mesmos. Entretanto, o ATTM apresentou valores estatisticamente diferentes entre os trabalhadores do Posto 1 e do Postos 3 ($p = 0,14$). Os valores de ATTM dos trabalhadores ambientalmente expostos ao benzeno não apresentaram nenhuma diferença estatística entre as diferentes Portarias (Tabela 7).

Os resultados das concentrações de ATTM dos trabalhadores também foram demonstrados por percentis de 25, 50, 75 e 95, sendo observada uma homogeneidade nos resultados entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno (Tabela 8). Além disso, os resultados de ATTM também foram comparados entre as categorias da variável tabagismo (nunca fumou, ex-tabagista e tabagista), cujos

resultados estão apresentados na Tabela 9. Foi observada diferença estatística das concentrações de ATTM entre as categorias nunca fumou e tabagista ($p = 0,034$) para o grupo de trabalhadores ocupacionalmente expostos ao benzeno. Para o grupo de trabalhadores ambientalmente expostos ao benzeno, nenhuma diferença foi encontrada.

Tabela 7 - Média das concentrações de ATTM dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Grupos de trabalhadores	Biomarcador de exposição ATTM (mg/g Cr)				
	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
Ocupacionalmente expostos					
Posto 1	7	0,44*	0,34	0,12	1,00
Posto 2	7	0,15	0,08	0,06	0,25
Posto 3	10	0,13*	0,04	0,08	0,19
Posto 4	9	0,21	0,17	0,07	0,51
Posto 5	3	0,15	0,14	0,06	0,31
Posto 6	2	0,23	0,12	0,14	0,31
Posto 7	13	0,25	0,13	0,06	0,51
TOTAL	51	0,23	0,18	0,06	1,00
Ambientalmente expostos					
Portaria 1	8	0,33	0,17	0,09	0,56
Portaria 2	7	0,26	0,21	0,09	0,68
Portaria 3	5	0,28	0,16	0,09	0,52
Portaria 4	6	0,09	0,01	0,09	0,09
Portaria 5	8	0,12	0,05	0,09	0,25
Portaria 6	1	0,11	-	0,11	0,11
TOTAL	35	0,21	0,16	0,09	0,68

Nota: Resultados em mg/g Cr; Cr = creatinina; DP = Desvio Padrão; $p = p$ -valor (p -valor), [$* p < 0,05$], sendo * referente à diferença estatística entre os Postos 1 e 3.

Tabela 8 - Concentrações de ATTM, por percentil, dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Grupos de trabalhadores	Biomarcador de exposição ATTM (mg/g Cr)				
	N	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75	Percentil 95
Expostos ocupacionalmente	51	0,09	0,16	0,30	0,63
Expostos ambientalmente	35	0,09	0,13	0,26	0,58
TOTAL	86	0,09	0,15	0,28	0,55

Tabela 9 - Média das concentrações de ATTМ dos grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente exposto ao benzeno, de acordo com a categoria tabagismo.

Grupos de trabalhadores	Biomarcador de exposição				
	ATTМ (mg/g Cr)				
	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
Ocupacionalmente expostos					
Nunca fumou	28	0,21*	0,19	0,06	1,00
Ex-tabagista	8	0,21	0,10	0,11	0,39
Tabagista	10	0,35*	0,21	0,13	0,82
Ambientalmente expostos					
Nunca fumou	10	0,29	0,19	0,07	0,56
Ex-tabagista	4	0,24	0,09	0,11	0,32
Tabagista	3	0,18	0,06	0,15	0,25

Nota: Resultados em mg/g Cr; Cr = creatinina; DP = Desvio Padrão. [* $p < 0,05$], sendo * referente à diferença estatística entre os trabalhadores que nunca fumaram e os tabagistas.

Com relação à avaliação clínica, os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. Com o objetivo de se visualizar detalhadamente possíveis alterações nos valores de leucócitos, seus resultados foram agrupados por faixas de concentração e destacados na Tabela 12. Do total de trabalhadores do estudo, 15% ($n = 13$) apresentaram resultados de leucócitos ligeiramente menores que 4.500 células/mm³. Esses trabalhadores foram orientados a repetir os exames clínicos após 6 meses. Não houve diferença dos dados clínicos entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno, para os exames hematológicos e bioquímicos. Correlações positivas, por Pearson, foram observadas entre a concentração de ATTМ e os dados clínicos número de leucócitos totais ($R = + 0,275$, $p = 0,020$) e segmentados ($R = + 0,272$, $p = 0,022$). Entretanto, correlações parciais não permaneceram quando corrigidas pelas variáveis idade, sexo, tabagismo e etilismo.

Os resultados das análises dos biomarcadores do estresse oxidativo estão descritos nas Tabelas 13. Dentre os biomarcadores do estresse oxidativo, somente a SOD apresentou distribuição normal. Os biomarcadores TIOL e MDA tiveram seus resultados diferentes estatisticamente entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno. A atividade da GST apresentou correlações negativas, por Spearman, com a CAT ($R = - 0,387$, $p = 0,0001$) e a SOD ($R = - 0,390$, $p = 0,0001$) e positiva com o MDA ($R = + 0,369$, $p = 0,001$). Por sua vez, a atividade da

SOD apresentou correlação negativa, por Spearman, com o MDA ($R = -0,226$, $p = 0,046$). Porém, ao se corrigir pelas variáveis idade, sexo, tabagismo e etilismo, as correlações parciais observadas foram entre a atividade de GST e as concentrações de ATTM ($R = +0,422$, $p = 0,005$); e entre a atividade da SOD e o TIOL ($R = +0,399$, $p = 0,008$).

Tabela 10- Descrição dos resultados hematológicos da avaliação clínica dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Grupos de trabalhadores	Avaliação Clínica				
	Exames hematológicos				
	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
Ocupacionalmente expostos					
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
Ambientalmente expostos					
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.

Tabela 11 - Descrição dos resultados bioquímicos da avaliação clínica dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Grupos de trabalhadores	Avaliação Clínica				
	Exames bioquímicos				
	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
Ocupacionalmente expostos					
Transaminase Oxalacética (U/L)	51	31,2	17,0	13	119
Transaminase Pirúvica (U/L)	50	28,7	33,3	8	228
Bilirrubina Total (mg/dL)	38	0,4	0,3	0	1,7
Bilirrubina Direta (mg/dL)	38	0,1	0,1	0,03	0,5
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	38	0,3	0,2	0,05	1,3
Gama GT (U/L)	51	42,4	33,1	6	130
Fator Reumatoide (UI/mL)	34	1,3	0,5	0,3	2,3
Ambientalmente expostos					
Transaminase Oxalacética (U/L)	34	22,6	9,3	8	45
Transaminase Pirúvica (U/L)	35	28,3	20,0	5	97
Bilirrubina Total (mg/dL)	35	0,4	0,2	0,1	1,0
Bilirrubina Direta (mg/dL)	35	0,1	0,1	0,01	0,3
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	35	0,3	0,1	0,09	0,7
Gama GT (U/L)	35	43,7	37,1	11	177
Fator Reumatoide (UI/mL)	35	1,2	0,6	0,2	4,0

Nota: DP = Desvio Padrão.

Tabela 12 - Resultado dos valores de leucócitos agrupados por faixas de concentração dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Grupos de trabalhadores	Avaliação Clínica					
	Leucócitos (cel/mm ³)					
	N	%	Média	DP	Mínimo	Máximo
Ocupacionalmente expostos						
Até 4.500	6	11,76	3.856	626,1	3.121	4.470
4.501 a 5.000	4	7,84	4.768	180,9	4.587	4.950
5.001 a 5.500	9	17,65	5.245	148,7	5.070	5.490
5.501 a 6.000	4	7,84	5.680	118,6	5.570	5.848
Acima de 6.000	28	54,90	7.877	1297,1	6.168	10.690
TOTAL	51	100	6.523	1852,5	3.121	10.690
Ambientalmente expostos						
Até 4.500	7	20,00	4.046	313,9	3.620	4.390
4.501 a 5.000	2	5,71	4.745	134,4	4.650	4.840
5.001 a 5.500	4	11,43	5.250	120,0	5.150	5.390
5.501 a 6.000	2	5,71	5.945	77,8	5.890	6.000
Acima de 6.000	20	57,14	7.590	1215,3	6.020	10.340
TOTAL	35	100	6.357	1773,5	3.620	10.340

Nota: DP = Desvio Padrão.

Tabela 13 - Resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Grupos de trabalhadores	Avaliação Biológica										
	Biomarcadores do estresse oxidativo										
	N	CAT (kU/L)		GST (U/L)		TIOL (mM)		MDA (µM)		SOD (U/mL)	
Média		DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Ocupacionalmente expostos											
Posto 1	7	40,66	23,96	32,23	7,19	0,42	0,05	2,79	0,49	1,60	0,71
Posto 2	7	40,98 [£]	17,32	14,35	1,55	0,33	0,06	2,90	1,16	1,21	1,00
Posto 3	10	69,37 [£]	50,97	8,95	3,36	0,48	0,11	5,92	7,06	3,09	1,25
Posto 4	9	34,26	24,42	12,12	4,01	0,37	0,08	1,28	0,81	2,09	0,62
Posto 5	3	29,08	15,35	10,49	2,19	0,40	0,05	1,56	0,83	2,60	0,89
Posto 6	2	51,68	6,86	11,76	4,31	0,25	0,06	1,17	0,29	2,17	0,54
Posto 7	13	29,06	27,76	34,04	27,85	0,42	0,20	11,79	3,99	1,18	0,83
TOTAL	51	41,99	32,89	20,04	17,84	0,40*	0,13	5,39•	5,53	1,90	1,13
Ambientalmente expostos											
Portaria 1	8	40,12	19,89	11,59	5,94	0,45	0,54	1,36	0,60	1,12	0,77
Portaria 2	7	34,03	9,97	13,78	3,53	0,47	0,04	1,26	0,45	2,42	1,28
Portaria 3	5	37,94	21,94	11,50	2,11	0,46	0,03	1,38	0,45	2,45	0,77
Portaria 4	6	42,55	13,74	12,97	4,67	0,42	0,07	1,39	1,39	2,44	0,86
Portaria 5	8	42,25	7,71	16,31	3,94	0,46	0,05	1,11	0,79	1,83	0,62
Portaria 6	1	28,54	-	12,43	-	0,44	-	1,17	-	1,09	-
TOTAL	35	39,16	14,46	13,35	4,45	0,45*	0,05	1,29•	0,73	1,95	0,99

Nota: DP = Desvio Padrão; [*•£] $p < 0.05$, sendo * referente à diferença estatística do indicador TIOL entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno;

• referente à diferença estatística do indicador MDA entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno; e £ referente à diferença estatística do indicador CAT entre os Posots 2 e 3.

Em relação aos dados clínicos, a enzima CAT apresentou correlações positivas, por Spearman, com os números de basófilos ($R = + 0,208$, $p = 0,054$) e segmentados ($R = + 0,218$, $p = 0,044$) e uma correlação negativa com bastonetes ($R = - 0,289$, $p = 0,007$). Correlações também foram observadas entre a GST e os dados clínicos CHGM ($R = - 0,478$, $p = 0,0001$), bastonetes ($R = + 0,512$, $p = 0,0001$) e transaminase oxalacética ($R = + 0,312$, $p = 0,004$); entre o TIOL e os eosinófilos ($R = + 0,225$, $p = 0,037$) e a hemoglobina ($R = + 0,232$, $p = 0,032$); e entre o MDA e os bastonetes ($R = + 0,607$, $p = 0,0001$), basófilos ($R = + 0,366$, $p = 0,001$), monócitos ($R = + 0,220$, $p = 0,005$), segmentados ($R = - 0,265$, $p = 0,018$), transaminase oxalacética ($R = + 0,315$, $p = 0,005$), HGM ($R = - 0,272$, $p = 0,027$), e CHGM ($R = - 0,601$, $p = 0,0001$). Entretanto, quando controladas por sexo, idade, tabagismo e etilismo, as correlações parciais observadas foram entre a CAT e hemácias ($R = + 0,524$, $p = 0,0001$), basófilos ($R = + 0,426$, $p = 0,004$), plaquetas ($R = + 0,425$, $p = 0,004$), transaminase pirúvica ($R = + 0,352$, $p = 0,021$), VGM ($R = - 0,468$, $p = 0,002$), HGM ($R = - 0,494$, $p = 0,001$) e CHGM ($R = - 0,397$, $p = 0,008$); entre a GST e basófilos ($R = + 0,506$, $p = 0,001$); e entre o TIOL e eosinófilos ($R = + 0,406$, $p = 0,007$). Por fim, os resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo também foram comparados entre as categorias (Nunca fumou, Tabagista e Ex-tabagista) da variável tabagismo não sendo encontrada nenhuma diferença entre os grupos.

Os resultados do teste de AC entre os grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno, divididos em quatro tipos de variáveis diferentes, estão demonstrados nas Tabelas 14. As quatro variáveis utilizadas para analisar os efeitos da exposição ao benzeno foram: - Metáfases com AC (%), que corresponde à fração de células em metáfase que apresentaram ao menos uma aberração, cromatídica ou cromossômica, a cada 100 células analisadas (células aberrantes); - Quebras por metáfase (%), que representa o valor médio de quebras cromatídicas e cromossômicas observadas a cada 100 células metafásicas analisadas; - Fragmentos, que corresponde ao número de fragmentos observados a cada 100 células metafásicas analisadas; e - Metáfases com segregação centromérica prematura (SCP), que constitui o número médio de células metafásicas com SCP.

Os resultados das quatro variáveis de AC não apresentaram distribuição normal, entretanto, as variáveis metáfases com AC e quebras por metáfase puderam ser logaritimizadas. Diferenças entre as médias de Quebras por metáfase, Fragmentos e Metáfase com SPC foram encontradas quando comparados os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno (Tabela 14).

Tabela 14 - Resultados do teste de AC dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Grupos de trabalhadores	Avaliação Biológica								
	Aberrações Cromossômicas								
	N	Metáfases com AC		Quebras por metáfase		Fragmentos		Metáfases com SCP	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Ocupacionalmente expostos									
Posto 1	7	48	47	6	4	8	5	2	4
Posto 2	10	27	23	6	6	11	10	0	0
Posto 3	7	155	250	15	22	28	43	5	8
Posto 4	3	63	48	4	5	8	8	1	1
Posto 5	9	240	162	18	10	33	18	3	1
Posto 6	2	11	1	0	0	0	0	0	0
Posto 7	13	27	39	2	3	2	2	2	3
TOTAL	51	73	132	7*	11	12•	22	2⁰	4
Ambientalmente expostos									
Portaria 1	8	82	68	1	2	3	3	3	3
Portaria 2	7	127	201	1	1	2	2	2	2
Portaria 3	5	76	47	1	1	1	1	3	2
Portaria 4	6	39	40	1	1	2	3	2	3
Portaria 5	8	47	40	3	5	6	9	3	3
Portaria 6	1	2	-	0	-	0	-	2	-
TOTAL	35	72	100	1*	3	3•	5	3⁰	3

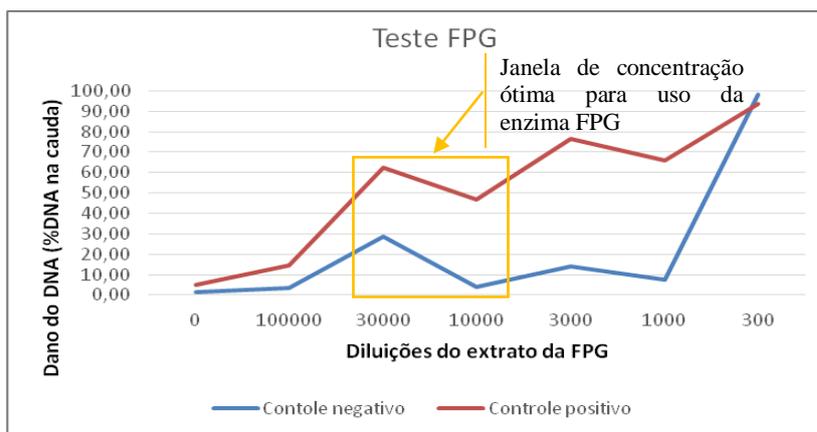
Nota: DP = Desvio Padrão; [^{*}•⁰ $p < 0.05$], sendo * referente à diferença estatística dos resultados de Quebras por metáfase entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno; • referente à diferença estatística dos resultados de Fragmentos entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno; e ⁰ referente à diferença estatística dos resultados de Metáfases com SCP entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Quando comparados os resultados das variáveis de AC com as categorias (Nunca fumou, Tabagista e Ex-tabagista) da variável tabagismo, diferenças foram encontradas entre os trabalhadores que nunca fumaram e os tabagistas, cujas médias foram 34 ± 36 e 82 ± 132 para Metáfases com AC; 2 ± 3 e 6 ± 12 para Quebra por metáfase; 3 ± 5 e 11 ± 22 para Fragmentos e 1 ± 1 e 3 ± 4 Metáfases com SCP, respectivamente.

O número de Metáfases com AC apresentou correlações, por Spearman, com a GST ($R = -0,368$, $p = 0,0001$), com os números de leucócitos totais ($R = +0,292$, $p = 0,006$) e com os números de neutrófilos ($R = +0,237$, $p = 0,028$). Uma correlação positiva, por Spearman, também foi encontrada entre Metáfases com SPC e o TIOL ($R = +0,244$, $p = 0,023$). Porém, quando controladas por sexo, idade, tabagismo e etilismo, as correlações parciais encontradas foram entre Metáfases com AC e a atividade da SOD ($R = +0,373$, $p = 0,015$); e entre o TIOL e os biomarcadores Metáfases com AC ($R = +0,409$, $p = 0,007$), Quebras por metáfase ($R = +0,330$, $p = 0,033$), Fragmentos ($R = +0,352$, $p = 0,022$) e Metáfases com SCP ($R = +0,426$, $p = 0,005$).

Para a realização do teste de genotoxicidade EC com uso da enzima FPG, foi realizada previamente a verificação da concentração ótima da endonuclease FPG que seria utilizada nas análises. As soluções diluídas de FPG em 300x, 1000x, 3000x, 10000x, 30000x e 100000x foram utilizadas no teste e seus resultados, expressos em porcentagem de DNA na cauda (% DNA na cauda), estão ilustrados na Figura 17.

Figura 17 - Resultados do teste de EC para verificação da concentração ótima da enzima de restrição FPG.



Após análise dos resultados, foi observada a janela de concentração ótima para uso da enzima de restrição FPG como sendo entre 30000x e 10000x (Figura 17). Com isso, a concentração da enzima estabelecida para a aplicação do teste de EC nas amostras foi de 20000x a partir do extrato cru inicial. Dentre as variáveis dos resultados do EC, o resultado de EC-Tampão apresentou distribuição normal. Os resultados de EC nas populações de estudo estão apresentados na Tabela 15. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno, entretanto diferenças foram encontradas entre o Posto 7 e os Postos 4 e 2 para os resultados de EC-Tampão e EC-FPG; e entre os Postos 1 e 2 para os resultados de EC-FPG.

Com relação aos dados clínicos avaliados, o EC-Tampão e o EC-FPG apresentaram correlações negativas, por Spearman, com hemácias ($R = -0,299$, $p = 0,005$ e $R = -0,285$, $p = 0,008$); hematócrito ($R = -0,341$, $p = 0,001$ e $R = -0,335$, $p = 0,002$); bastonetes ($R = -0,390$, $p = 0,0001$ e $R = -0,370$, $p = 0,0001$); linfócitos ($R = -0,310$, $p = 0,004$ e $R = -0,233$, $p = 0,032$); e transaminase oxalacética ($R = -0,344$, $p = 0,001$ e $R = -0,290$, $p = 0,008$). Por sua vez, correlações positivas, por Spearman, foram observadas entre a concentração de HGM e os resultados de EC-Tampão ($R = +0,337$, $p = 0,002$), EC-FPG

($R = + 0,379$, $p = 0,0001$) e EC-Dif ($R = + 0,225$, $p = 0,037$). Porém, quando controladas por sexo, idade, tabagismo e etilismo, essas correlações não permaneceram. Com relação aos biomarcadores de estresse oxidativo, o EC-Tampão apresentou correlações negativas, por Spearman, com a GST ($R = - 0,254$, $p = 0,018$) e o MDA ($R = - 0,432$, $p = 0,0001$); o EC-FPG, também, com a GST ($R = - 0,279$, $p = 0,010$) e o MDA ($R = - 0,367$, $p = 0,001$); e o EC-Dif com o TIOL ($R = - 0,229$, $p = 0,034$). Essas correlações também não permaneceram quando controladas por sexo, idade, tabagismo e etilismo.

Tabela 15 - Resultados de EC dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno.

Grupos de trabalhadores	N	Avaliação Biológica					
		Ensaio cometa (Intensidade de cauda)					
		Tampão		FPG		Diferença	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Ocupacionalmente expostos							
Posto 1	7	14	9	17*	9	2	5
Posto 2	10	43 ^o	34	53 ^{o*}	32	10	12
Posto 3	7	17	13	26	22	9	14
Posto 4	3	33 ^o	19	45 ^o	27	12	17
Posto 5	9	21	24	41	22	20	4
Posto 6	2	22	11	29	7	7	5
Posto 7	13	9 ^o	8	13 ^o	11	5	3
TOTAL	51	21	20	25	25	8	11
Ambientalmente expostos							
Portaria 1	8	31	14	41	24	11	13
Portaria 2	7	20	14	26	22	7	12
Portaria 3	5	31	23	41	27	10	7
Portaria 4	6	36	25	48	34	12	11
Portaria 5	8	28	16	45	26	17	12
Portaria 6	1	26	-	-	-	-	-
TOTAL	35	29	18	40	26	11	13

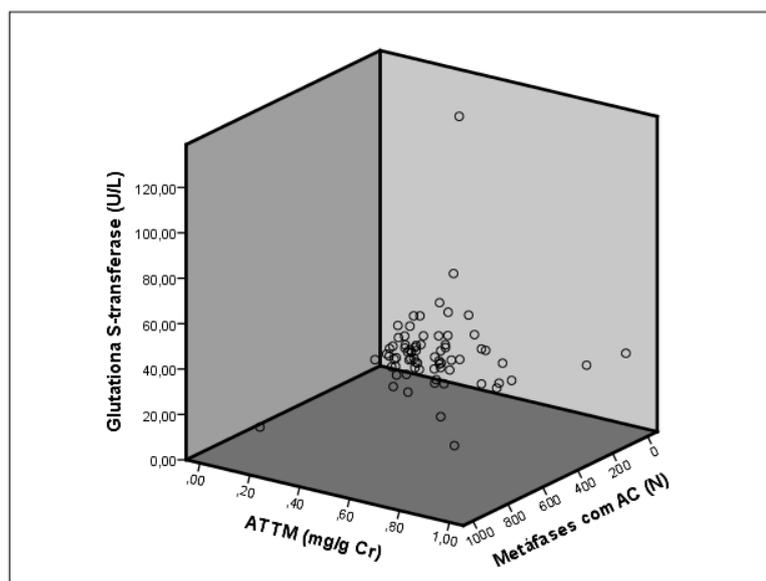
Nota: DP = Desvio Padrão; $p = p$ -valor (p -valor), [* £ o $p < 0,05$], sendo * referente à diferença estatística em comparação com o Posto 2; ^o referente à diferença estatística em comparação com o Posto 7.

É importante ressaltar, que a variável "tempo de trabalho na atual ocupação" apresentou correlações positivas, por Spearman, com EC-Tampão ($R = + 0,336$, $p = 0,002$), EC-FPG ($R = + 0,269$, $p = 0,017$), e Metáfases com AC ($R = + 0,368$, $p = 0,001$); e correlações negativas com GST ($R = - 0,246$, $p = 0,028$) e MDA ($R = - 0,421$, $p = 0,0001$). Porém, quando controladas por sexo, idade, tabagismo e etilismo, essas correlações não permaneceram.

Além disso, os resultados dos biomarcadores de genotoxicidade e estresse oxidativo foram comparados entre as categorias Nunca fumou, Tabagista e Ex-tabagista da variável tabagismo e apenas a atividade da GST apresentou diferença entre os grupos de trabalhadores que relataram nunca terem fumado e os tabagistas, cujas médias da atividade da GST foram $15,68 \pm 7,89$ e $26,44 \pm 28,33$, respectivamente. A mesma comparação foi realizada para as categorias Nunca bebeu, Bebe e Parou de beber da variável etilismo, não sendo encontrada nenhuma diferença entre os grupos.

Por fim, o biomarcador de exposição de dose interna ATTm apresentou regressão linear multivariada com as variáveis GST ($R^2 = 0,187$, $\beta = 0,005$, $p = 0,020$) e Metáfases com AC ($R^2 = 0,187$, $\beta = 0,0001$, $p = 0,034$), sendo utilizado ATTm como variável dependente. As variáveis SOD, CAT, TIOL, MDA, GST, Metáfases com AC, EC-Lise e EC-Dif se apresentaram como variáveis preditoras e as variáveis sexo e idade foram utilizadas como controle. Quando normalizada a variável ATTm por meio do LnATTm, a regressão linear permaneceu significativa para GST ($R^2 = 0,198$, $\beta = 0,017$, $p = 0,024$) e próxima da significância para Metáfases com AC ($R^2 = 0,198$, $\beta = 0,001$, $p = 0,068$). As variáveis SOD, CAT, TIOL, MDA, GST, Metáfases com AC, EC-Lise e EC-Dif também entraram como preditoras e sexo e idade como controle. A Figura 18, a seguir, demonstra a dispersão entre as variáveis ATTm, GST e Metáfases com AC.

Figura 18 - Gráfico de dispersão dos resultados dos biomarcadores ATTm, GST e Metáfases com AC.



V. DISCUSSÃO

O estudo realizado contou com a participação sindical, para a avaliação da exposição e dos parâmetros toxicológicos de estresse oxidativo e de genotoxicidade em trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos a baixas concentrações de benzeno. Uma escassez de informações relacionadas aos reais danos à saúde do trabalhador causados pela exposição ao benzeno nos processos de trabalho e no meio ambiente foi observada, sendo também evidenciada uma participação pouco efetiva nas discussões acerca da organização e das condições do ambiente de trabalho. Outro fato importante que chamou a atenção foi a alta frequência de trabalhadores sem exames admissionais e periódicos de rotina anteriores. Mesmo o hemograma completo ser preconizado pela lei trabalhista, o mesmo não é realizado nos exames admissionais e periódicos dos trabalhadores, não sendo também alvo de críticas pelo sindicato. O hemograma completo é o principal exame clínico que deve ser realizado para avaliar os efeitos hematológicos causados pelo benzeno e a sua não realização dificulta a constatação de alterações em decorrência da exposição ao benzeno, que por sua vez contribui para um menor número de indenizações dos trabalhadores que adoecem em decorrência dessa exposição. (BRASIL, Lei N° 7.855; MENDES et al., 2017)

Os resultados da quantificação de benzeno no ar atmosférico, em todos os PRC e Portarias avaliados, apresentaram concentrações de benzeno dentro dos valores estabelecidos pela legislação brasileira, ou seja, 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) (BRASIL, Portaria N°14). Entretanto, tal fato não exclui o risco a saúde humana, pois não existe limite de exposição seguro para substâncias carcinogênicas, como no caso do benzeno. É importante reassaltar, que a população em geral também se expõe ambientalmente, principalmente quando residente nas adjacências de determinadas indústrias e/ou PRC. A exposição ambiental se dá em decorrência da volatilização dos solventes presentes na gasolina, durante o abastecimento de tanques e veículos, além das emissões veiculares, as quais são fontes representativas e geram uma difusão universal do benzeno.

Apesar de não ter sido observada diferença entre os PRC e as Portarias com relação às concentrações de benzeno no ar atmosférico, diferenças significativas foram encontradas entre alguns PRC. Uma possível justificativa para esses resultados seria a diferença de circulação de ar nesses PRC, devido às suas localizações, pois alguns PRC estavam localizados em campo aberto com grande circulação de ar e vento enquanto outros estavam localizados em centros urbanos com construções ao redor, que servem como obstáculo para a circulação do

ar. Além disso, PRC de grande porte e/ou com grande volume de vendas possuem maior emissão de vapores de benzeno. Durante a avaliação do processo de trabalho dos trabalhadores de PRC, foram observados relatos de hábitos que aumentam o risco de exposição ocupacional, como por exemplo, o uso do paninho, a aproximação do rosto quando enche o tanque até a boca, o ato de cheirar a tampa do tanque do carro do cliente, aspirar o combustível com a mangueira e permanecer com a roupa molhada de combustível. Vale ressaltar que, em 2014, foi publicada a atualização da NR 9, junto à Subcomissão de PRC da CNPBz, com a inclusão do anexo 2, cujo título corresponde a “Exposição Ocupacional ao Benzeno em Instalações de Abastecimento de Combustíveis”, onde destaca-se o item que fica vedado o enchimento de tanques veiculares após o desarme do sistema automático, exceto quando ocorrer o desligamento precoce do bico, em função de características do tanque do veículo. Dessa forma, espera-se que com a determinação de legislação específica e de ações reguladoras se consiga minimizar o risco à saúde das populações expostas ocupacional e/ou ambientalmente.

O fato dos resultados de benzeno no ar atmosférico entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente exposto não serem diferentes, caracteriza uma similaridade entre as exposições relacionadas ao benzeno dos respectivos grupos avaliados. Entretanto, quando observadas as concentrações de benzeno no ar atmosférico por percentil, é possível notar um pequeno aumento nas concentrações de benzeno nos percentis de 75 e 95, sendo maior para os PRC. Muitas amostras ambientais, tanto para PRC quanto para Portarias, apresentaram valores abaixo do limite de detecção dentre os resultados das amostras de um mesmo local de trabalho, sendo possível observar uma variação das concentrações de benzeno na amostragem realizada. Esse fato caracteriza uma oscilação da exposição crônica ao benzeno durante a jornada de trabalho que esses trabalhadores estão submetidos, evidenciando uma limitação para a extrapolação dos resultados da avaliação ambiental a todos os trabalhadores de um mesmo local de trabalho. Por isso, deve-se levar em consideração a avaliação da exposição individual dos trabalhadores, por meio da determinação do biomarcador de exposição ATTM, como sendo mais fidedigna a real exposição que esses trabalhadores estão submetidos.

A avaliação da exposição individual foi realizada utilizando-se o biomarcador de exposição de dose interna ATTM e nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos de trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno. Os resultados também foram apresentados por percentil, não sendo observada diferença entre eles. Os valores de ATTM encontrados nas amostras de urina do grupo de trabalhadores

ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno estão 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 P.J. & VAN SITTER, 1995; DUCOS et al., 1992).

Os resultados de ATTM demonstram uma similaridade da exposição entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos avaliados no presente estudo. Embora o grupo de trabalhadores de PRC tenha maiores exposições ao benzeno devido às atividades intrínsecas de seu processo de trabalho, que foi caracterizado pela pequena diferença nos percentis de 75 e 95 das concentrações de benzeno no ar atmosférico, essa sutil diferença não foi suficiente para ser identificada pelo indicador de exposição de dose interna ATTM.

Estudos recentes têm investigado a associação entre concentrações urinárias de ATTM e a exposição ocupacional/ambiental ao benzeno, sugerindo que o ATTM pode não ser um biomarcador sensível para monitorar exposições a concentrações muito baixas de benzeno, como as populações do presente estudo (JALAI, RAMEZANI & EBRAHIM, 2017; SANTOS et al., 2017). Melikian e colaboradores (2002) realizaram um extenso estudo sobre a especificidade e sensibilidade dos biomarcadores do benzeno, ATTM e S-MA, em baixas exposições, e observaram que a variação da porcentagem de benzeno biotransformado em S-MA e ATTM diminuiu com a diminuição crescente da concentração de benzeno, especialmente a conversão de benzeno em ATTM. Melikian e colaboradores (2002) sugerem uma maior sensibilidade do S-MA para exposições ao benzeno a baixas concentrações, quando comparado ao ATTM.

Uma 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 (BARATA-SILVA et al., 2014; COSTA, 2001). O ATTM também pode sofrer interferência metabólica quando há exposição concomitante ao tolueno, ocorrendo uma diminuição da excreção de ATTM, como

é o caso da população ocupacionalmente exposta deste estudo (GONÇALVES, et al., 2017; DE PAULA et al., 2003).

Uma segunda possível fonte de exposição ao benzeno e um fator de confundimento seria 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 ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno possuem 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 a exposição do grupo ambientalmente exposto ao benzeno é predominantemente ambiental.

Além disso, resultados indicam que o grupo de trabalhadores ambientalmente expostos ao benzeno possui exposição ambiental semelhante ao grupo de trabalhadores ocupacionalmente expostos oriundos dos PRC. Devido todo o processo de trabalho dos trabalhadores alocados nas Portarias do *Campus* - Castelo Mourisco ocorrer na maior parte do tempo ao ar livre, a identificação de uma exposição ao benzeno nesse grupo de trabalhadores caracteriza a influência da exposição ambiental local. Isso provavelmente se deve ao fato das Portarias, locais de trabalho do grupo de trabalhadores ambientalmente expostos, estarem localizadas em uma região considerada de grande poluição ambiental, próxima a uma avenida de grande fluxo de carros e caminhões e a uma refinaria de petróleo. Segundo Carrieri et al. (2006), a população em geral se expõe ambientalmente devido à volatilização dos solventes presentes na gasolina oriunda tanto dos PRC, durante o abastecimento de tanques e veículos, quanto das emissões veiculares, o que por sua vez, gera uma difusão universal. Entretanto, esse fato não descaracteriza a maior exposição ao benzeno relacionada às atividades do processo de trabalho dos trabalhadores ocupacionalmente expostos de PRC.

O fato de ambos os grupos de trabalhadores terem exposições ambiental e ocupacional ao benzeno semelhantes, provavelmente, contribuiu para a não identificação de diferenças nos resultados da avaliação clínica, tanto para os exames hematológicos quanto para os bioquímicos. É importante ressaltar que a falta de exames admissionais e periódicos constatada reflete uma dificuldade em se estabelecer parâmetros mais apurados, em especial sobre o grupo de trabalhadores de PRC, no que diz respeito à avaliação clínica, pois não se dispõe de dados anteriores para se comparar com os atuais.

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, 2017). Nos resultados apresentados pelos trabalhadores do presente estudo, apesar da média da contagem de leucócitos encontrarem-se dentro da faixa da normalidade, treze trabalhadores (15%) apresentaram resultados de leucócitos ligeiramente menores que 4.500 células/mm³. Esse quadro não representa um desfecho nocivo, porém merece atenção e aponta para a importância do acompanhamento das condições de saúde desses trabalhadores. Com isso, o fato dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos não terem apresentado alteração da média da contagem de leucócitos, não se pode excluir a ausência de risco ou mesmo de efeitos sobre a saúde.

Apesar de ambas as populações serem expostas cronicamente ao benzeno, deve-se levar em consideração a oscilação da exposição no grupo de trabalhadores ocupacionalmente expostos oriundos de PRC, devido aos momentos de atividades distintas 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 adoecimento.

Sendo assim, dentre aos biomarcadores de estresse oxidativo avaliados neste estudo, o TIOL e o MDA mostraram-se sensíveis à sutil diferença de exposição entre os trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno, sendo a média do TIOL e do MDA maiores no grupo ocupacionalmente exposto. Correlações foram encontradas entre os biomarcadores de estresse oxidativo indicam que o aumento da GST, relacionada a exposição ao benzeno, está associada com a diminuição das atividades da CAT ($R = -0,387, p = 0,0001$) e da SOD ($R = -0,390, p = 0,0001$) e com o aumento do MDA ($R = +0,369, p = 0,001$).

Isso se deve, provavelmente, devido à GST ser uma enzima de metabolização de fase II e atuar inicialmente na conjugação da glutathione à molécula do benzeno, pela ligação com grupamento TIOL, enquanto que as enzimas CAT e SOD atuam na degradação de ERO's. Por sua vez, o MDA é um produto da peroxidação lipídica, indicando o efeito da reação de ERO's com membranas celulares (VALENTE et al., 2017; MORO et al., 2013). Assim, uma maior atividade da GST, em decorrência da exposição ao benzeno, pode estar

contribuindo para a diminuição das concentrações dos metabólitos reativos do benzeno e, conseqüentemente, relacionada a uma diminuição das atividades da CAT, da SOD e do TIOL, além de proteger a célula e o material genético de possíveis danos, observado nesse caso pela diminuição do MDA.

Entre os vários mecanismos relacionados à resistência celular a exposição química, o sistema enzimático glutathiona/glutathiona S-transferases (GSH/GST) é indicado como sendo um dos mais importantes. Os mecanismos de resistência via sistema enzimático GSH/GST envolvem alterações nos níveis de GSH e/ou na expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese de GSH; alterações do transporte dos conjugados de GSH (aumento da eficiência do transporte dos conjugados como consequência do aumento de GSH e/ou do aumento da expressão dos genes que codificam os transportadores desse conjugado) e/ ou, alterações na expressão dos genes que codificam a GST (HUBER, ALMEIDA & FÁTIMA, 2008). De fato, a expressão dos genes que codificam as GST se apresenta maior em células tumorais que em não-tumorais. Além disso, foi demonstrado que a depleção da GSH pode aumentar a sensibilidade celular a agentes alquilantes, observado em quimioterápicos. Estes resultados ressaltam a importância do sistema enzimático GSH/GST no mecanismo celular de resistência a substâncias químicas (HUBER, ALMEIDA & FÁTIMA, 2008).

Com relação aos danos no material genético do atual estudo, apenas AC apresentou diferença entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos, não sendo encontrada diferença para o teste de EC avaliado. O fato dos trabalhadores ocupacionalmente e ambientalmente expostos apresentarem similaridade na exposição ao benzeno, como demonstrado pela determinação de ATTM, pode ter mascarado uma possível diferença nos resultados do EC entre os dois grupos. Outra explicação seria devido o teste de EC com FPG ter sido realizado em amostras de sangue total congelado, sendo menos sensível que resultados de amostras com linfócitos isolados (AZQUETA, et al. 2013). Além disso, recentes lesões genômicas, após serem processadas pelo aparato enzimático celular de reparo do DNA, podem ser possivelmente corrigidas e não formarem quebras no DNA, não sendo, portanto, observadas no teste de EC.

Entretanto, mesmo não havendo diferença dos resultados de ATTM entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos, o teste de AC foi um sensível e importante biomarcador para a pequena diferença de exposição ao benzeno, apresentada pela avaliação ambiental com a determinação de benzeno no ar atmosférico. A maior frequência de AC no grupo de trabalhadores de PRC caracteriza um maior risco de desenvolvimento de um

desfecho nocivo em decorrência da exposição ocupacional. Porém, isso não significa que os trabalhadores ambientalmente expostos ao benzeno oriundos das Portarias não sejam também levados ao adoecimento.

As AC se dividem em numéricas e estruturais, e o aumento de sua ocorrência indica a presença de fatores estressantes sobre um determinado tecido, órgão ou organismo. Por essa razão, as AC representam um importante biomarcador de efeito citotóxico quando se busca prevenir um processo de doença, já que o aumento na frequência de AC ainda não caracteriza um desfecho nocivo ao indivíduo (VALENTE et al., 2017). Santos-Mello & Cavalcante (1992) publicaram um dos primeiros artigos brasileiros avaliando AC em atendentes de PRC, tendo encontrada uma relação entre a exposição e a ocorrência de deleções cromossômicas em 49 frentistas, com ocorrência 11 vezes maior comparada aos 24 sujeitos do grupo controle.

Por sua vez, Çelik & Akbas (2005) avaliaram, por meio de AC e troca de cromátides irmãs, o efeito da exposição ocupacional a vapores de combustíveis em um grupo de 30 frentistas e 30 sujeitos não expostos ocupacionalmente, ambos compostos por 15 fumantes, demonstrando que a exposição sofrida pelos trabalhadores, somada ao hábito de fumar, é responsável por um aumento significativo nas taxas de ocorrência de AC e troca de cromátides irmãs, evidenciando o efeito da exposição sobre o sistema hematopoiético. Isso explica o fato da categoria de trabalhadores tabagistas terem apresentado frequência de AC maiores que os não fumantes.

Contraditoriamente aos resultados encontrados deste estudo, Fracasso et al. (2010), Lovreglio et al. (2014) e Trevisan et al. (2014) reportaram que o teste de AC não foi sensível o suficiente na identificação dos efeitos relacionados a exposição de trabalhadores a baixas concentrações de benzeno, oriundo de vapores de combustíveis. Além disso, os atuais resultados apresentaram uma significativa relação dose-resposta entre a exposição a baixas concentrações ao benzeno e os biomarcadores AC e GST, em que 20% do aumento do número de Metáfases com AC e da atividade da GST podem ser explicados pelo aumento do indicador de exposição de dose interna ATTM.

O número de Metáfases com AC também apresentou correlação negativa com GST ($R = -0,368$, $p = 0,0001$) e positiva com os números de leucócitos totais ($R = +0,292$, $p = 0,006$) e com os números de neutrófilos ($R = +0,237$, $p = 0,028$). O resultado de Metáfase com SPC também apresentou correlação positiva com grupamento TIOL ($R = +0,244$, $p = 0,023$), que está associado ao aumento da GST. Sendo assim, uma diminuição da atividade da GST faz com que ocorra uma detoxificação menos eficiente e expõe o material

genético a xenobióticos nocivos que causam lesões genômicas e citotóxicas, as quais foram observadas por Metafasas com AC e SPC. Conseqüentemente, outras enzimas do estresse oxidativo também são envolvidas no processo de defesa do organismo, como a SOD.

Não menos importante, os níveis celulares (em condições normais) de GSH são elevados, indicando que o mecanismo de detoxificação via GSH pode representar uma adaptação biológica fundamental para a sobrevivência e garantia da perpetuação de muitas espécies. A GSH possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. Este tripeptídeo é encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos. A GSH é o mais abundante grupamento tiol celular de baixa massa molecular; cuja concentração é aproximadamente 2mM em eritrócitos humanos (HUBER, ALMEIDA & FÁTIMA, 2008).

Estudos indicam uma relação entre a atividade enzimática antioxidante e a exposição de trabalhadores de PRC aos vapores de combustíveis. Rekhadevi et al. (2010) e Moro et al. (2013) descrevem uma redução dos biomarcadores do estresse oxidativo (GSH, SOD, CAT e GST) e dos níveis de BTEX em trabalhadores expostos. Moro et al. (2013) ainda apresentam uma relação negativa entre a concentração do antioxidante exógeno do ácido ascórbico e danos ao material genético avaliado por EC.

Segundo a avaliação da exposição realizada por Costa-Amaral, et al. (2017) com trabalhadores de postos de combustíveis, a atividade enzimática da GST apresentou correlação negativa com o aparecimento de dano no DNA, avaliado por EC, e correlação positiva com o tempo de trabalho na atual função, ressaltando a hipótese de que a atividade da GST pode ser influenciada por longo tempo de exposição a BTEX.

Estudos que relacionam a exposição a BTEX e a atividade enzimática da GST são poucos e não conclusivos. Dados na literatura sobre as enzimas do estresse oxidativo possuem resultados controversos e relatam tanto o aumento quanto a depleção das atividades em diferentes tipos exposições, necessitando ainda de mais estudos nesta área (COSTA-AMARAL, et al. 2017; COSTA-AMARAL, et al. 2016; GÓTH, 1991). Estudos ainda revelam que a GST pode apresentar uma depleção de sua atividade no início da exposição e/ou do desenvolvimento de uma determinada doença com posterior aumento de sua atividade até atingir níveis normais (COSTA-AMARAL, et al. 2016; EVELO, BOS & BORM, 1993).

Na presente tese, o tempo de trabalho na atual ocupação apresentou correlação positiva com EC ($R = + 0,336$, $p = 0,002$), AC ($R = + 0,368$, $p = 0,001$) e negativa com GST ($R = - 0,246$, $p = 0,028$) e MDA ($R = - 0,421$, $p = 0,0001$). Com isso, quanto maior o tempo de

trabalho, maiores são os danos observados no material genético, observado pelo EC e AC. Por outro lado, esse maior tempo, aparentemente, gera uma adaptação do organismo, ocasionando a diminuição da atividade da GST e do MDA, metabólito da peroxidação lipídica. Entretanto, as relações da GSH e das enzimas relacionadas às diversas vias metabólicas do estresse oxidativo devem ser melhor elucidadas para maiores informações de suas atuações no processo biológico de desenvolvimento de doenças.

Evidências recentes mostram que os seres humanos metabolizam o benzeno de forma mais eficiente em baixas concentrações ambientais do que em altas concentrações, devido à saturação de uma das duas vias metabólicas do benzeno, sugerindo um maior risco de leucemia em baixos níveis ambientais de exposição (RAPPAPORT et al., 2009). Além disso, a influência do tempo na atual ocupação nos resultados observados no presente estudo também pode ser explicada pelo fato das lesões genômicas, após serem processadas pelo aparato enzimático celular de reparo do DNA, serem possivelmente corrigidas e não formarem quebras no DNA (AZQUETA & COLLINS, 2013; COLLINS, 2014). Porém, com o passar do tempo, atuando na mesma jornada de trabalho, esse dano pode ser observado com o aumento da frequência de AC. Desta forma, uma menor atividade da enzima de detoxificação GST, em decorrência do longo tempo de exposição ao benzeno, pode estar contribuindo para o aumento das concentrações dos metabólitos reativos do benzeno, deixando de proteger, conseqüentemente, o material genético dos danos oxidativos e levando o aparecimento de AC.

É importante ressaltar que, apesar do benzeno destacar-se como sendo o principal composto de relevância toxicológica presente nos solventes voláteis de PRC, o dano no material genômico observado por AC 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 postos e na atual ocupação, sendo necessária a realização de estudos de coorte para maiores elucidaciones. Portanto, estudos que relacionam a exposição ao benzeno, atividade enzimática do estresse oxidativo 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 crescente utilização de biomarcadores de efeito genotóxico e citotóxicos, os quais podem avaliar os danos causados ao material genético, como as técnicas de AC, MN e EC.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, os resultados das concentrações de benzeno no ar atmosférico estavam dentro dos valores permitidos pela legislação brasileira em todos os locais de trabalho avaliados, tanto para PRC quanto para Portarias. Entretanto, esse fato não exclui a ausência de risco ou mesmo de desenvolvimento de doenças relacionada à exposição ao benzeno. Os resultados também caracterizaram uma maior oscilação das concentrações de benzeno no ar atmosférico no ambiente de trabalho dos PRC, estando os trabalhadores ocupacionalmente expostos a maiores concentrações em decorrência de seu processo de trabalho. Entretanto, o ATTM não foi sensível a essa pequena diferença, demonstrando que todos os trabalhadores apresentavam uma similaridade na exposição em relação ao benzeno. A avaliação da exposição por meio do biomarcador ATTM foi considerada ser mais fidedigna a real exposição a que esses trabalhadores estão submetidos, em comparação com a avaliação ambiental, devido a individualização da determinação da exposição.

Com relação a avaliação clínica, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno. Falta de exames admissionais e periódicos foi constatada, refletindo uma dificuldade de se estabelecer parâmetros mais apurados no que diz respeito à avaliação clínica, devido a não disponibilidade de dados comparativos. Mesmo assim, 15% (n = 13) dos trabalhadores apresentaram resultados de leucócitos ligeiramente menores que 4.500 células/mm³, demonstrando a importância do acompanhamento das condições de saúde desses trabalhadores.

Os biomarcadores TIOL, MDA e AC apresentaram diferenças entre os grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno a baixas concentrações, demonstrando uma sensibilidade na avaliação dos efeitos causados pela exposição ao benzeno. A maior frequência de AC no grupo de trabalhadores de PRC caracterizando um maior risco de desenvolvimento de um desfecho nocivo em decorrência da exposição

ocupacional. Porém, isso não significa que os trabalhadores ambientalmente expostos ao benzeno oriundos das Portarias não sejam também levados ao adoecimento. A concentração de ATTM também apresentou uma relação dose-resposta por meio de regressão linear multivariada com os biomarcadores AC e a GST. Esse resultado demonstra a íntima relação entre a exposição ao benzeno, mesmo sendo em baixas concentrações, e seus possíveis efeitos, os quais foram caracterizados pelos biomarcadores AC e GST.

O EC com uso da enzima endonuclease FPG não se mostrou sensível na diferenciação dos grupos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno, muito provavelmente devido o fato de ambos os grupos apresentarem uma similaridade de exposição ao benzeno. Além disso, uma relação significativa entre a variável "tempo de trabalho na atual ocupação" e os biomarcadores EC, AC, GST e MDA estão relacionados com os efeitos genotóxicos e citotóxicos apresentados pela exposição.

Sendo assim, apesar de ambas as populações serem expostas cronicamente ao benzeno, devem-se levar em consideração os momentos de alta exposição a que os trabalhadores dos PRC estão submetidos durante o exercício de suas atividades de trabalho, o que caracteriza um maior risco de adoecimento. Porém, isso não significa que os trabalhadores das Portarias expostos ambientalmente ao benzeno não estejam também sob risco de adoecimento pelo mesmo.

Por fim, é importante ressaltar que, apesar do benzeno ser o principal composto de relevância toxicológica, os trabalhadores do presente estudo possuem múltipla exposição ao BTEX, não se tendo estudos sobre os efeitos dessa múltipla exposição. Portanto, estudos que contemplem o monitoramento biológico de populações ocupacionalmente e ambientalmente expostas devem continuar sendo realizados, assim como estudos de elucidação dos mecanismos de ação do benzeno e demais hidrocarbonetos presentes na gasolina.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Ambiental Pick-upau [homepage na internet]. Que energia é essa? (O Petróleo), 2003. Disponível em: <http://www.pick-upau.org.br/mundo/petroleo_energia/petroleo.htm>. Acesso em 19 fev 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. Abastecimento em números. Boletim Gerencial. Superintendência de Abastecimento. Informações sobre a comercialização de combustíveis. Ano 9: nº 44, Abril de 2014. Disponível em: <http://www.udop.com.br/download/estatistica/anp__abastecimento_em_numeros/2014/boletim_abastecimento_numeros_44.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2015.

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.

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.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENIST (ACGIH). Threshold Limit Values for Chemicals Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH, 2003.

ARAGÃO, A.P. Estimativa da contribuição do setor petróleo ao produto interno bruto brasileiro: 1955/2004. Dissertação [Mestre em Ciências] - COPPE/UFRJ, 2005.

- ARNOLD, S.M.; ANGERER, J.; BOOGAARD, P.J.; HUGHES, M.F.; O'LONE, R.B.; ROBISON, S.H.; SCHNATTER, A.R. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. *Crit Rev Toxicol*, v.43, n.2 p.119–153, 2013.
- ASTON J. P, BALL R. L., POPLE J. E., JONES and COCKER J., Development and validation of a competitive immunoassay for urinary S -phenylmercapturic acid and its application in benzene biological monitoring. *Biomarkers*, v.7, n.2, p.103-12, 2002.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. Toxicological Profile for Benzene. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 438p, 2007.
- AUGUSTO, L.G.S. & NOVAES, T.C.P. Ação médico-social no caso do benzenismo em Cubatão, São Paulo: Uma abordagem interdisciplinar. *Cadernos de Saúde Pública*, v.15, p.729-738, 1999.
- AZQUETA, O.A.; ARBILLAGA, L.C.; ADELA, L.; COLLINS, A.R. Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis*, v.28, n.3, p.271- 277, 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.
- AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A.R. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research*, v.674, p.101-108, 2009.
- BARATA-SILVA, C.; MITRI, S.; PAVESI, T.; SAGGIORO, E.; MOREIRA, J.C. Benzeno: reflexos sobre a saúde pública, presença ambiental e biomarcadores utilizados para a determinação da exposição. *Cad Saúde Coletiva*, v.22, n.4, p.329-42, 2014.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse Oxidativo: conceitos, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, Campinas, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas de oxigênio e defesa do organismo. *Química Nova*. v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- BARROS, D.; OLIVEIRA, V.; SANTANA, M.F.E.; CARVALHO, D.D. Caracterização ambiental dos postos de revenda de combustíveis no Rio de Janeiro. Relatório FAPERJ, 2009.
- BARROS, E.V. A matriz energética mundial e a competitividade das nações: bases de uma nova geopolítica. *Engevista*, v.9, n.1, p.47-56, 2007.
- BOOGAARD, P.J. Biomonitoring of the workplace and environment. *General, Applied and Systems Toxicology* 3rd ed. Chichester (UK): Wiley, 2559–89, 2009.
- 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. Série A. Normas e Manuais Técnicos; Saúde do Trabalhador; 7. Protocolos de Complexidade Diferenciada. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006 p.48.
- 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, 6 jul. 1978. Disponível em: <<http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C816A36A27C140136A8089B344C39/NR-15%20%28atualizada%202011%29%20II.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2013.
- BRASIL. Portaria Nº 14, de 20 de dezembro de 1995. Ministério do Trabalho e Emprego. NR 15 - Atividades e Operações insalubres. Anexo N.º 13-A Benzeno. Disponível em: <<http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C816A33EF459901342405FB3B7767/NR-15%20%28Anexo%20n.%C2%BA%2013-A%29%20Benzeno%202011%28II%29.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2015.
- BRASIL. Portaria Nº 3.214 , de 06 de junho de 1978. Ministério do Trabalho e Emprego. NR 16 - Atividades e operações perigosas. Brasília, DF, 1978. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 6 jul. 1978. Disponível em: <<http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C816A4B277C09014B4A45540355EF/NR-16%20%28atualizada%202015%29.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2013.

BRASIL. Resolução CONAMA N° 001, de 23 de janeiro de 1986. Dispõe sobre critérios básicos e diretrizes gerais para a avaliação de impacto ambiental. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 17 fev. 1986. Seção 1, p.2548-2549. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=23>>. Acesso em: 22 fev. 2015.

BRASIL. Resolução CONAMA N° 319, , de 4 de dezembro de 2002. Dá nova redação a dispositivos da Resolução CONAMA N° 273/00, de 29 de novembro de 2000, que dispõe sobre a prevenção e controle da poluição em postos de combustíveis e serviços. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil* N° 245, 19 dez. 2002. Seção 1, p.224-225. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=341>>. Acesso em: 22 fev. 2015.

BRASIL. Decreto N° 3.352-A, de 30 de novembro de 1864. Coleção de Leis do Império do Brasil - 1869. v. 1, pt. II, p.12. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1824-1899/decreto-3352-a-30-novembro-1864-555171-publicacaooriginal-74298-pe.html>>. Acesso em: 17 fev. 2015.

BRASIL. Decreto N° 4.386, de 30 de junho de 1869. Coleção de Leis do Império do Brasil - 1869. v. 1, pt. II, p.322. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/Internet/InfDoc/cont_eudo/colecoes/Legislacao/leis1869/leis1869_138.pdf#page=5>. Acesso em: 17 fev. 2015.

BRASIL. Decreto N° 6.514, de 22 de julho de 2008. Dispõe sobre as infrações e sanções administrativas ao meio ambiente, estabelece o processo administrativo federal para apuração destas infrações, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 23 jul. 2008. Disponível em :<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/decreto/D6514.htm>. Acesso em: 22 fev. 2015.

BRASIL. Decreto-Lei N° 395, de 29 de abril de 1938. Declara de utilidade pública e regula a importação, exportação, transporte, distribuição e comércio de petróleo bruto e seus derivados, no território nacional, e bem assim a indústria da refinação de petróleo importado em produzido no país, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Rio de Janeiro, 29 abril 1938, 117° da Independência e 50° da República. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/1937-1946/Del0395.htm>. Acesso em: 17 fev. 2015.

BRASIL. Lei Nº 2.004, de 3 de outubro de 1953. Dispõe sobre a Política Nacional do Petróleo e define as atribuições do Conselho Nacional do Petróleo, institui a Sociedade Anônima, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Rio de Janeiro, 3 out. 1953. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L2004.htm>. Acesso em: 15 fev. 2015.

BRASIL. Lei Nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 13 fev. 1998. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm>. Acesso em: 22 fev. 2015.

BRASIL. Lei Nº 7.855, de 24 de outubro de 1989. Altera a Consolidação das Leis do Trabalho, atualiza os valores das multas trabalhistas, amplia sua aplicação, institui o Programa de Desenvolvimento do Sistema Federal de Inspeção do Trabalho e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 24 out. 1989.

BRASIL. Norma Brasileira ABNT NBR 13.786:2014, de 24 de novembro de 2014. Armazenamento de líquidos inflamáveis e combustíveis - Seleção dos componentes para instalação de sistema de armazenamento subterrâneo de combustíveis (SASC).

BRASIL. Instrução Normativa Nº1, de 20 de dezembro de 1995. Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho - SSST. Anexo - Avaliação das Concentrações de Benzeno em Ambientes de Trabalho. Disponível em: <http://portal.mte.gov.br/data/files/FF8080812BD96D6A012BDA74DD71230F/in_19951220_01.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2015.

BRASIL. Portaria Nº 34, de 20 de Dezembro de 2001. Protocolo para a utilização de indicador biológico da exposição ocupacional ao benzeno. Disponível em: <<http://portal.mte.gov.br/legislacao/portaria-n-34-de-20-12-2001.htm>>. Acesso em: 22 fev. 2015.

BRASIL. 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 República Federativa do Brasil*, 29 abr. 2004.

Disponível em: <http://portal.mte.gov.br/data/files/FF8080812BE914E6012BF2BB289F1505/p_20040428_776.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2015.

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.

BOOGAARD P.J. & VAN SITTER, N.J. Biological monitoring of exposure benzene: a comparison between S-phenylmercapturic acid, trans, trans-muconic acid and phenol. *Occup Environ Med*, v.52, p.611-20, 1995.

BUSCHINELLI, J.T. Manual de orientação sobre controle médico ocupacional da exposição a substâncias químicas. São Paulo: Fundacentro, 2014.

CARRARD, V.C.; COSTA, C.H.; FERREIRA, L.A.; LAUXEN, I.S.; RADOS, P.V. Teste dos Micronúcleos - Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. *R Fac Odontol*. v.48, n.1/3, p.77-81, 2007.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens* nº 14, 1987.

CARRIERI, M.; BONFIGLIO, E.; ESCAPELLATO, M. L.; MACCÀ, I.; TRANFO, G.; FARANDA, P.; PACI, E.; BARTOLUCCI, G. D. Comparison of Exposure Assessment Methods in Occupational Exposure to Benzene in Gasolina filling-station Attendants. *Toxicol. Letters*, v.162, p.146-152, 2006.

CELIK, A. & AKBAS, E. Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants *Ecotoxicology and Environmental Safety*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v.60, p.106-112, 2005.

COLLINS, A.R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v.1840, n.2, p.794- 800, 2014.

- COLLINS, A.R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research*, v.681, p.24–32, 2009.
- COLLINS A.R. & AZQUETA O.A. Single-cell gel electrophoresis combined with lesion-specific enzymes to measure oxidative damage to DNA. *Methods in Cell Biology*, Academic Press, In P. Michael Conn (ed.), kapittel 4, p.69- 92, 2012a.
- 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.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. Diretoria de Controle e Licenciamento Ambiental. Texto explicativo relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo, 2011.
- COSTA-AMARAL, I.C.; CARVALHO, L.V.B. ; PIMENTEL, J.N.S. ; PEREIRA, A.C. ; VIEIRA, J.A. ; CASTRO, S.C. ; BORGES, R.M. ; ALVES, S.R. ; NOGUEIRA, S.M. ; TABALIPA, M.M. ; OTERO, U.B. ; OLIVEIRA, K.M.P.G. ; CORREA, S.M. ; FONSECA, A.S.A. ; MOREIRA, J.C. ; PERES, F. ; TEIXEIRA, L.R. ; MENEZES, M.A. ; MATTOS, R.C.O.C. ; SARCINELLI, P.N. ; LARENTIS, A.L. . Avaliação ambiental de BTEX e biomarcadores de genotoxicidade em trabalhadores de postos de combustíveis. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 2017.
- COSTA-AMARAL, I.C.; GUIMARÃES-JOCA, F.J.; CARVALHO, L.V.B.; CASTRO, V.S.; PEREIRA, N.C.; MURATA, M.M.; MAINENTI, H.R.D.; MITRI, S.; RIBEIRO, P.C.; RODRIGUES, C.F.; TEIXEIRA, L.R. COLLINS, A.R.; LARENTIS, A.L.; SARCINELLI, P.N.; CASTRO, H.A.; MATTOS, R.C.O.C. Evaluation of Genotoxic Effects of Asbestos on Occupationally Exposed Workers in Brazil. *Biomonitoring*. v.3, p.25–33, 2016.
- COSTA, M.F.B. Estudo da aplicabilidade do ácido trans,trans-mucônico urinário como indicador biológico de exposição ao benzeno. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro. Escola Nacional de Saúde Pública, 2001.
- COSTA, M.A.F. & COSTA M.F.B. Benzeno: uma questão de Saúde Pública. *Interciência*, v.27, n.4, 2002.

- COUSSENS, L.M. & WERB, Z. Inflammation and cancer, *Nature*, v.420, p.860-867, 2002.
- COUTRIM, M.X.; CARVALHO, L.R.F.; ARCURI, A.S.A. Avaliação dos métodos analíticos para a determinação de metabólitos do benzeno como potenciais biomarcadores de exposição humana ao benzeno no ar. *Química Nova*, v.23, n.5, p.653-663, 2000.
- DE PAULA, F.C.S.; SILVEIRA, J.N.; JUNQUEIRA, R.G.; LEITE, E.M.A. Avaliação do ácido trans, trans-mucônico urinário como biomarcador de exposição ao benzeno. *Rev Saúde Pública*, v.37, n.6, p.780-5, 2003.
- DE PALMA, G.; MUTTI, A.; SPATARI, G.; ANDREOLI, R.; MOZZONI, P.; CARRIERI, M.; MANNO, M.; APOSTOLI, P. Biomarkers of effect and susceptibility to low doses of benzene. *G Ital Med Lav Ergon.*, v.35, n.4, p.259-62, 2013.
- DUCOS, P.; GAUDIN, R.; ROBERT, A.; FRANCIN, J.M.; MAIRE, C. Improvement in HPLC analysis of urinary trans,trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. *Int Arch Occup Environ Health*, v.62, p.529-534, 1990.
- DUCOS, P.; GAUDIN, R.; BEL, J.; MARIE, C.; FRANCIN, J.M.; ROBERT, A. et al. Trans, trans- muconic acid, a reliable biological indicator for the detection of individual benzene exposure down to the ppm level. *Int Arch Occup Environ Health*,;v.64, p.309-13, 1992.
- EVELO, C.T.; BOS, R.P.; BORM, P.J. Decreased glutathione content and glutathione S-transferase activity in red blood cells of coal miners with early stages of pneumoconiosis. *Br J Ind Med.*, v.50, n.7, p.633-636, 1993.
- FARIAS, L. M.; SELLITTO, M. A. Uso da energia ao longo da história: evolução e perspectivas futuras. *Revista Liberato, Novo Hamburgo*, v.12, n.17, p.01-106, 2011.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista Associação Médica Brasileira*. v.43, n.1, p.61-68, 1997.

- FOGAÇA, J.R.V. Refino do petróleo. Mundo Educação [homepage na internet]. 2014 set 23 Disponível em: <http://www.mundoeducacao.com/quimica/refino-petroleo.htm>. Acesso em 21 fev 2015.
- FONSECA, A. S. A. ; COSTA, D. F. ; DAPPER, V. ; MACHADO, J.M.H. ; SANTOS, D. V. S. ; CARVALHO, L.V.B. ; COSTA-AMARAL, I.C. ; ALVES, S.R. ; SARCINELLI, P.N. ; MENEZES, M. A. ; LARENTIS, A. L. ; MATTOS, R.C.O.C. ; MOURA-CORRÊA, M.J. . Classificação clínico-laboratorial para manejo clínico de trabalhadores expostos ao benzeno em Postos de Revenda de Combustíveis.. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, 2017.
- FRACASSO, M. E.; DORIA, D.; BARTOLUCCI, G. B.; CARRIERI, M.; LOVREGLIO, P.; BALLINI, A.; SOLEO, L.; TRANFO, G.; MANNO, M. Low air levels of benzene: Correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. Toxicology Letters. v.192, p.22-28, 2010.
- GeoPg. Decifrando a Terra em busca do Petróleo [homepage na internet]. Processos de refino para a obtenção de combustíveis e matéria-prima petroquímica. 2014 jul 29. Disponível em: http://geopg.blogspot.com.br/2014_07_01_archive.html. Acesso em: 21 fev. 2015.
- GERALDO, M.S. A Securitização da Política Energética nas Relações Internacionais a Partir dos Anos 1970. In: Seminário Brasileiro de Estudos Estratégicos Internacionais SEBREEI. Integração Regional e Cooperação Sul-Sul no Século XXI; 2012 jun 20-22; (Porto Alegre) Rio Grande do Sul, Brasil.
- GOBBA, F.; ROVESTI, S.; BORELLA, P.; VIVOLI, R.; CASELGRANDI, E.; VIVOLI, G. Inter-individual variability of benzene metabolism to trans, trans-muconic acid and its implications in the biological monitoring of ocupacional exposure. Sci Total Environ, v.199, p.41-8, 1997.
- GONÇALVES, E. S.; BORGES, R. M. ; CARVALHO, L. V. B. ; ALVES, S. R. ; ANDRE, L. C. ; MOREIRA, J. C. . Estratégias analíticas baseadas em sistemas MS/MS utilizadas para a determinação do ácido S- fenilmercaptúrico em urina aplicada à monitorização biológica de exposição ao benzeno: uma revisão. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, 2016.

- GORINI, R.; GUERREIRO, A.; TOLMASQUIM, M. Matriz energética brasileira: uma perspectiva. *Novos Estudos*. v.79, p.47-69, 2007.
- GÓTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, v.196, p.143-152, 1991.
- 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.
- GROLLMAN, A.P. & MORIYA, M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet.*, v.9, p.246–249, 1993.
- GULIAEV, A.B.; 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 Research*, v.32, n.9, p.2894-2852, 2004.
- GURER-ORHAN, H.; SABIR, H.U.; ÖZGÜNES, H. Correlation Between Clinical Indicators of Lead Poisoning and Oxidative Stress Parameters in Controls and Lead-Exposed Workers. *Toxicology*, v.195, p.147 154, 2004.
- HABDOUS, M.; VINCENT-VIRY, M.; VISVIKIS, S.; SIEST, G. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta*, v.326, p.131–142, 2002.
- HABIG, WH.; PABST, MJ.; JACOBY, WB. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v.249, n.22, p.7130-7139, 1974.
- HAGMAR, L.; STRÖMBERG, U.; TINNERBERG, H.; MIKOCZY, Z. The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. v.204, p.43-47, 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford Univ Press: New York, United States, 2007, 851p.

- HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.* v.45, p.51–88, 2005.
- HAYS S.M., PYATT D.W., KIRMAN C.R., AYLWARD L.L. Biomonitoring Equivalents for benzene. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.62, p.62–73, 2012.
- HU, ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology*, v.233, p.380-385, 1994.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*. v.31, n.5, p.1170-1179, 2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Geociências. Cartografia. Mapeamento das Unidades Territoriais/ Área Territorial Brasileira. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/cartografia/default_territ_area.shtm> Acesso em: 04 fev. 2015.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Estatísticas históricas do Brasil: séries econômicas, demográficas e sociais de 1550 a 1988. 2ª edição, v. 3, 1990. Séries estatísticas retrospectivas. Rio de Janeiro.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE PETRÓLEO E GÁS - IBP. Reflexões sobre a história da matriz energética brasileira e sua importância para a definição de novas estratégias para o gás. 2004. Disponível em <http://www.bgfconsultoria.com.br/pag/documents/Rio_Oil_Gas.htm>. Acesso em: 15 fev 2015.
- 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: 14 de dez. 2014.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Some Industrial Chemicals and DyeStuffs. *Monogr. Eval. Carcinogen. Risk Chem. Hum.*, 1982.

- JALAI, A.; RAMEZANI, Z.; EBRAHIM, K. Urinary trans,trans -muconic acid is not a reliable biomarker for low-level environmental and occupational benzene exposures. *Saf Health Work*, v.8, n.2, p.220-5, 2017.
- LEÓDIDO, A.C.; LIMA, G.; CHAVES, T.; VALENTIM, V.; CAVALCANTE, A.A.; COSTA, R. Avaliação do risco de mutagenicidade e anormalidades nucleares decorrente da exposição ao benzeno e a seus derivados em trabalhadores de oficinas automotivas em Teresina-PI, Brasil. *RBAC*, v.45, n.1-4, p.23-31, 2013.
- LORENZO, Y.C.; COSTA, S.; COLLINS, A.R.; AZQUETA, O.A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*, v.28, n.4, p.427- 432, 2013.
- LOVREGGIO, P.; MAFFEI, F.; CARRIERI, M.; D'ERRICO, M. N.; DRAGO, I.; HRELIA, P.; BARTOLUCCI, G. B.; SOLEO, L. Evaluation of chromosome aberration and micronucleus frequencies in blood lymphocytes of workers exposed to low concentrations of benzene. *Mutation Research*, v.770, p.55-60, 2014.
- MACHADO, J.M.H.; COSTA, D.F.D.; CARDOSO, M.; ARCURI, A. 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.
- MAGNANELLI, N.P. *Vigilância Sanitária em Postos de Combustíveis*. São José dos Campos: CVS; 2012.
- MARINHO JR., I.P. *Petróleo: soberania e desenvolvimento*. Rio de Janeiro: Bloch, 1970.
- MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, v.32, n.8, p.595-603, 1999.
- McHALE, C.M.; ZHANG, L.; SMITH, M.T. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment. *Carcinogenesis* v.33, n.2 p.240-252, 2012.

MEEK, M.E.B. & KLAUNIG, J.E. Proposed mode of action of benzene-induced leukemia: Interpreting available data and identifying critical data gaps for risk assessment. *Chemico-Biological Interactions*, v.184, p.279–285, 2010.

Meio Ambiente Natural [homepage na internet]. Esquemas de Produção. Esquemas de produção no refino de petróleo, 2013. Disponível em: <http://guaralife.blogspot.com.br/2013/06/v-behaviorurldefaultvmlo_13.html>. Acesso em: 19 fev 2015.

MELIKIAN, A.A.; QU, Q.; SHORE, R.; LI, G.; LI, H.; JIN, X.; COHEN, B.; CHEN, L.; LI, Y.; YIN, S.; MU, R.; ZHANG, X.; WANG, Y. 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, n.1-2, p.211-21, 2002.

MENDES, M.; MACHADO, J.M.H.; DURAND, A.; COSTA-AMARAL, I.C.; VALENTE, D.; GONÇALVES, E.S.; ARCURI, A.S.A.; TREVISAN, E.A.; SARCINELLI, P.N.; LARENTIS, A. L.; MOURA-CORRÊA, M.J.; ANDRÉ, L.C. 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.

MONDRALA, S. & EASTMOND, D.A. Topoisomerase II inhibition by the bioactivated benzene metabolite hydroquinone involves multiple mechanisms. *Chemico- Biological Interactions*, v.184, p.259–268, 2010.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLNAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGUFORD, D.A. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*, v.20, p.613-616, 1960.

MORELLI, J.N. Conheça o petróleo. 1º edição Rio de Janeiro: Melhoramentos, 1966.

- MORO, A.M.; CHARÃO, M.F.; BRUCKER, N.; DURGANTEA, J.; BAIERLE, M.; BUBOLS, G.; GOETHEL, G.; FRACASSO, R.; NASCIMENTO, S.; BULCÃO, R.; GAUER, B.; BARTH, A.; BOCHI, G.; MORESCO, R.; GIODA, A.; SALVADOR, M.; FARSKY, S.; GARCIA, S.C. Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. *Mutation Research*, v.754, p.63–70, 2013.
- MOURA-CORREA, M.J.; JACOBINA, A.J.R.; SANTOS, S.A.; PINHEIRO, R.D.C.; MENEZES, M.A.C.; TAVARES, A.M.; PINTO, N.F. Exposição ao benzeno em postos de revenda de combustíveis no Brasil: Rede de Vigilância em Saúde do Trabalhador (VISAT). *Ciência & Saúde Coletiva*, v.19, n.12, p.4637-4648, 2014.
- NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH -NIOSH. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). Hydrocarbons, Aromatic: Method 1501. 4ª Edição, [15 de Mar de 2003] v.3, p.2-7.
- 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.; VARGAS, E.A.JR.; GUIMARÃES, J.R., DE CAMPOS, T.M.; NUNES, C.M.; COSTA, A.; ANTUNES, F.S.; DA SILVA, M.I.; MANO, D.M. Evaluation of bioventing on a gasoline-ethanol contaminated undisturbed residual soil. *J Hazard Mater*, v.110, n.1-3, p.63-76, 2004.
- ÖSTLING, O. & JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.123, p.291–298, 1984.
- PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO. Secretaria Municipal de Urbanismo (SMU). Disponível em: <<http://www.rio.rj.gov.br/web/smu/exibeconteudo?id=4481419>> Acesso em: 04 fev. 2015.
- RANA, S.V.S. & VERMA, Y. Biochemical toxicity of benzene. *Journal of Environmental Biology*, v.26, p.157–168, 2005.

- REKHADEVI, P.V.; RAHMAN, M.F.; MAHBOOB, M.; GROVER, P. Genotoxicity in filling station attendants exposed to petroleum hydrocarbons. *Ann Occup Hyg.* v.54, n.8, p.944-954, 2010.
- RIBEIRO, N.C. Uso da turfa como material alternativo na formação de componentes eletrônicos de baixo custo. Dissertação [Mestrado em engenharia elétrica] - Faculdade de Tecnologia da Universidade de Brasília (UnB); 2012.
- RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal.* v.21, n.3, p.133-149, 2005.
- RIBEIRO, L.R. *Mutagenese Ambiental*. Editora SBMCTA, 1º Edição, 2003.
- SANTOS-MELLO, R. & CAVALCANTE, B. Cytogenetic studies on gas station attendants. *Mutat Res*, v.280, n.4, p.285-90, 1992.
- SANTOS, M.V.C.; FIGUEIREDO, V.O.; ARCURI, A.S.A.; COSTA-AMARAL, I.C.; GONÇALVES, E.S.; LARENTIS, A.L. Aspectos toxicológicos do benzeno, biomarcadores de exposição e conflitos de interesses. *Rev Bras Saude Ocup*, v.42, supl.1:e13s, 2017.
- SIES, H. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press, 1991.
- SILVA JÚNIOR, F.C.; ODONGO, F.C.A.; DULLEY, F.L. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v.31, Supl. 1, p.53-58, 2009.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp. Cell. Res.*, v.175, p.184-191, 1988.
- SNYDER, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. *Drug Metab. Rev.*, v.36, p.531-47, 2004.
- SNYDER, R. Benzene's toxicity: a consolidated short review of human and animal studies by HA Khan. *Hum. Exp. Toxicol.*, v.26, p.687-96, 2007.

- SNYDER, R. Leukemia and benzene. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v.9, p.2875–93, 2012.
- SPEIT, G.; SCHÜTZ, P.; BONZHEIM, I.; TRENZ, K.; HOFFMANN, H. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett.*, v.146, n.2, p.151-8, 2004.
- THEML, Harald; DIEM, Heinz; HAFERLACH, Torsten. *Color Atlas of Hematology. Practical Microscopic and Clinical Diagnosis*. 2^a Edição revisada. New York: Thieme Stuttgart, 2004. 2-8p.
- TREVISAN, P.; SILVA, J. N.; SILVA, A, P.; ROSA, R. F. M.; PASKULIN, G. A.; THIESEN, F. V.; OLIVEIRA, C. A. V.; ZEN, P. R. G. Evaluation of genotoxic effects of benzene and its derivatives in workers of gas stations. *Environmental Monitoring Assessment*. v.186, p.2195-2204, 2014.
- 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.; SIRIWONG, W.; RUNGSIYOTHIN, A.; NOPPARATBUNDIT, S. 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.
- USBERCO, J. , SALVADOR, E. *Química 3 - Química Orgânica. Volume 3*. 6. ed. reform.- São Paulo: Saraiva, 2000.
- VALENTE, D.; COSTA-AMARAL, I.C.; CARVALHO, L.V.B.; SANTOS, M.V.C.; CASTRO, V.S.; RODRIGUES, D.R.F.; De FALCO, A.; SILVA, C.B.; NOGUEIRA, S.M.; GONÇALVES, E.S.; MOREIRA, J.C.; ANDRÉ, L.C.; TEIXEIRA, L.R.; SARCINELLI, P.N.; SISENANDO, H.A.; OLIVEIRA, M.S.; PERINI, J.A.; MATTOS, R.C.O.C.; LARENTIS, A.L. 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*, 2017.

- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.
- VLAANDEREN, J.; LAN, Q.; KROMHOUT, H.; ROTHMAN, N.; VERMEULEN, R. Occupational Benzene Exposure and the Risk of Lymphoma Subtypes: A Meta-analysis of Cohort Studies Incorporating Three Study Quality Dimensions. *Environmental Health Perspectives*, v.119, n.2, 2011.
- VYSKOCIL, A.; TRUCHON, G.; LEROUX, T.; LEMAY, F.; GENDRON, M.; GAGNON, F.; MAJIDI, N.E.; BOUDJERIDA, A.; LIM, S.; EMOND, C.; VIAU, C. A weight of evidence approach for the assessment of the ototoxic potential of industrial chemicals. *Toxicol Ind Health.*, v.28, n.9, p.796-819, 2012.
- 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.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Environmental Health Criteria. 222. Biomarkers in risk assessment : validity and validation. ICPS, Geneva, 2001.
- YOON, B.I.; HIRABAYASHI, Y.; KAWASAKI, Y.; KODAMA, Y.; KANEKO, T.; KIM, D.Y.; INOUE, T. Mechanism of action of benzene toxicity: cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Experimental Hematology*, v.29, p.278–285, 2001.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

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 dos 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).

Informo 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 Ernani Braga – Térreo – Mangunhos - Telefax: (0xx) (21) 2598-2863 - E-mail: cep@ensp.fiocruz.br - Site: <http://www.ensp.fiocruz.br/ética>

MÓDULO 2: INFORMAÇÕES SOBRE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

(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 ? (CNAE)	O QUE FAZIA? (CBO)	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?

1-Sim

0-Não (Passe para a pergunta 30)

9-NS/NR

(28) Quantos dias na semana o sr (a) tem de folga?

nº de dias da semana |__|__|

9-NS/NR

(29) Suas folga (s) são em dias fixos ou alternados?

1-Fixo

2-Alternado

9-NS/NR

(30) Quais desses procedimentos o sr (a) realiza durante o seu trabalho? ENTREVISTADOR LEIA

TODAS AS OPÇÕES

- A- Uso do paninho 1-Sim 0-Não 9-NS/NR
- B- Aproxima o rosto quando abastece até a boca 1-Sim 0-Não 9-NS/NR
- C- Cheira a tampa do carro antes de abastecer 1-Sim 0-Não 9-NS/NR
- D- Confia no bico automático 1-Sim 0-Não 9-NS/NR
- E- Aspira combustíveis com a mangueira 1-Sim 0-Não 9-NS/NR
- F- Roupas molhadas de combustível 1-Sim 0-Não 9-NS/NR
- G- Lava carros 1-Sim 0-Não 9-NS/NR
- H- Uso do querosene ou outra substância para dar brilho no carro 1-Sim 0-Não 9-NS/NR
- I- Outro?
- II- 1-Sim Qual: _____ 0-Não 9-NS/NR

(31) Quais combustíveis o sr(a) abastece? ENTREVISTADOR LEIA TODAS AS OPÇÕES

- 1-Gasolina Comum 4-Etanol 9-NS/NR
- 0-Gasolina Aditivada 5-GNV
- 3-Diesel 6-Outros: _____

(32) O sr(a) realiza (ou) coleta de amostras do caminhão tanque?

- 1-Sim
- 0-Não (Passe para a **questão 35**) 2- Continua realizando
- 9-NS/NR

(33) Caso o sr(a) tenha realizado amostras no caminhão tanque, por quanto tempo fez isto?

Tempo: |__||__| meses / anos

Quantas vezes na semana |__||__|

(34) O sr(a) usa equipamentos diferentes do uniforme durante as coletas do caminhão tanque?

1-Sim Quais: _____

0-Não

9-NS/NR

(35) O sr(a) realiza análise de qualidade do combustível a partir das amostras do caminhão tanque?

1-Sim Há quanto tempo: |__||__| meses / anos Quantas vezes na semana |__||__|

0-Não 9-NS/NR

(36) Onde são armazenadas as amostras de combustíveis?

A- escritório B- sala de refeição/refeitório C- loja de conveniência D- banheiro

E- sala exclusiva para armazenar combustível F- outro local fora do posto

G-

Outros:Quais: _____

9-NS/NR

(37) O sr(a) realiza ou já realizou medição manual (com régua) dos níveis dos tanques do subsolo?

1-Sim Como: _____

0-Não (Passe para a **questão 40**)

9- NS/NR

(38) Por quanto tempo o sr(a) realizou este tipo de medição dos níveis dos tanques do subsolo?

Tempo: |__||__| meses / anos Quantas vezes na semana |__||__|

9-NS/NR

(39) O sr(a) fez uso de algum equipamento além do uniforme durante a medição dos níveis dos tanques do subsolo?

1-Sim Quais: _____

0-Não 9-NS/NR

(40) O sr(a) já realizou limpeza da caixa separadora de água e óleo?

1-Sim - Por quanto tempo? | __ || __ | meses / anos 2- Continua realizando

Quantas vezes na semana | __ || __ |

0-Não

9-NS/NR

(41) O sr(a) já realizou troca de óleo de carro?

1-Sim – Por quanto tempo? | __ || __ | meses / anos 2- Continua realizando

Quantas vezes na semana | __ || __ |

0-Não

9-NS/NR

(42) O sr(a) já realizou aferição da bomba de combustível?

1-Sim – Por quanto tempo? | __ || __ | meses / anos 2- Continua realizando

Quantas vezes na semana | __ || __ |

0-Não

9-NS/NR

(43) O sr(a) já realizou drenagem da bomba de combustível? (sump da bomba)

1-Sim – Por quanto tempo? | __ || __ | meses / anos 2- Continua realizando

Quantas vezes na semana | __ || __ |

0-Não

9-NS/NR

(44) Algumas desses eventos foram sofridos pelo sr (a) nesta função? vezes?	Quantas			
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? <u>Entrevistador:</u> <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

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

<p>45. O (a) sr(a) tem contato ou sente o cheiro de?</p>	<p>46. Com que frequência o (a) sr(a) tem contato ou sente cheiro de? <u>Entrevistador:</u> <u>Leia as alternativas</u></p>
<p>H. Produtos de Limpeza especificar: _____ _____ <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR</p>	<p><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</p>

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

PERCEPÇÃO DO ENTREVISTADOR:

A - Confiança nas respostas:

- Confio totalmente
- Confio Parcialmente
- Não Confio

OBSERVAÇÕES: _____

ANEXO III

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DO AMBIENTE DE TRABALHO DE PRC

IDENTIFICAÇÃO DO POSTO: _____ _____
DATA DA ENTREVISTA: ____/____/____
ENTREVISTADOR: _____
ENTREVISTADO: _____
CARGO: _____

1. DADOS GERAIS DA EMPRESA

Razão Social:		
Nome Fantasia:		
CNPJ:	CNAE*:	Data de início de operação:
Horário de funcionamento do PRCV*:	Bairro/Distrito:	Município:
CEP:	Telefone:	FAX:
Endereço:		
Bandeira:	Autorização de funcionamento da ANP*:	

Alvará de Funcionamento:	Tem Licença Ambiental: () Sim () Não	Licença de Operação Válida: () Sim () Não Validade:
PCMSO*: () Sim () Não		
PPRA*: () Sim () Não		
Restrição da Licença de Operação:		
Há uso de água subterrânea no local? () Sim () Não		
Nome do responsável legal:		

CNAE: Classificação Nacional de Atividades Econômicas

ANP: Agência Nacional do Petróleo

PRCV: Posto de Revenda de Combustível no Varejo

PCMSO: Programa de Controle Médico e Saúde Ocupacional

PPRA: Programa de Prevenção de Riscos Ambientais

2. LISTA DE TRABALHADORES

ÁREA	SEXO		Total
	Masculino	Feminino	
Administrativa			
Pista			
Troca de óleo			
Lavagem de veículo			
Outras			
Total			

2.1 - JORNADA DE TRABALHO

Setor	Período			Duração da jornada diária (horas)	Tipo de turno	
	M	T	N		Fixo	Variável
Administrativa						
Pista						
Troca de óleo						
Lavagem de veículo						
Outras						

3. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ECONÔMICA

3.1 - SERVIÇOS PRESTADOS NA ÁREA DO PRCV (ALÉM DO ABASTECIMENTO)

Serviço	SIM	NÃO
Lavagem de veículos		
Troca de óleo		
Borracharia		
Loja de Conveniência e Lanchonete		
Restaurante		
Outros:		

4. PRODUTOS COMERCIALIZADOS

4.1 - COMBUSTÍVEIS AUTOMOTIVOS

Tipo	Nº Tanques	Capacidade total (L)	Nº de bicos de abastecimento	Quantidade média comercializada por mês	Nº de abastecimentos dos tanques por semana
Gasolina especial					
Gasolina comum					
Etanol					
Diesel					
GNV (m ³)	xxx	xxx			xxx

Porte do PRCV/PA em função da capacidade de armazenamento de combustível (1000 L = 1 m³):

() Micro (≤ 60 m³) () Pequeno (> 60 e ≤ 120 m³) () Médio (> 120 e ≤ 180 m³)

() Grande (> 180 e ≤ 220 m³) () Excepcional (> 220 m³)

4.2 - OUTROS PRODUTOS OFERTADOS NA ÁREA DE ABASTECIMENTO

() Alimentos

() Extintor de incêndio

() Gelo

() Bebidas

() Galão de água

() Água potável por meio de bebedouro

() Óleo lubrificante

Outros _____

5. CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS, DAS OPERAÇÕES E EQUIPAMENTOS DO PRCV

5.1 - BOMBAS DE ABASTECIMENTO

Item	Sim	Não	Observações
Bomba automática			
Bico automático			
Bico com proteção contra respingo			
Uso de flanela ou outro material para proteção de respingo			

5.3 - DESCARREGAMENTO DE COMBUSTÍVEIS E TESTE DE QUALIDADE

Item	Sim	Não	Observações
Os trabalhadores que acompanham o descarregamento possuem ciência dos procedimentos de segurança para descarregamento por escrito?			
Há armazenagem das amostras?			
Quando ocorre o descarregamento, é feito teste de qualidade?			
O descarte das amostras é feito por quem? Como?			
Frequência do descarregamento:			

5.4 – MEDIÇÃO DE NÍVEL DOS TANQUES

Item	Sim	Não	Frequência
Eletrônica			
Uso de régua de medição			

Nota: Obter informação dos dois itens (eletrônica e uso de régua de medição, quando houver)

6. MEDIDAS DE PROTEÇÃO

Item	Sim	Não	Observações
Tanques providos de válvulas no respiro			
Respiros providos de filtro			
Procedimentos para contenção de pequenos derrames no abastecimento			
Kit para pequenos derrames			
Extintores de incêndio			
Sinalização de segurança (horizontal e vertical; placas de advertência e de risco)			
Procedimento de limpeza nas bombas?			

7. TREINAMENTOS

Item	Sim	Não	Frequência	Data do último treinamento
Treinamento de combate a incêndio				
Treinamentos em segurança do trabalho				
Treinamento de CIPA* ou designado				
Treinamento operacional das atividades desenvolvidas				
Outros (especificar):				

*CIPA: Comissão Interna de Prevenção de Acidentes

8. UNIFORME

Item	Sim	Não	Observação
Fornecimento de uniforme pelo empregador sem custo para o trabalhador			Incluir quantidade:
Uniforme possui faixa refletora			() Sim () Não
Higienização do uniforme realizado pelo Empregador			Onde e periodicidade:

9. EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA

Item	Sim	Não	Observações
Existem equipamentos de proteção coletiva			
Se sim, quais:			
Sistema de exaustão na atividade de descarga			
Sistema de exaustão na bomba de abastecimento			
Sistema de exaustão na atividade de análise da qualidade do combustível			
Outros (especificar):			

10. EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL

<div style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">FUNÇÃO</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-left: 100px;">EPI</div> </div>	Máscaras (Respiradores)	Óculos de segurança	Calçados de segurança	Luvas	Protetores auriculares	Aventais impermeáveis
	GERAL					

(N = Não / S = Sim)

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A INSPEÇÃO

Considerações sobre a veracidade das informações fornecidas pelo entrevistado:

Local e data:

Assinatura do Entrevistador

ANEXO IV
QUESTIONÁRIO CLÍNICO

Nº do Posto _ _ _ _	Nº Questionário _ _ _ _
Data da Entrevista: ____/____/____	
Nome do paciente: _____	
<i>ENTREVISTADOR:</i> _____	
Supervisor: _____	I _ I _ I
Codificador: _____	I _ I _ I
Digitador: _____	_ _

MÓDULO 1: ANAMNESE CLÍNICA	
HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA	
(1) Doenças Cardiovasculares: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não Sabe	
(1.1) Qual(is): _____	
(1.2) Quando? Ano: _____	
(2) Doenças Infeciosas: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não Sabe	
(2.1) Qual(is): _____	
(2.2) Quando? Ano: _____	
(3) Doenças Neurológicas: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não Sabe	
(3.1) Qual(is): _____	
(3.2) Quando? Ano: _____	
(4) Doenças Respiratórias: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não Sabe	
(4.1) Qual(is): _____	
(4.2) Quando? Ano: _____	
(5) Doenças Gastrointestinais: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não Sabe	
(5.1) Qual(is): _____	
(5.2) Quando? Ano: _____	

(6) Doenças Hepáticas:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não Sabe
(6.1) Qual(is):	_____		
(6.2) Quando? Ano:	_____		
(7) Doenças Renais:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não Sabe
(7.1) Qual(is):	_____		
(7.2) Quando? Ano:	_____		
(8) Doenças Hematológicas:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não Sabe
(8.1) Qual(is):	_____		
(8.2) Quando? Ano:	_____		
(9) Doenças Endócrinas:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não Sabe
(9.1) Qual(is):	_____		
(9.2) Quando? Ano:	_____		
(10) Doenças Psíquicas:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não Sabe
(10.1) Qual(is):	_____		
(10.1) Quando? Ano:	_____		
(11) Doenças Osteoarticulares:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não Sabe
(11.1) Qual(is):	_____		
(11.1) Quando? Ano:	_____		
(12) Doenças Uro/ginecológicas:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não Sabe
(12.1) Qual(is):	_____		
(12.1) Quando? Ano:	_____		
(13) Doenças Otorrinolaringológicas:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não Sabe
(13.1) Qual(is):	_____		
(13.1) Quando? Ano:	_____		
(14) Doenças da Visão:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não Sabe
(14.1) Qual(is):	_____		
(14.1) Quando? Ano:	_____		
(15) Doenças da Pele:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não Sabe
(15.1) Qual(is):	_____		
(15.1) Quando? Ano:	_____		

(16) Neoplasias:	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não Sabe
(16.1) Qual(is):	_____
(16.1) Quando? Ano:	_____
(17) Internações:	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
(17.1) Motivo(s):	_____
(17.2) Quando? Ano:	_____
(18) Cirurgias:	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
(18.1) Motivo(s):	_____
(18.2) Quando? Ano:	_____
(19) Transfusão de sangue ou derivados:	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
(19.1) Motivo(s):	_____
(19.2) Ano da transfusão:	_____

HISTÓRIA PATOLÓGICA ATUAL	
(20) Diagnóstico de Hipertensão Arterial:	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não Sabe
(20.1) Faz uso de remédios para controle da pressão arterial?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não Sabe
(20.2) Caso afirmativo, faz uso de forma regular?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não Sabe
(20.3) Quais os remédios que usa para controle da pressão arterial?	_____
(20.2) Há quanto tempo utiliza esses remédios : __ __	<input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ignorado
(21) Diagnóstico de Diabete Mellitus:	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não Sabe
Tipo: 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/>	
(21.1) Faz uso regular de qual(is) medicações:	_____
(21.2) Há quanto tempo : __ __	<input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ignorado

(22) Tem outro(s) problema(s) de saúde diagnosticado(s) por médico? Sim Não
 Não Sabe

(22.1) Qual: _____ (22.1.1) Início: ___/___/___

(22.1.2) Usa alguma medicação regularmente: Sim Não Não Sabe

(22.1.3) Qual(is) medicamento(s): _____

(22.2.1) Início: ___/___/___

HISTÓRIA REPRODUTIVA	
MULHERES	
(23) Possui filhos: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Motivo: _____	
(24) Número de Gestações: __ __ Gestações (No caso de nenhuma gestação, marcar "00" e passar para a questão 25)	
(24.1) Número de Partos: __ __	
(24.1.1) Número de Natimortos: __ __	(24.1.2) Número de Nascidos Vivos: __ __
(24.1.2.1) Nascidos Vivos Sadios: __ __	
(24.1.2.2) Nascidos Vivos Não Sadios: __ __ Qual doença (inclusive má formação)? _____	
(24.2) Número de Abortos: __ __ <input type="checkbox"/> Provocados __ __ <input type="checkbox"/> Espontâneos	
(24.2.1) Período em que ocorreu (ram) a(s) perda(s) gestacional (is): __ __ 1.º Trimestre __ __ 2.º Trimestre __ __ 3.º Trimestre	
(25) Idade em que ocorreu a primeira menstruação: __ __ Anos <input type="checkbox"/> Não se aplica	

<p>(26) Idade em que parou de menstruar: __ __ Anos <input type="checkbox"/> Não se aplica</p> <p>(26.1) Há quanto tempo parou de menstruar? __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ignorado</p> <p>(26.2) Por que você não menstrua mais? <input type="checkbox"/> 1 – Menopausa natural; 2 – Cirurgia para retirada de útero ou ovários; 3 – Outros tratamentos (hormônios, quimioterapia ou radiação); 4 – Outra razão – especificar:_____</p>
Homens
<p>(27) Possui filhos: <input type="checkbox"/> Sim</p> <p><input type="checkbox"/> Não. Motivo: _____</p> <p>(27.1) Caso afirmativo, quantos? _____</p> <p>(27.2) Todos são saudáveis? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não Sabe</p> <p>(27.3) Caso negativo, qual ou quais doenças? _____</p>

MÓDULO 2:ESTILOS DE VIDA	
TABAGISMO	
<p>(28) Você é:</p> <p><input type="checkbox"/> Tabagista <input type="checkbox"/> Ex-tabagista (Passe para a questão 30) <input type="checkbox"/> Nunca fumou (Passe para a questão 33)</p>	
<p>(29) Quantos cigarros você fuma por dia?</p> <p><input type="checkbox"/> menos de 10 <input type="checkbox"/> de 11 a 20 <input type="checkbox"/> 21 a 30 <input type="checkbox"/> mais de 30</p>	
<p>(30) Há quanto tempo você parou de fumar:</p> <p> __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.</p>	<p>(31) Durante quanto tempo você fumou:</p> <p> __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.</p>
<p>(32) Quando você fumava, quantos cigarros você fumava, em média, por dia:</p> <p> __ __ Cigarros por dia __ __ Maços por dia __ Não sabe/Não respondeu/Variável</p>	

CONSUMO DE ALCOOL	
(33) Você costuma ingerir bebidas alcoólicas? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não (passe para 40) <input type="checkbox"/> Parei de beber (passe para questão 37) <input type="checkbox"/> Nunca bebi (passe para questão 40)	
(34) Que tipo de bebida alcoólica você bebe? <input type="checkbox"/> Cerveja <input type="checkbox"/> Vinho <input type="checkbox"/> Cachaça <input type="checkbox"/> Vodka <input type="checkbox"/> Outras: _____	
(35) Qual freqüência do seu consumo de bebidas alcoólicas? <input type="checkbox"/> 1-2 x semana <input type="checkbox"/> 3-4x semana <input type="checkbox"/> 5 a 6 vezes por semana <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Outra: _____	
(36) Em média, quantas doses por dia, por semana ou mês o sr (a) consome? <input type="checkbox"/> 1 a 3 doses por mês <input type="checkbox"/> 1 dose por semana <input type="checkbox"/> 2 a 6 doses por semana <input type="checkbox"/> 1 dose por dia <input type="checkbox"/> 2 doses por dia <input type="checkbox"/> 3 doses por dia <input type="checkbox"/> 4 ou mais doses por dia <input type="checkbox"/> NS/NR	
(37) Há quanto tempo você parou de beber: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.	(38) Durante quanto tempo você bebeu: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.
(39) Quando você bebia, quantos doses você bebia, em média, por dia: __ __ Bebida: _____	
Consumo de outras Substâncias Psicoativas	
(40) Atualmente usa drogas: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não (Passe para a questão 44)	
(41) Qual(is): _____	
(42) Freqüência: <input type="checkbox"/> 1 a 2 vezes por semana <input type="checkbox"/> 3 a 4 vezes por semana <input type="checkbox"/> 5 a 6 vezes por semana <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Outra: _____	
(43) Há quanto tempo usa drogas: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.	
(44) Já usou drogas: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não (Passe para a questão 49)	
(45) Qual(is): _____	
(46) Com que freqüência usou drogas: <input type="checkbox"/> 1 a 2 vezes por semana <input type="checkbox"/> 3 a 4 vezes por semana <input type="checkbox"/> 5 a 6 vezes por semana <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Outra: _____	
(47) Por quanto tempo usou drogas: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.	

(48) Há quanto tempo deixou de usar drogas: |__|__| D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.

MÓDULO 3: HISTÓRIA FAMILIAR

(49) Alguém da sua família já teve câncer: Sim
 Não (Passe para a questão 63)

(49.1) Quem da sua família teve câncer:

- Pai. Qual(is) tipo(s)? _____
- Mãe. Qual(is) tipo(s)? _____
- Avô. Qual(is) tipo(s)? _____
- Avó. Qual(is) tipo(s)? _____
- Irmão(ã). Qual(is) tipo(s)? _____
- Filho(a). Qual(is) tipo(s)? _____
- Esposo(a). Qual(is) tipo(s)? _____
- Outro: _____. Qual(is) tipo(s)? _____

(49.2) Outras doenças familiares : _____

MODULO 4: SINAIS E SINTOMAS

DATA DA CONSULTA: |__|__|__|__|__|__|__|__|

(50) Emagrecimento <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica	(50.1) Há quanto tempo atrás: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign <input type="checkbox"/> De forma inexplicada (50.2) Quantos kg: __ __
(51) Fraqueza <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir	(51.1) Há quanto tempo atrás: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign <input type="checkbox"/> De forma inexplicada
(52) Tontura <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir	(52.1) Há quanto tempo atrás: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign <input type="checkbox"/> De forma inexplicada
(53) Sonolência <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir	(53.1) Há quanto tempo atrás: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign <input type="checkbox"/> De forma inexplicada

Sistema Nervoso Central e Periférico

(54) Cefaléia <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica	(54.1) Há quanto tempo: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(55) Irritabilidade <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica (Nervosismo)	(55.1) Há quanto tempo: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(56) Ansiedade <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> excessiva	(56.1) Há quanto tempo: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(57) Insônia <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica	(57.1) Há quanto tempo: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(58) Alteração de Humor <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica (Depressão)	(58.1) Há quanto tempo: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(59) Alteração da atenção <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica	(59.1) Há quanto tempo: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(60) Alteração da memória <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir	(60.1) Há quanto tempo: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(61) Sudorese noturno <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica	(61.1) Há quanto tempo: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(62) Formigamentos <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica (MMSS e/ou MMII)	(62.1) Há quanto tempo: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign

<p>(63) Espasmos <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Não sabe</p> <p><input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> Musculares</p> <p>Involuntários</p>	<p>(63.1) Há quanto tempo:</p> <p> __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign</p>
<p>(64) Tremores <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Não sabe referir</p> <p><input type="checkbox"/> Não se aplica (MMSS e/ou MMII)</p>	<p>(64.1) Há quanto tempo:</p> <p> __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign</p>
<p>(65) Cãibras <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Não sabe referir</p> <p><input type="checkbox"/> Não se aplica</p>	<p>(65.1) Há quanto tempo:</p> <p> __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign</p>
<p>(66) Diminuição de força muscular <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>	<p>(66.1) Locais: _____</p> <p>(66.2) Há quanto tempo:</p> <p> __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign</p>
<p>(67) Convulsões <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>	<p>(67.1) Tipo: _____</p> <p>(67.2) Há quanto tempo:</p> <p> __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign</p>
SISTEMA HEMATOLÓGICO E SISTEMA IMUNOLÓGICO	
<p>(68) Petéquias:</p> <p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir</p> <p><input type="checkbox"/> Não se aplica</p>	<p>(68.1) Há quanto tempo:</p> <p> __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign</p>
<p>(69) Hematomas</p> <p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir</p> <p><input type="checkbox"/> Não se aplica</p>	<p>(69.1) Há quanto tempo:</p> <p> __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign</p>
<p>(70) Epistaxe</p> <p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir</p> <p><input type="checkbox"/> Não se aplica</p>	<p>(70.1) Há quanto tempo:</p> <p> __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign</p>

ECTOSCOPIA

(71) Irritação Ocular <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe referir <input type="checkbox"/> Não se aplica		(71.1) Há quanto tempo: __ __ <input type="checkbox"/> D-Dia; M-Mês; A- Ano; I-Ign
(72) Orientado: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(73) Lúcido: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
(74) Fácies: <input type="checkbox"/> atípico <input type="checkbox"/> inexpressivo <input type="checkbox"/> indiferente <input type="checkbox"/> tristeza <input type="checkbox"/> euforia <input type="checkbox"/> ansiedade <input type="checkbox"/> outra:_____		
(75) Marcha: <input type="checkbox"/> atáxica <input type="checkbox"/> parética <input type="checkbox"/> em bloco <input type="checkbox"/> miopática <input type="checkbox"/> misto <input type="checkbox"/> outra:_____		
(76) Deformidades: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual:_____		
(77) Equilíbrio: Dinâmico: <input type="checkbox"/> normal Estático: <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> alterado <input type="checkbox"/> alterado		
(78) Tremores: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não → Onde: <input type="checkbox"/> facial <input type="checkbox"/> membro superior <input type="checkbox"/> membro inferior <input type="checkbox"/> outro(s): _____		
(79) Pupilas isocóricas: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não (80) Dificuldade para enxergar: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
(81) Nistagmus: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(82) Diplopia: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(83) Acomodação: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
(84) Disfonia: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
(85) Mucosas: <input type="checkbox"/> coradas <input type="checkbox"/> descoradas	(86) Icterícia: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
(87) Gânglios palpáveis: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não → Quais: <input type="checkbox"/> submandibular <input type="checkbox"/> pescoço <input type="checkbox"/> axilares <input type="checkbox"/> inguinais <input type="checkbox"/> outro(s): _____		
(88) Lesões de pele: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não → Quais: <input type="checkbox"/> manchas <input type="checkbox"/> furúnculos <input type="checkbox"/> pruridos <input type="checkbox"/> dermatite irritativa <input type="checkbox"/> eritema <input type="checkbox"/> outra(s): _____		
(89) Acne: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não (89.1) Localização: _____ (89.2) Extensão: _____		
(90) Manchas: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não (90.1) Localização: _____ (90.2) Descrição: _____		

(91) Edemas: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não → Onde: _____
(92) Fâneros <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado → Qual: _____
(93) Tireóide: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado → Qual: _____

APARELHO CARDIOVASCULAR (ACV)

(94) Pressão Arterial: _ _ _ _ x _ _ _ _ mmHg	(95) Frequência Cardíaca: _ _ _ bpm
--	---------------------------------------

(96) Temperatura: _ _ _ .°C	(97) Altura: _ _ _ cm	(98) Peso: _ _ _ kg
-------------------------------	-------------------------	-----------------------

(99) Estase Jugular: Sim Não

APARELHO CARDIOVASCULAR (ACV)

(100) Ritmo cardíaco: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado	(101) Sopros: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(102) Bulhas normofonéticas: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
--	---	--

(103) Bulhas Extras: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(104) Pulso Radial Esquerdo: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado
--	--

APARELHO RESPIRATÓRIO (AR)

(105) Deformidade torácica: Sim Não → Qual: _____

(106) Eupnéico Taquipnéico ipm _____

(107) Murmúrio Vesicular bem distribuído: Sim Não → Por que? _____

(108) Percussão: Normal Anormal → Por que? _____

ABDÔMEN

(109) Plano: Sim Escavado Globoso

(110)	Cicatrizes:	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	→
Qual: _____						
(111)	Massas palpáveis:	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	→
Qual: _____						
(112)	Fígado	palpável:	<input type="checkbox"/>	Sim.	Descrição:	

<input type="checkbox"/> Não						
(113)	Baço	palpável:	<input type="checkbox"/>	Sim.	Descrição:	

<input type="checkbox"/> Não						
ASSISTÊNCIA MÉDICA						
(114-) Outros locais onde busca atendimento médico:						
<input type="checkbox"/>	PSF.					Qual?

<input type="checkbox"/>	Outra unidade de saúde do SUS (que não seja PSF).					Qual?

<input type="checkbox"/>	Hospital		privado.			Qual?

<input type="checkbox"/>	Clínicas		particulares.			Qual?

MODULO 5: RESULTADOS EXAMES LABORATORIAIS

TIPO DE EXAME	DATA DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES					
	__/__/__		__/__/__		__/__/__	
HEMOGRAMA COMPLETO	Resultados	Alterado	Resultados	Alterado	Resultados	Alterado
Reticulócitos		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
SÉRIE VERMELHA: Hemáceas		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
VCM:		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
HCM:		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
CHCH:		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Eritrócitos:		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
SÉRIE BRANCA: Leucócitos		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Plaquetas		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

MODULO 5: RESULTADOS EXAMES LABORATORIAIS

TIPO DE EXAME	DATA DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES				
	__/__/__				
TGO ou AST	Resultados	Alterado	PROTEINA C REATIVA	Resultados	Alterado
TGP ou ALT		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	FAN		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
CREATININA SÉRICA		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Anti-HBS Ag		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
GGT		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Anti-HBC		
BILIRRUBINA		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Anti- HCV		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
LDH		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Anti-HIV		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
PROVA DE ATIVIDADE REUMÁTICA		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			