

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARIA AUGUSTA AMARAL CAMPOS

**TESTE COMETA: VALIDAÇÃO DO MÉTODO E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO  
OCUPACIONAL AO BENZENO PRESENTE NA GASOLINA ATRAVÉS DOS  
BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E GENOTOXICIDADE**

Belo Horizonte – MG

2013

MARIA AUGUSTA AMARAL CAMPOS

**TESTE COMETA: VALIDAÇÃO DO MÉTODO E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO  
OCUPACIONAL AO BENZENO PRESENTE NA GASOLINA ATRAVÉS DOS  
BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E GENOTOXICIDADE**

Dissertação apresentada como requisito parcial, à obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Orientadora:** Profa. D<sup>a</sup>. Ana Paula Fernandes  
FAFAR/UFMG

**Coorientadora:** Profa. D<sup>a</sup>. Leiliane Coelho André  
FAFAR/UFMG

Belo Horizonte – MG

C355t Campos, Maria Augusta Amaral.  
Teste Cometa: validação do método e avaliação da exposição ocupacional ao benzeno presente na gasolina através dos biomarcadores de exposição e genotoxicidade / Maria Augusta Amaral Campos. – 2013.  
78 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Fernandes.  
Co-orientadora: Profa. Dra. Leiliane Coelho André.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Teste Cometa – Teses. 2. Compostos orgânicos voláteis – Teses. 3. Benzeno – Teses. 4. Toxicologia – Testes – Teses. 5. Validação de método – Teses. I. Fernandes, Ana Paula. II. André, Leiliane Coelho. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.9

Dedico este trabalho aos meus pais, que mais do que me proporcionar uma boa infância e adolescência, sempre se esforçaram para me oferecer o melhor, formaram os fundamentos do meu caráter e me ensinaram a importância de uma vida humilde, simples e de fé. Obrigada por serem a minha referência de tantas maneiras e estarem sempre presente na minha vida de forma indispensável, mesmo nos momentos que eu não acreditava ter forças para continuar os meus sonhos, foram vocês que me mostraram que não há conquista sem esforço.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lú e Edvar, pelo apoio, incentivo e ajuda de sempre. Aos meus irmãos pelo companheirismo, em especial à Lindaura, irmã de coração, que não mediu esforços para me auxiliar em todos meus projetos. Vocês passaram alegrias e tristezas ao meu lado, e esta conquista não é só minha, mas de todos vocês.

A minha família, avós, tios e primos, pelas conversas animadoras. Ao "tio Carlinhos", que colaborou e foi parte muito importante deste projeto.

Aos meus amigos, do mestrado, da faculdade, do trabalho, da vida. Obrigado pela paciência, afinal nossas conversas eram centradas em um só tema, o mestrado. Vocês nunca deixaram que o desânimo e o cansaço batessem na minha porta.

As minhas orientadoras, Ana Paula e Leiliane, que possibilitaram a realização deste sonho. Leiliane, obrigado pela confiança e por acreditar na minha capacidade.

Aos professores do ACT, que direta e indiretamente participaram do projeto, tirando dúvidas, oferecendo soluções, compartilhando ideias. À Josianne, que com seus conhecimentos, me ensinou e forneceu ferramentas para o estudo.

A todos os voluntários, frentistas, analistas do LEC e estudantes, por possibilitar que este projeto saísse do papel.

Ao laboratório de Irradiação Gama - LIG do CDTN e toda a sua equipe, pela excelência de dedicação dos serviços prestados e ao Laboratório do professor Doutor Ricardo Gazzinelli, por disponibilizar os equipamentos necessários à pesquisa.

À Deus, não por último, mas aquele que foi o início e o final desta etapa, e sempre estará presente em minha vida, devo a Ele todas as minhas vitórias, pois nenhum obstáculo se mostrou grande, quando passei a confiar em ti.

*"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos."*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

Através do contato com a gasolina, frentistas e analistas de combustíveis estão expostos a vários compostos orgânicos voláteis, que dentre eles destaca-se o benzeno, devido sua importância toxicológica. O benzeno é um agente mielotóxico, carcinogênico e classificado como grupo I pela International Agency of Research on Câncer (IARC). A sua interação com moléculas de DNA pode indicar um dano precoce permitindo estabelecer medidas de proteção à saúde da população exposta. O ensaio cometa é um método altamente sensível para detectar danos no DNA induzidos por exposição ambiental e ocupacional por agentes mutagênicos. O objetivo do presente estudo foi validar o Teste Cometa utilizando irradiação Gama para medir os danos genotóxicos induzidos em linfócitos do sangue periférico, além de avaliar a exposição ocupacional ao benzeno presente na gasolina através da análise e comparação deste biomarcador e o biomarcador de exposição do benzeno – ácido *trans, trans* mucônico urinário (AttM). O ensaio cometa mostrou que o Índice de Dano (ID) do grupo exposto ( $28,4 \pm 10,1$ ) foi significativamente maior em relação ao grupo controle ( $18,4 \pm 10,1$ ), assim como os valores de AttM urinário foram significativamente maior no grupo exposto ( $1,13 \pm 0,45 > 0,44 \pm 0,33$ ). Além disso, os valores encontrados de AttM urinário apresentaram uma boa correlação com o índice de dano no DNA ( $K > 0,70$ ). A exposição ocupacional relacionada com os combustíveis pode ocasionar um aumento do risco de dano genético entre os indivíduos deste setor, portanto, é de suma importância esta análise para estudar os riscos à saúde, além de ser uma ferramenta estratégica para melhorar as condições de segurança e qualidade de vida dos trabalhadores.

**Palavras chaves:** Teste cometa, Ácido *trans, trans* mucônico urinário, frentistas e analistas de combustíveis.

## ABSTRACT

Through contact with gasoline, gas station attendants and analysts fuels are exposed to various volatile organic compounds, among them benzene is the most important, because their toxicological significance. Benzene is a myelotoxic agent, carcinogenic and classified as Group I by the International Agency of Research on Cancer (IARC). Their interaction with DNA molecules can indicate an early injury allowing to establish measures to protect the health of the exposed population. The comet assay is a highly sensitive method for detecting DNA damage induced by environmental or occupational exposure to mutagens. The aim of this study was to validate the comet test using gamma irradiation to measure genotoxic damage induced in peripheral blood lymphocytes, in addition to evaluating occupational exposure to benzene in gasoline by analysis and comparison of this biomarker and biomarker of benzene exposure - *trans, trans* muconic acid (ttMA). The comet assay showed that the Index Damage (ID) of the exposed group ( $28.4 \pm 10.1$ ) was significantly higher in the control group ( $18.4 \pm 10.1$ ), as well as the values of urinary ttMA were significantly higher in the exposed group ( $1.13 \pm 0.45 > 0.44 \pm 0.33$ ). Moreover, the values urinary ttMA showed a good correlation with the rate of DNA damage ( $K > 0.70$ ). Occupational exposure related fuels can cause an increased risk of genetic damage among individuals in this sector is therefore of paramount importance that analysis to study the health risks, in addition to being a strategic tool to improve the safety and quality of life for workers.

**Keywords:** Test comet, *trans, trans*-muconic acid, fuel attendants and analysts.



## LISTA DE FIGURAS

<b>1 Biotransformação do benzeno.....</b>	<b>20</b>
<b>2 Diferentes níveis de fragmentação do DNA formando “cometa” em linfócitos .....</b>	<b>29</b>
<b>3 Aspecto da lâmina em que se realiza o teste cometa.....</b>	<b>36</b>
<b>4 Procedimento do teste cometa.....</b>	<b>40</b>
<b>5 Classificação dos cometas.....</b>	<b>41</b>
<b>6 Procedimento analítico do AttM-u.....</b>	<b>44</b>
<b>7 Índice de dano em relação as doses 0 a 8 Gy .....</b>	<b>46</b>
<b>8 Curva de calibração do AttM em urina.....</b>	<b>48</b>
<b>9 Cromatograma do padrão de AttM-u em fase móvel.....</b>	<b>50</b>
<b>10 Cromatograma característico da análise do AttM-u por HPLC-Vis.....</b>	<b>50</b>
<b>11 Cromatograma de uma amostra de urina de um indivíduo do grupo exposto por HPLC-Vis.....</b>	<b>51</b>
<b>12 Cromatograma de uma amostra de urina de um indivíduo do grupo não exposto por HPLC-Vis.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>1</b>	<b>Propriedades físico químicas do benzeno.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Concentração de benzeno no ar (ppb) reportado por alguns estudos.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Especificação para benzeno na gasolina.....</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Correlação das concentrações de AttM-U com benzeno no ar, obtidas a partir dos valores estabelecidos pelo DFG (1996), corrigidos para miligrama/grama de creatinina (admitida concentração média de 1,2 grama de creatinina por litro de urina).....</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>Características e estratificação da população estudada.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Índice de Dano (ID) médio em relação às doses de radiação gama.....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Teste de reprodutibilidade.....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>Resultado do Teste cometa em ID na população estudada.....</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>Resultado do Teste cometa em ID na população exposta .....</b>	<b>49</b>
<b>10</b>	<b>Ácido trans-trans mucônico médio em mg/g de creatinina.....</b>	<b>53</b>
<b>11</b>	<b>Ácido trans-trans mucônico médio em mg/g de creatinina por profissão.....</b>	<b>54</b>
<b>12</b>	<b>Valores dos biomarcadores para a população estudada.....</b>	<b>55</b>
<b>13</b>	<b>Valores dos biomarcadores para o grupo I (exposto).....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFM	Ácido Fenilmercaptúrico
ANP	Agência Nacional do Petróleo
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
AttM-u	Ácido trans-trans mucônico
B[a]P	Benzo(a)pireno
BPF	Baixo Ponto de Fusão
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etil-benzeno e Xileno
Ci	Curie
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMS	Etilmetanossulfonato
ENU	Etilnitrosourea
EPI	Equipamento de proteção individual
g/cm <sup>3</sup>	Gramas por centímetro cúbico
Gy	Gray
IBMP	Índice biológico máximo permitido
ID	Índice de dano
Kpa	Quilopascal
mA	Miliamper
MDA	Metileno di-anilina
mg/g	Miligrama por grama
mg/L	Miligrama por litro
mg/m <sup>3</sup>	Miligrama por metro cúbico
mM	MiliMol
MMS	Metilmetanosulfonato
MN	Micronúcleo
MTE	Ministério do Trabalho e Emprego
N-DMA	N-nitrosodimetilamina
NR	Normas regulamentadoras
°C	Graus celsius
p/v	Peso por volume
PFN	Ponto de fusão normal
ppb	Partes por bilhão
PPEOB	Programa de prevenção da Exposição ao Benzeno
ppm	Partes por milhão
Raios $\gamma$	Raios gama
SNC	Sistema Nervoso Central
TBq	Terabequerel
TWA	Time Weight Average
$\mu$	Micra
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
v	Volts
v/cm	Volts por centímetro
VRT	Valor de Referência Tecnológico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Benzeno .....</b>	<b>14</b>
<b><u>2.1.1 Fontes de exposição ao benzeno.....</u></b>	<b>15</b>
<b><u>2.1.2 Benzeno na gasolina.....</u></b>	<b>17</b>
<b><u>2.1.3 Apectos toxicológicos.....</u></b>	<b>18</b>
<b>2.2 Monitorização da exposição ocupacional ao benzeno.....</b>	<b>21</b>
<b><u>2.2.1 Monitorização ambiental.....</u></b>	<b>22</b>
<b><u>2.2.2 Monitorização biológica.....</u></b>	<b>22</b>
<b>2.3 Genotoxicidade .....</b>	<b>26</b>
<b><u>2.3.1 Biomarcadores de genotoxicidade: teste cometa.....</u></b>	<b>27</b>
<b><u>2.3.2 Correlação entre biomarcadores do benzeno e teste cometa.....</u></b>	<b>32</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>4 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 População estudada.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2 Teste cometa.....</b>	<b>36</b>
<b><u>5.2.1 Reagentes.....</u></b>	<b>37</b>
<b><u>5.2.2 Equipamentos.....</u></b>	<b>37</b>
<b><u>5.2.3 Padronização e validação do teste cometa.....</u></b>	<b>38</b>
<b><u>5.2.4 Classificação do dano ao DNA.....</u></b>	<b>41</b>
<b>5.3 Análise do AttM-u .....</b>	<b>43</b>
<b><u>5.3.1 Reagentes.....</u></b>	<b>43</b>
<b><u>5.3.2 Equipamentos.....</u></b>	<b>43</b>
<b><u>5.3.3 Determinação do AttM-u.....</u></b>	<b>43</b>
<b><u>5.3.4 Curva de calibração.....</u></b>	<b>44</b>
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>6.1 Características da população estudada.....</b>	<b>45</b>
<b>6.2 Teste cometa.....</b>	<b>46</b>
<b><u>6.2.1 Validação do teste cometa.....</u></b>	<b>46</b>

<b>6.2.2 <u>Análise do teste cometa em sangue periférico</u></b> .....	47
<b>6.3 Análise do AttM-u</b> .....	49
<b>6.3.1 <u>Curva de calibração</u></b> .....	49
<b>6.4 Correlação entre os biomarcadores de exposição (AttM-u) e genotoxicidade (teste cometa)</b> .....	54
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66
<b>APÊNDICE A</b> .....	75
<b>APÊNDICE B</b> .....	76
<b>APÊNDICE C</b> .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

A relação entre a saúde, o meio ambiente e o desenvolvimento pode ser analisada com base em diferentes pontos de vista. O homem toma, cada vez mais, consciência do impacto do desenvolvimento sobre o ambiente e sobre a vida no planeta. O desenvolvimento não sustentável favorece a degradação ambiental e afeta a saúde humana ao gerar conflitos de ordem política e cultural, além dos de ordem ambiental e tecnológica. Superar esses conflitos requer a elaboração de novas políticas e estratégias, assim como o estabelecimento de prioridades, definição de indicadores e tomada de decisões (Tambellini et al., 2005).

A Toxicologia pode contribuir para a prevenção e diagnóstico das intoxicações através do desenvolvimento de métodos analíticos e o estabelecimento de biomarcadores para avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais e ocupacionais. Isto é feito por meio de estudo das substâncias mais comuns presentes no ambiente e do conhecimento de suas propriedades físico-químicas, toxicocinética e mecanismos de ação tóxica, a fim de se relacionar a dose interna à exposição externa (WHO, 1993). No entanto, estabelecer umnexo causal, considerando o ambiente e a sua relação com os possíveis danos à saúde não é uma tarefa simples, devido às inúmeras substâncias, as quais somos expostos cotidianamente e, além disso, o tempo que decorre entre a exposição e a manifestação da doença (ou efeito nocivo). O estudo desta relação é vista como um desafio, devido à complexidade relacionada aos contaminantes químicos presente no ambiente ocupacional ou não, e também as suas possibilidades de interação (Azevedo & Chasin, cap.5, 2004).

Entre os efeitos que mais despertam preocupação dos investigadores da área de saúde ambiental e saúde ocupacional, encontram-se aqueles relacionados aos danos genéticos. Muitos grupos de pesquisa em diferentes países têm se dedicado aos estudos de avaliação de risco genotóxico de populações expostas ocupacional e ambientalmente, de acordo com suas características genéticas e metabólicas. Entretanto, das diferentes substâncias químicas, apenas uma pequena parcela vem sendo testada para se identificar seus reais efeitos nos seres vivos (Panavello, 2000). O uso de biomarcadores de genotoxicidade é uma ferramenta importante nos

estudos de exposição às substâncias mutagênicas e a aplicação de técnicas analíticas para determinar os parâmetros biológicos decorrentes da exposição às substâncias químicas torna possível o esclarecimento da relação entre os agentes químicos e a sua toxicidade ao material genético. Além disso, a determinação destes biomarcadores são promissores na detecção precoce de eventos adversos, mesmo aqueles tardios, como exemplo, os efeitos carcinogênicos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Benzeno

O benzeno é um hidrocarboneto aromático que se apresenta como um fluido incolor, lipossolúvel, volátil, inflamável, de aroma característico, cuja fórmula molecular é  $C_6H_6$  (Oga et al., cap. 3, 2008). Em geral, os hidrocarbonetos são divididos em duas famílias: os alifáticos (cadeias carbônicas abertas ou cíclicas) e aromáticos (possui anéis benzênicos) que são encontrados principalmente no petróleo, como subproduto da produção do “coque” em siderúrgicas e em processos de síntese química. O benzeno é o mais nocivo hidrocarboneto aromático por ser classificado como agente carcinogênico para humanos (Grupo I) pela International Agency of Research on Cancer – IARC. Este agente químico tem lenta degradação no ambiente e o tempo de meia vida varia conforme o compartimento ambiental, sendo 13,4 dias no ar; 5 a 16 dias em água superficiais; 10 dias a 24 meses em águas profundas; 7,2 dias em solo com espessura de 1 cm e 38,4 dias com espessura de 10 cm (ATSDR, 2007).

Além disso, o benzeno possui grande repercussão na contaminação atmosférica, devido sua importante característica baseada no seu elevado poder de volatilização (Fernandes et al., 2002). As demais propriedades que podem influenciar transporte e destino da substância química no ambiente são descritas na **Tabela 1**.

**Tabela 1 - Propriedades físico químicas do benzeno.**

Propriedades	Notas
Nome Químico e Sinônimos	Benzeno, Ciclo-hexatrieno, benzol, pirobenzol
Fórmula Molecular	$C_6H_6$
Estado Físico	Líquido, incolor, volátil
Peso Molecular	78,11 (C – 92,25%; H – 7,75%)
Ponto de Ebulição	80,1 °C
Ponto de Fusão	5 °C
Massa específica	0,8 g/cm <sup>3</sup> , (20 °C)
Pressão de Vapor	10 kPa, (25 °C)
Tempo médio de degradação no ar	0,1 a 20 dias
Inflamabilidade	Extrema – Excelente combustão
Limite de odor	4,8 15,0 mg/m <sup>3</sup>
Limite de gosto	0,5 4,5 mg/L – Na água

**Fonte:** Adaptado (Barbosa, 1997).



### 2.1.1 Fontes de exposição ao benzeno

A exposição ocupacional ao benzeno tem sua origem nas petroquímicas, siderúrgicas e em laboratórios de síntese química. No petróleo é obtido a partir da destilação de óleos leves e na indústria do aço por meio do carvão mineral para fabricação do coque, processo que leva ao aquecimento da hulha (carvão betuminoso) em alta temperatura e este se decompõe em substâncias voláteis, incluindo o benzeno, tolueno e xileno. Entretanto, a maior parte da produção industrial é proveniente dos laboratórios de síntese químicas, em reações de reforma catalítica, dealquilação, hidroformação, ou mesmo por pirólise da nafta nas centrais petroquímicas (Silva, 2004; Bond et al., 1986).

Devido a Norma regulamentadora nº 15 do Ministério do Trabalho e Emprego – MTE, em seu anexo 13, a utilização do benzeno está restrita a sua produção, uso em processos de síntese química, o emprego em combustíveis derivados do petróleo e trabalhos de análise e investigação laboratorial, quando sua substituição não for possível. Empresas que fazem o uso do benzeno ou misturas líquidas contendo 1% ou mais, em que as atividades são diferentes das descritas acima, deverão apresentar sua inviabilidade técnica ou econômica da sua substituição na elaboração do Programa de Prevenção da Exposição ao Benzeno. – PPEOB. A Utilização maior atualmente para o benzeno e na produção de outras substâncias químicas, como o estireno, o qual é usado para produzir polímeros e plásticos, fenol para resinas e adesivos, e cicloexano, o qual é usado na manufatura de nylon. (ABIQUIM, 2010; Brasil, 1999).

Em relação à exposição ambiental, o desenvolvimento e o crescimento dos grandes centros urbanos propiciam o aumento da emissão de poluentes químicos para a atmosfera. Atualmente, mesmo longe dos centros de produção e uso, a população está sujeita a diversos graus de exposição aos poluentes químicos, incluindo carcinogênicos como o benzeno. A principal fonte de exposição ambiental ao benzeno vem de sua evaporação da gasolina, a qual pode conter de 1 a 5% de benzeno, cuja quantidade real varia em diferentes países (Lauwerys e Hoet, 1993). Estimada em mais de 90%, a principal fonte de exposição ambiental ao benzeno vem de sua evaporação da gasolina, sendo atualmente considerado como um

indicador de poluição urbana, com suas concentrações ambientais variando de acordo com as condições climáticas e diretamente com os picos de maior ou menor tráfego de veículos automotores que por sua vez, confirma a influência da exaustão de gases provenientes da queima de combustíveis na origem da poluição urbana. Outra importante contribuição para a exposição ambiental ao benzeno é a fumaça de cigarro. (Fustinoni et al., 1995; Castro et al., 2003).

As principais fontes de exposição ocupacional ao benzeno vêm dos processos de produção siderúrgica e petroquímica. Como consequência da presença do benzeno na gasolina, os ambientes de trabalho das empresas produtoras, distribuidoras e transportadoras e dos postos de revenda de combustíveis podem sofrer contaminação pela evaporação do benzeno, possibilitando a exposição dos trabalhadores e constituindo num risco à sua saúde (Castro et al., 2003; Bond et al., 1986).

O risco da exposição ao benzeno se amplia ao considerar que a gasolina é um produto utilizado, sem qualquer controle, em ambientes residenciais, em indústrias gráficas e oficinas mecânicas como solvente de limpeza. A exposição ocupacional ao benzeno e sua presença na gasolina, nos últimos anos, tem sido objeto de investigação, através das quais buscam estabelecer relações de causa-efeito, decorrentes da exposição ambiental e/ou ocupacional (Amorim, 2003; Brasil, 2006). Vários estudos visam avaliar a exposição ao benzeno como contaminante ambiental, medindo suas concentrações no ar interior, exterior e a exposição individual em fumantes. A **Tabela 2** ilustra alguns estudos realizados.

**Tabela 2 - Concentração de benzeno no ar (ppb) reportado por alguns estudos.**

Local	Exposição individual	Ar interior	Ar exterior	Referência
Residências Califórnia	-	1,20	0,36	Wallace, 1996
Residências* Coréia	-	6,00 (4 - 17)	4,00 (3 - 15)	Jo e Moon, 1993
Escritórios – Rio de Janeiro	-	5,00 - 10,80	1,00 - 3,80	Costa, 2001
Área urbana – Reino Unido	-	-	10,00	Larsen e Larsen, 1998
Área rural – Reino Unido	-	-	0,16 - 0,50	
Fumante (Itália)	35,09	-	-	Gilli et al., 1996
Fumante passivo (Itália)	28,55	-	-	
Não fumante (Itália)	21,90	-	-	

\* Residências perto de postos de abastecimento

### 2.1.2 Benzeno na gasolina

A gasolina automotiva consiste na mistura de hidrocarbonetos voláteis e inflamáveis derivados do petróleo, predominantemente com 4 a 12 átomos de carbono e temperatura de ebulição entre 30 a 225 °C. Sua composição depende da sua utilização, origem e dos processos de refino do petróleo. Hidrocarbonetos aromáticos como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno (BTEX) podem estar presentes na gasolina, sendo o benzeno é reconhecidamente o mais tóxico de todos (DEMEC, 2012; Mocsáry et al., 2000).

O benzeno encontrado na gasolina automotiva é devido a impurezas no processo de produção, ele pode aumentar a octanagem (índice de resistência à detonação de combustíveis) e reduz o “bater de bielas” de motores, ou seja, a autoignição. Diante destes vários fatores, a gasolina automotiva fabricada no Brasil deve atender especificações técnicas indicadas pela Agência Nacional de Petróleo (ANP). A Agência Nacional do Petróleo (ANP) em 27 de dezembro de 2001 publicou a Portaria nº 309 que estabelece as especificações para a comercialização das gasolinas automotivas em todo o território nacional e definiu obrigações dos agentes econômicos sobre o controle da qualidade do produto. A **Tabela 3** registra, com base na Portaria da ANP, os valores especificados para o benzeno e demais componentes na gasolina comum e Premium (ANP, 2001).

**Tabela 3 – Especificação para benzeno na gasolina.**

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	ESPECIFICAÇÃO			
		Gasolina Comum		Gasolina Premium	
		Tipo A	Tipo C	Tipo A	Tipo C
Benzeno, max. <sup>(1)</sup>	%vol	1,2	1,0	1,9	1,5
Hidrocarbonetos: Aromáticos, max. <sup>(1,2,3)</sup>	%vol	57	45	57	45
Hidrocarbonetos: Olefínicos, max. <sup>(1,2,3)</sup>	%vol	38	30	38	30

- (1) Os teores máximos de Enxofre, Benzeno, Hidrocarbonetos Aromáticos e Hidrocarbonetos Olefínicos permitidos para a gasolina A referem-se àquela que transformar-se á em gasolina C através da adição de 22% ± 1% de álcool. No caso de alteração legal do teor de álcool na gasolina os teores máximos permitidos para os componentes acima referidos serão automaticamente corrigidos proporcionalmente ao novo teor de álcool regulamentado.
- (2) Fica permitida alternativamente a determinação dos hidrocarbonetos aromáticos e olefínicos por cromatografia gasosa. Em caso de desacordo entre resultados prevalecerão os valores determinados pelos ensaios MB424 e D1319.
- (3) Até 30/06/2002 os teores de Hidrocarbonetos Aromáticos e Olefínicos podem ser apenas informados.

**Fonte:** (Portaria Nº 309, ANP/2001).

Nos Estados Unidos, a preocupação com efeitos tóxicos do benzeno na saúde e a possibilidade de contaminação do mesmo em águas subterrâneas, tendo conduzido a regulação estrita do teor de benzeno na gasolina, com limites em torno de 1%. As especificações europeias de gasolina já contém o mesmo limite de 1% para a presença de benzeno (EPA, 2012; Silva, 2004).

### 2.1.3 Aspectos toxicológicos do benzeno

O benzeno é absorvido pelas vias cutânea e pulmonar, sendo que a absorção via contato dérmico contribui muito pouco para o total da exposição ocupacional, pois é influenciada pela temperatura corpórea, integridade e hidratação da pele. Pela via pulmonar, o benzeno é absorvido rapidamente, chegando à corrente sanguínea em poucos minutos, porém, decai rapidamente, sendo distribuído para os tecidos, que devido a sua lipossolubilidade, possui alta afinidade pelo tecido adiposo. (Costa, 2001, WHO, 1996).

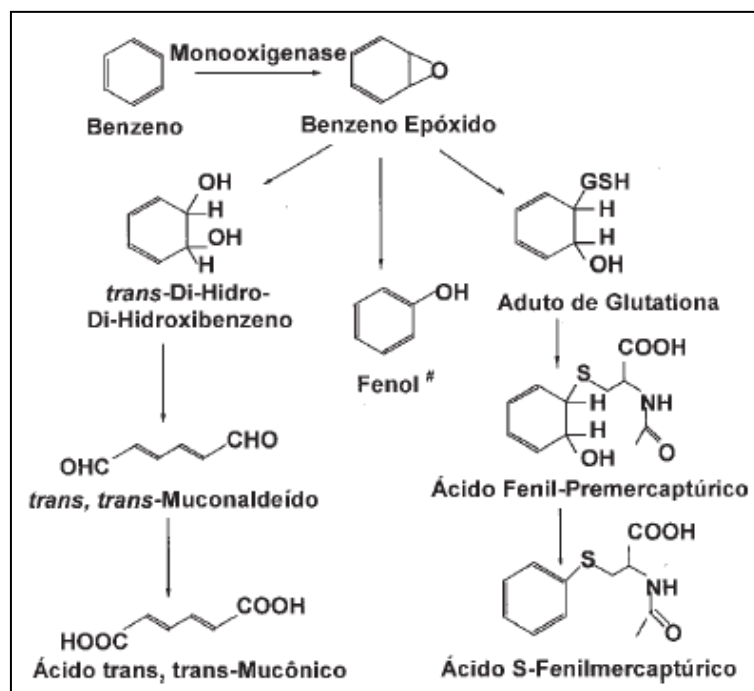
Uma proporção de 10 a 50% do benzeno absorvido, dependendo da dose, da atividade metabólica e da quantidade de lipídeos presentes no organismo, é eliminada em sua forma inalterada através do ar expirado e cerca de 0,1% é

excretado inalterado na urina. A maior parte do benzeno absorvido é biotransformada, principalmente no fígado, em derivados hidroxilados que são excretados na urina na forma de metabólitos conjugados ou produtos de anéis abertos (**Figura 1**) (Oga et al., 2008; Coutrim et al., 2000).

A elevada toxicidade do benzeno está associada aos seus produtos de biotransformação como os responsáveis pela neurotoxicidade, hematotoxicidade e imunossupressão observada em casos de intoxicações (Salgado e Pezzagno, 1991; Wakamatsu e Fernicola, 1980).

O benzeno é oxidado por enzimas do complexo citocromo P450 (CYP), principalmente pela atividade enzimática da CYP 2E1 hepática ou pela CYP 2F2 presente nos pulmões. O óxido de benzeno formado é espontaneamente convertido a fenol por meio de rearranjo não enzimático e, subsequentemente, a hidroquinona e catecol pela ação da CYP2 E1 (Medinsky et al., 1995; Ong et al., 1996; Silva et al., 2003). Estes compostos oxidados são substratos para enzimas sulfotransferases e glicuroniltransferases hepáticas ou são transportados para a medula óssea, onde são oxidados a 1,4-benzoquinona e 1,2-benzoquinona pela ação de mieloperoxidases e prostaglandinas, respectivamente (De Caprio, 1999; Snyder, 2004). Se não metabolizados eficientemente por sistemas enzimáticos competentes, como algumas redutases presentes na medula óssea, tais compostos causam prejuízo na produção, maturação e função de células hematológicas. Os produtos de metabolização altamente reativos do benzeno podem prejudicar a função destas enzimas, ou mesmo por ação direta ao DNA. Os efeitos imunotóxicos podem estar bem demonstrados em ensaios in vitro ou em condições tóxicas de exposição ao solvente, porém os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos tóxicos do benzeno ainda não estão completamente elucidados (Sheets et al., 2004; Snyder, 2004).

**Figura 1 - Biotransformação do benzeno.**



**Fonte:** Coutrim et al., 2000

A ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) coloca o benzeno na 6ª posição dentre as 10 substâncias de importância toxicológica, após o Arsênio, Chumbo, Mercúrio, Cloreto de vinil e policlorados, respectivamente em ordem decrescente de importância toxicológica. Esta lista é revisada e publicada a cada 2 anos e é baseada em um algoritmo que utiliza três componentes: frequência de ocorrência, toxicidade e potencial de exposição humana a substâncias (ATSDR, 2007).

A exposição ao benzeno pode ser aguda ou crônica. Após exposição de alta dose do benzeno a curto prazo, o principal efeito tóxico é sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Os sintomas variam desde tonteira, fraqueza, euforia, cefaléia, náuseas, vômitos até irregularidades ventriculares, paralisia e inconsciência, dependendo da dose recebida na exposição. Os vapores são, também, irritantes para as mucosas oculares e respiratórias e sua aspiração em altas concentrações podem provocar edema pulmonar (Brasil<sup>b</sup>, 2001; Silva, 2004).

Os sinais e sintomas da exposição a longo prazo ao benzeno incluem os efeitos no SNC e trato gastrointestinal, mas a principal manifestação são as alterações

hematológicas. Alterações sanguíneas, isoladas ou associadas, estão relacionadas à exposição ao benzeno. Devidas à lesão do tecido da medula óssea, essas alterações correspondem, sobretudo, a hipoplasia, displasia e aplasia, pois, o benzeno é um agente mielotóxico regular, leucemogênico e cancerígeno até mesmo em doses inferiores a 1ppm (Brasil<sup>b</sup>, 2001; Tiburtius et al., 2000).

O caráter leucemogênico do benzeno é amplamente reconhecido. As transformações leucêmicas, precedidas ou não por alterações mielodisplásicas, já foram objetos de vários estudos, sendo a leucemia mielóide aguda, entre todas, a mais frequente, cuja relação causal está consolidada por evidências epidemiológicas. Outras variantes são também descritas, a toxicidade do 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 (Brasil<sup>b</sup>, 2001; Costa, 2002).

## 2.2 Monitorização da Exposição ao benzeno

Sendo a toxicologia ocupacional e ambiental constituem são áreas que se dedicam ao estudo dos efeitos nocivos produzidos pela interação de agentes químicos contaminantes do ambiente geral e do trabalho com o indivíduo exposto, a detecção precoce de uma exposição perigosa pode diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos à saúde. (Oga et al., 2008)

As informações provenientes da monitorização da exposição ocupacional possibilitam a implantação de medidas de prevenção e controle apropriadas. A monitorização da exposição é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais, com a finalidade de detectar os possíveis riscos à saúde. A exposição pode ser avaliada por medida da concentração do agente químico em amostras ambientais como o ar (monitorização ambiental), ou através da medida de parâmetros biológicos (monitorização biológica), denominados biomarcadores (Machado, 1997; Brilhante e Caldas, 1999).

### 2.2.1 Monitorização ambiental

A existência de Limites de Exposição Ocupacional ao benzeno, estabelecidos com o objetivo de dar segurança à saúde do trabalhador exposto é discutível, pois, não há um valor seguro de exposição para as substâncias carcinogênicas (Costa, 2009). No Brasil, a Norma Regulamentadora número 15 (NR-15) do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE), no seu anexo 13 A (Brasil, 1999), que estabelece as normas de exposição ocupacional para o benzeno, adotando o conceito de “Valor de Referência Tecnológico” (VRT). O VRT refere-se a um valor de benzeno no ar de acordo com a exequibilidade tecnológica cuja concentração ambiental estabelecida (2,5 ppm para siderúrgicas e 1,0 ppm para petroquímicas) não representa um limite seguro, ou seja, não exclui o risco à saúde (Brasil, 1999; Fundacentro, 1996). Assim, na prática, medidas de proteção e melhorias devem ser adotadas no sentido de se atingir concentrações cada vez menores de benzeno no ambiente ocupacional. O VRT deve ser considerado como referência para os programas de melhoria contínua das condições dos ambientes de trabalho, porém não exclui o risco à saúde (Brasil, 2001).

### 2.2.2 Monitorização biológica

A monitorização biológica é realizada através da determinação de um biomarcador e seu objetivo principal prevenir a exposição excessiva aos agentes tóxicos, evitando efeitos nocivos, agudos ou crônicos. Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo; entretanto a determinação quantitativa desses parâmetros é usada como Indicador Biológico ou Biomarcador, somente se existir a correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância. Desta forma, o biomarcador compreende toda substância, ou seu produto de biotransformação, assim como quaisquer alterações bioquímicas precoces, cuja determinação esteja associada à intensidade da exposição, ou ao risco à saúde (Angerer et al., 2007; Bechtold e Henderson, 1993).



Os biomarcadores são classificados em grupos distintos de acordo com o parâmetro medido (WHO, 1996):

- Os biomarcadores de Exposição: São substâncias exógenas, metabólitos, produtos ou as interações entre o xenobiótico e um alvo molecular ou celular no organismo. Avaliam e podem confirmar a exposição individual ou de um grupo, dependendo da sua especificidade, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna, quando o biomarcador é a próprio xenobiótico, o conceito dose interna é mais apropriado.
- Os Biomarcadores de Efeito: Constroem uma relação de dose-resposta com o agente químico, pois documentam as alterações não adversas à saúde, decorrentes da exposição e absorção da substância.
- Os Biomarcadores de Suscetibilidade: É um indicador que mede a capacidade, inerente ou adquirida do organismo de responder um alerta da exposição química.

É possível estabelecer valores máximos permissíveis para os biomarcadores: que na legislação brasileira são denominados como Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP), os quais representam o nível de substâncias químicas ou de seus produtos de biotransformação em material biológico cujo valor “não representa risco à saúde” (DeCaprio, 1997).

Os biomarcadores de exposição do benzeno se referem a seus produtos de biotransformação excretados na urina ou sua forma inalterada na urina e/ou ar expirado. O desenvolvimento de metodologias analíticas vem oferecendo a possibilidade de avaliar uma série de indicadores biológicos de exposição. Dentre os mais estudados, podemos destacar: o benzeno inalterado no ar expirado, na urina e no sangue, além dos metabólitos ácido *trans-trans* mucônico (AttM) e fenil-mercaptúrico (AFM) na urina. Nos últimos anos, AttM e AFM têm sido os biomarcadores de escolha por apresentar algumas características, como sensibilidade e especificidade em relação aos outros (Coutrim et al., 2000; Negri et al., 2005).

A legislação brasileira estabeleceu o ácido *trans-trans* mucônico (AttM) urinário como biomarcador de exposição para avaliar a exposição ao benzeno através da Portaria 34/2001 (Brasil<sup>a</sup>, 2001), que visa determinar os procedimentos para a utilização de indicador biológico para a exposição ocupacional ao benzeno que possuam características de aplicabilidade, especificidade e sensibilidade para exposição a baixas concentrações de benzeno em ambiente de trabalho compatíveis com o VRT. No entanto, não é estabelecido um limite biológico para esse biomarcador, tendo em vista que não existe valor seguro para as substâncias carcinogênicas. A portaria prevê que o AttM deve ser utilizado como ferramenta de acompanhamento de higiene do trabalho e da vigilância da saúde do trabalhador. A correlação entre AttM e benzeno é detectada em níveis ambientais do solvente inferiores a 1,0 ppm, fato que o viabiliza como biomarcador, considerando que a concentração de benzeno permitida pela lei brasileira no ar ocupacional (VRT) que é 1,0 e 2,5 ppm. Dentre as vantagens do uso desse biomarcador, destacam-se a sensibilidade e a simplicidade analítica de sua determinação urinária. A principal desvantagem do uso deste metabólito como indicador biológico de exposição é o fato de sua concentração basal ser influenciada por fatores e características individuais, uma vez que esse metabólito também é formado durante a biotransformação do ácido sórbico e seus sais, que são utilizados como conservantes de alimentos e de preparações farmacêuticas e cosméticas (Paula et al., 2003; Boogaard et al., 1995; Menezes et al., 2008)

Para interpretar os resultados obtidos, a referida Portaria (34/2001) apresenta correlações entre o valor encontrado de AttM em mg/g de creatinina, com a concentração de benzeno no ar (**Tabela 4**).

**Tabela 4 - Correlação das concentrações de AttM-u com benzeno no ar, obtidas a partir dos valores estabelecidos pelo DFG (1996), corrigidos para miligrama/grama de creatinina (admitida concentração média de 1,2 grama de creatinina por litro de urina).**

Benzeno no Ar (ppm)	Benzeno no Ar (mg/m <sup>3</sup> )	Ac. <i>t,t</i> mucônico (urina) (mg/l)	Ac. <i>t,t</i> mucônico (urina) (mg/grama creatinina)
0,3	1,0	-	-
0,6	2,0	1,6	1,3
0,9	3,0	-	-
1,0	3,3	2	1,6
2	6,5	3	2,5
4	13	5	4,2

---

**Fonte:** Brasil, 2001

Entre outros biomarcadores de exposição, podemos citar o benzeno inalterado (ar expirado, sangue e urina) e seu metabólito, o ácido fenilmercaptúrico. Sabendo que em torno de 30% de todo vapor de benzeno inalado é imediatamente eliminado pela expiração, este pode ser um indicador específico e sensível à baixas concentrações ambientais, além disso, utiliza um processo de coleta não invasivo. Contudo, o ar expirado é uma mistura que depende não somente da exposição, mas também de fatores individuais como o nível de ventilação pulmonar e da atividade física exercida antes da coleta, o que torna a amostra não homogênea. Além disso, existe problemas de padronização na metodologia de coleta da amostra, a possibilidade de ocorrência de contaminação durante a amostragem, o que dificulta seu uso rotineiro (ACGIH, 1999; Hoet, 1996; WHO, 1996).

O Benzeno no sangue, é um indicador específico e sensível, que pode ser avaliado espectrometria de massas associada a cromatografia em fase gasosa (CG-MS), porém, por ser um processo de coleta invasivo, a amostra biológica nem sempre é bem aceita pelos trabalhadores (Yoonho et al., 2000). Apesar de uma fração muito pequena, 0,07% a 0,2%, do benzeno dissolvido ser eliminado inalterado na urina, este é um biomarcador sensível e específico. No entanto, é necessário utilizar técnicas analíticas sensíveis para sua determinação, o que na maioria torna o procedimento caro e dispendioso. Além disso, existe o risco de contaminação, e é necessária uma série de cuidados nas etapas de coleta e manuseio da amostra para a determinação do benzeno urinário (Ong, 1996).

A determinação do ácido S-fenilmercaptúrico (N-acetil-S-fenilcisteína) na urina requer, ainda, estudos mais aprofundados para validar seu uso rotineiro em avaliações biológicas pois depende de metodologia complexa que envolve procedimentos de extração e derivatização para posterior determinação por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas - CG-MS (Popp et al., 1994) ou por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectroscopia de Fluorescência, porém têm se demonstrado um biomarcador altamente sensível e específico para baixos níveis de exposição (Einig & Dehnen, 1995; Ghittori et al., 1995).

### 2.3 Genotoxicidade

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. O genoma de todos os organismos vivos está constantemente sob o efeito de agentes exógenos ou endógenos que modificam a integridade química do DNA, alterando seu conteúdo de informações genéticas. No entanto, nem sempre, mutações são vantajosas e os impactos no fenótipo podem incluir má formação, câncer, envelhecimento e morte. Embora essas mutações possam ocorrer de forma espontânea, muitas são induzidas por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais o homem e outros organismos podem ser expostos. Essas alterações incluem anormalidades cromossômicas, ampliações gênicas e aquisição de novas mutações que são responsáveis pela instabilidade genômica e desempenham um importante papel na carcinogênese. Assim a maior causa deflagradora do processo carcinogênico é a instabilidade genômica, um estado transitório ou persistente que causa uma série de eventos mutacionais que levam a alterações genéticas mais estáveis. Assim, as mutações originadas em genes que controlam tanto a fidelidade de síntese e reparo de DNA quanto a regulação do ciclo celular e da apoptose, aumentam consideravelmente a taxa de mutação basal, podendo explicar a presença de múltiplas mutações encontradas nos tumores. Uma vez que a expressão gênica esteja alterada como consequência da instabilidade genômica, as células passam a exibir um crescimento anormal podendo invadir tecidos vizinhos (Pages e Fuchs, 2002, Keshava e Ong, 1999).

Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando aductos, alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA. O agente químico capaz de formar um aducto no DNA e provocar tais danos é comumente referido como “DNA reativo” e, portanto, também denominado como genotóxico; ao passo que, agentes capazes de potencializar a carcinogenicidade, devido ao aumento do número de replicações do DNA, são considerados carcinogênicos não mutagênicos (Da Silva, 2003).

A mutagenicidade refere-se a alterações permanentes na estrutura do material genético de célula ou de um organismo, que podem ser transmitidas e resultar em

mudanças hereditárias nos organismos. Essas mudanças podem envolver um único gene, um segmento de genes, um bloco de genes ou até mesmo todo o cromossomo. Efeitos no cromossomo podem ser estruturais ou numéricos, portanto a genotoxicidade é um termo amplo e refere-se ao efeito potencial de danos no material genético, que não está necessariamente associado com mutagenicidade (SCCNFP, 2003; Marcon et al., 1999).

O benzeno e seus metabólitos podem causar mutagenicidade, clastogenicidade e formar aductos de DNA, muitos estudos têm sido realizados a fim de elucidar o mecanismo de sua genotoxicidade, porém, a indução de neoplasias pelo solvente e seus metabólitos ainda não foi estabelecida. Explicações alternativas para o dano causado ao DNA incluem: a formação de adutos de DNA por metabólitos de sua biotransformação; o dano oxidativo; o efeito aneugênico (defeito no fuso mitótico, e consequente a não separação dos cromossomos) e clastogênicos (quebra nos mesmos), além do efeito nocivo a topoisomerase II, enzima que desempenha papel importante nos processo de replicação e empacotamento de DNA (Eastmond et al., 2005, Whysner et al., 2004).

Whysner et al. (2004) em uma revisão sobre a genotoxicidade do benzeno e seus metabólitos, demonstrou a presença de micronúcleos, aberrações cromossômicas, trocas de cromátides irmãs e quebras no DNA tanto em roedores quanto em humanos, além disso, a biotransformação do benzeno foi qualitativamente semelhante em roedores, humanos e primatas, o que indica uma compatibilidade entre os dados de genotoxicidade. Metabólitos do benzeno podem ativar inibidores da topoisomerase II, o que fornece um maior suporte para o mecanismo da indução de leucemia por benzeno, portanto, maiores investigações nesse sentido tem sido realizadas atualmente.

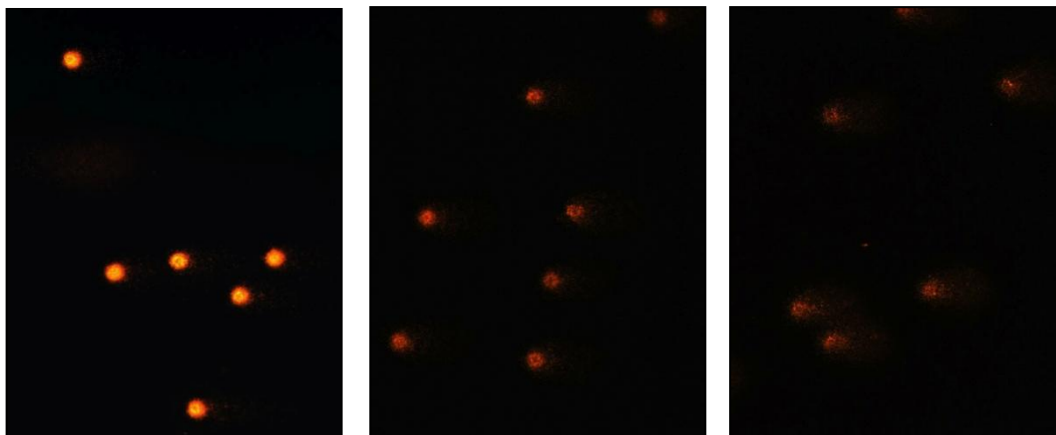
### 2.3.1 Biomarcadores de genotoxicidade: teste cometa

O ensaio cometa tem amplas aplicações em toxicologia por meio de testes de genotoxicidade “*in vitro*”, “*in vivo*”, ou no monitoramento da exposição humana a agentes tóxicos. Este ensaio tem sido empregado no estudo de células sanguíneas humanas quanto à suscetibilidade à radiação e a substâncias químicas mutagênicas (Coronas et al., 2008; Faust et al., 2004).

As alterações presentes em linfócitos no sangue periférico humano como as aberrações cromossômicas, as trocas entre cromátides irmãs e os micronúcleos (MNs), têm sido consideradas ao longo de vários anos como biomarcadores de substâncias genotóxicas associados a efeitos precoces de carcinógenos; assumindo que o mecanismo de formação dos danos cromossômicos são similares em diferentes tecidos, espera-se que os níveis de danos nos linfócitos reflitam os níveis de danos nos tecidos propensos ao câncer e assim indiquem risco ao câncer. Entretanto, alguns estudos epidemiológicos sugerem que a alta frequência de alterações citogenéticas atua como fator preditivo para o risco ao desenvolvimento de câncer, mesmo em populações não expostas, uma vez que indicam a possível instalação de um processo de instabilidade genômica (Heddle, 1991). Isso sugere um importante papel dos fatores de suscetibilidade individual como os diferentes polimorfismos dos genes metabolizadores de xenobióticos, de reparo do DNA e do metabolismo do ácido fólico (folato), vitamina do complexo B que é essencial para síntese do ácido nucleico e outras proteínas (Fenech, 2002; Kim et al., 2003).

O Teste Cometa, também conhecido como Ensaio Cometa, pode ser classificado como eletroforese em microgel, capaz de avaliar danos causados ao DNA. Rydberg & Johanson (1978) desenvolveram a primeira quantificação de dano ao DNA avaliada com auxílio de um fotômetro, pela medida da proporção de fluorescência. Seis anos depois, Ostling & Johanson (1984), descreveram um procedimento para a visualização direta do dano ao DNA, cujos resultados mostram imagens com a aparência de um cometa e sua cauda, a qual podia ser utilizada para determinar a extensão o dano. A **Figura 2** ilustra uma imagem capturada de cometas em linfócitos, indicando diferentes níveis de danos ao DNA, na qual a cabeça do cometa representa o núcleo original e a cauda os fragmentos de DNA.

**Figura 2 – Cometas em linfócitos mostrando diferentes danos ao DNA, obtido a partir de exposição a irradiação Gama.**



Ao contrário de outros tipos de ensaios, que empregam células em proliferação, para avaliar sua viabilidade, o Teste Cometa não necessita dessa condição, podendo ser realizado com células normais, geralmente linfócitos, pois são obtidos facilmente por meio de coleta de sangue. Porém, outros tecidos, como o fígado e os rins, também têm sido testados, pois os efeitos de genotoxicidade de contaminantes químicos ambientais podem ser muitas vezes específicos para determinados tecidos no organismo (Mitchelmore e Chipman, 1998). Entre as vantagens identificadas para a realização deste teste, incluem-se o fato de ser um teste simples, rápido e sensível, capaz de detectar uma quebra em  $1 \times 10^{10}$  Daltons, além da possibilidade de utilizar qualquer célula nucleada eucariótica e pequena quantidade de amostras.

Contudo, um dos maiores problemas da técnica é que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser atribuída a uma exposição específica e ser relacionada diretamente com a genotoxicidade de um determinado agente químico. Além disso, as quebras no material genético podem ocorrer por diversos mecanismos como radiação ionizante; ativação de enzimas como as endonucleases e as topoisomerasas; elevados níveis de compostos reativos endógenos, como radicais superóxidos e óxido nítrico; entre outros. Belpaeme et al. (2008) apontam a dificuldade em relação aos diferentes métodos de quantificação do dano, que podem tomar como parâmetro tanto o tamanho da cauda com relação ao núcleo, quanto a porcentagem de fragmentação da cauda, ou ambos.

Collins et al. (2008) utilizaram a radiação ionizante para estabelecer um padrão de degradação do DNA e, assim, estabelecer uma quantificação válida. A variabilidade dessas medidas ainda é um desafio para especialistas, pois a interpretação de limites ideais pode impedir a detecção de pequenos efeitos genotóxicos, podendo conduzir a conclusões equivocadas na estimativa do risco da exposição aos contaminantes. Bocker et al. (1999) desenvolveram um estudo para automatização do Teste Cometa, visando uma possível padronização na leitura desse teste. A análise da imagem foi dividida em duas partes: na primeira, o reconhecimento automático de células e a classificação do cometa; e, na segunda, a quantificação dos parâmetros de cometas desejados. A comparação das medições feitas nas mesmas amostras por análise de sistemas manuais e automatizados revelou que não existem diferenças significativas, mas demonstrou a possibilidade da automação da análise como fator de redução de subjetividade e maior rapidez no processo de classificação.

Entre os diversos estudos encontrados na literatura Anderson et al. (1998) avaliaram mais de 200 agentes químicos a partir de dados na literatura, 119 agentes químicos possuíam dados sobre carcinogenicidade, e 95 foram identificados na literatura estudos utilizando Teste Cometa. Entre esses 95 agentes químicos, 84 agentes tinham associação com efeito de carcinogenicidade, levando a uma prevalência de 88% (84/95). Entre os 84 agentes carcinogênicos, 74 tiveram resultado positivo para o Teste Cometa (sensibilidade), numa proporção de 88% (74/84). Entre os 11 agentes não carcinogênicos, 7 deles tiveram o Teste Cometa negativo (especificidade), numa proporção de 64% (7/11). Essa análise não levou em consideração as diferenças entre os ensaios *in vitro* e *in vivo*, as diferentes espécies, órgãos ou diferentes tecidos que foram utilizados nos diversos estudos disponíveis na literatura. No entanto, os autores puderam concluir que o Teste Cometa tem alta sensibilidade para carcinogênicos, mas sua especificidade é ainda incerta devido ao pequeno número de não carcinogênicos que já foram testados.

Azqueta et al. (2009), aponta a oxidação do DNA, mensurada pelo teste cometa, como uma nova chave para investigação de mutagênese ambiental, uma vez que diversos agentes ambientais como radiação UV, metais pesados, solventes



orgânicos podem causar estresse oxidativo e são descritas várias relações positivas de diversas patologias com o dano oxidativo do DNA.

Tarantini et al. (2009) estudaram a genotoxicidade do benzo[a]pireno (B[a]P), um hidrocarboneto aromático policíclico produzido na combustão incompleta de matéria orgânica e carcinogênico para humanos. O interesse dos autores era avaliar duas vias propostas para explicar a genotoxicidade do B[a]P, as quais são: a indução de lesão oxidativa e a formação de aductos no DNA. O composto foi avaliado puro ou em misturas, utilizando hepatócitos humanos por meio do Teste Cometa. Foi feita uma comparação entre a extensão de quebras na fita de DNA determinadas pelo teste e do número de aductos de DNA formados pelo metabólito epóxido diol do B[a]P, o qual foi determinado por espectrometria de massas. As culturas de hepatócitos humanos foram tratadas tanto com partículas de B[a]P puro, quanto com as extraídas de amostras de ar coletas nos sítios urbanos e industriais de metalúrgicas, supostamente misturadas a outros compostos químicos. O tratamento com B[a]P puro não induziu aumento nas medições de cauda do cometa pelo teste numa concentração abaixo de  $1\mu\text{M}$ , enquanto aductos foram observados para concentrações abaixo de  $0,025\mu\text{M}$ . Resultados muito diferentes foram obtidos a partir das amostras ambientais urbana e industriais que identificaram aumento nas medições da cauda pelo Teste Cometa em misturas contendo  $0,16\mu\text{M}$  de B[a]P. Este fato permitiu aos autores concluir que a indução de quebras na fita de DNA resultou da ação de outros componentes das amostras, o que implica uma questão de saúde pública, pois a população em geral raramente está exposta a substâncias químicas puras, mas sim, a misturas complexas. Os dados obtidos mostraram que uma combinação de métodos analíticos e o uso de abordagens complementares são recomendados para avaliar a genotoxicidade de misturas complexas; e a avaliação do risco deve considerar a presença de substâncias tóxicas que são potencializadas entre si e têm sua prioridade genotóxica modulada para outras moléculas presentes na mistura.

León-Mejía et al. (2011) avaliou o efeito genotóxico em população exposta a resíduos de carvão provenientes de uma mina a céu aberto em El Cerrejón, Colômbia. Foram avaliados 100 trabalhadores expostos e um grupo controle de 100 indivíduos não expostos, sendo que o grupo exposto foi dividido de acordo com as

diferentes atividades exercidas na mina. Dentre os biomarcadores de genotoxicidade, a porcentagem de dano direto ao DNA e ao cromossomo foi mensurada pelo teste cometa e micronúcleo, respectivamente. Ambos biomarcadores mostraram-se estatisticamente elevados no grupo exposto, sem diferenças para as diferentes atividades do grupo exposto. O resultado mostrou que os trabalhadores de minas de carvão estão expostos a substâncias genotóxicas e por isso tornam-se necessárias medidas de controle, higiene e prevenção da saúde ocupacional.

A gasolina contém inúmeras substâncias tóxicas, dentre as quais, destaca-se o benzeno. O impacto do benzeno e outras substâncias genotóxicas presente na gasolina na saúde de trabalhadores expostos à gasolina foi objeto de alguns estudos. Keretse et al. (2008) e Pandey et al. (2008), em estudos semelhantes, avaliaram através do teste cometa, o efeito genotóxico da gasolina em trabalhadores na África e na Índia, respectivamente. Os índices de dano ao DNA do grupo exposto, nos dois estudos, foram estatisticamente superiores em relação ao grupo controle. Andreoli et al. (1997), demonstrou que trabalhadores de postos combustíveis, expostos ao benzeno ( $0,3\text{mg}/\text{m}^3$ , 8h TWA), apresentam um maior dano no DNA (avaliado por teste cometa) em comparação a indivíduos não expostos. Os estudos demonstraram a importância da detecção de risco à saúde em uma fase inicial, quando é possível a intervenção e indicaram a necessidade de vigilância da saúde dos trabalhadores em postos de combustíveis.

### 2.3.2 Correlação entre biomarcadores do benzeno e teste cometa

Biomarcadores de exposição são utilizados a fim de avaliar a exposição ao benzeno no sentido de prevenir uma exposição excessiva. Amostras biológicas como urina, sangue e ar expirado são utilizadas para medir a concentração do benzeno ou seu metabólito, correlacionando com a intensidade da exposição. Estes estudos podem ser complementados por outros parâmetros analíticos, que avaliam o efeito genotóxico sobre o organismo, utilizando biomarcadores de genotoxicidade.

Sul et al. (2005) realizou um estudo de comparação entre diferentes setores industriais: fabricação de sapatos, produção de metileno di-anilina (MDA) e o próprio benzeno. Para avaliar a exposição à substância utilizou-se o fenol, AttM urinário,

benzeno no ar expirado e o teste cometa. Foi verificado que o fenol foi um marcador pouco sensível em trabalhadores expostos a baixos níveis de benzeno, mas que os resultados dos ensaios de cometa nos linfócitos exibiram uma forte correlação com o benzeno no ar expirado e os níveis AttM urinário, no que diz respeito aos níveis baixos de exposição ao benzeno. Portanto, o AttM urinário, o teste cometa e o benzeno no ar expirado constituem biomarcadores adequados para biomonitoramento da exposição industrial ao benzeno.

Fracasso et al. (2010), realizou um estudo na Itália para identificar quais seriam os biomarcadores mais úteis em trabalhadores expostos a baixos os níveis de benzeno expostos através da gasolina e avaliar as correlações existentes entre estes parâmetros. A população estudada foi operários da indústria petroquímica, atendentes de postos combustíveis, trabalhadores da manutenção de bombas de gasolina e uma população não-exposta. Foram colhidas amostras de urina no fim do turno para determinar AttM e AFM. Realizou-se também o teste cometa e aberrações cromossômicas, nos linfócitos do sangue periférico. A exposição ao benzeno foi significativamente maior no grupo exposto e foi observado um aumento nos níveis de AttM e AFM, exceto para exposição descontínua dos operários da manutenção de bombas de gasolina, os quais apresentaram maior nível somente nos dias úteis de trabalho. Danos ao DNA foram encontrados pelo teste do cometa, quando comparados com os controles, porém não foi encontrada uma diferença no percentual de aberrações cromossômicas entre trabalhadores expostos e controles. Em resumo, no presente estudo os dados de AttM e AFM urinários parecem se correlacionar com o teste cometa, pois ambos são sensíveis à exposição a baixos níveis de benzeno.

### 3 JUSTIFICATIVA

Considerando que postos de combustíveis apresentam um sério potencial contaminante, seja em razão do passivo ambiental representado pelos tanques de armazenamento desses produtos, seja pela sua manipulação diária e (quase) ininterrupta por milhares de trabalhadores brasileiros, é de extrema importância investigar e avaliar a exposição ocupacional a agentes mutagênicos por meio de biomarcadores de genotoxicidade.

O ensaio cometa tem amplas aplicações em toxicologia por meio de testes de genotoxicidade “in vitro”, “in vivo”, no monitoramento da exposição humana a agentes tóxicos. Este ensaio tem sido empregado no estudo de células sanguíneas humanas quanto à suscetibilidade à radiação e a substâncias químicas mutagênicas (Coronas et al., 2008; Faust et al., 2004).

Ao contrário de outros tipos de ensaios, que precisa de células em proliferação para sua viabilidade, o Teste Cometa não necessita dessa condição, podendo ser realizado com células normais, geralmente com linfócitos, pois são obtidos facilmente por meio de coleta de sangue. Entre as vantagens identificadas para a realização deste teste incluem-se o fato de ser um teste simples, rápido e sensível, capaz de detectar uma quebra em  $1 \times 10^{10}$  Daltons, além da possibilidade de utilizar qualquer célula nucleada eucariótica e pequenas quantidades de amostras (Rojas, 1999; Collins, 2008; Dusinska e Collins, 2008).

Nesse sentido, a presente proposta objetiva o desenvolvimento de metodologia analítica para avaliar o uso potencial de um biomarcador de genotoxicidade para benzeno, para dar suporte às ações de vigilância à saúde dos trabalhadores expostos ocupacionalmente e/ou ambientalmente ao benzeno. Além de comparar os resultados com os valores do AttM em urina, como biomarcador de exposição ao benzeno.

## **4 OBJETIVO GERAL**

Padronizar e avaliar o teste cometa em sangue periférico, como biomarcador de genotoxicidade em células sanguíneas de trabalhadores expostos ao benzeno, através da gasolina, e correlacionar com os valores encontrados para o ácido trans, trans mucônico urinário (AttM-u), que é um biomarcador de exposição do benzeno, considerando os fatores individuais como sexo e idade, e variáveis de exposição.

### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Padronizar e validar a metodologia analítica para realização do teste cometa, como biomarcador de genotoxicidade;
- Determinar o ácido trans, trans mucônico (AttM-u) na urina de trabalhadores expostos ao benzeno (grupo exposto), através da gasolina, e de indivíduos não expostos (grupo não exposto);
- Correlacionar os resultados do teste cometa com a concentração do AttM determinado na urina dos grupos exposto e não exposto.
- Avaliar os biomarcadores em relação às variáveis de exposição e fatores individuais, como idade e sexo.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 População estudada

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa (COEP) da UFMG, através protocolo 118/1. Para os dois grupos foram apresentados o Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE (**Apêndice A e B**).

Foram estabelecidos dois grupos de estudo: exposto (grupo I) e não exposto (grupo II). O Grupo I foi formado por trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno através da gasolina proveniente de postos de revenda de combustível e de analistas de laboratórios especializados na análise de controle de qualidade de combustíveis. O Grupo II foi composto por indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno. Para a seleção dos grupos de estudo foram considerados os seguintes critérios:

- Critérios de exclusão para os Grupos I e II:
  - Indivíduos fumantes;
  - menores de 18 anos.
  
- Critérios de elegibilidade para o grupo I:
  - Ser frentista ou analista de Laboratório de Controle de qualidade de combustíveis, por tempo superior a seis meses.
  
- Critérios de elegibilidade para o grupo II:
  - Não ser exposto ocupacionalmente ao benzeno e a gasolina.

Aqueles que aceitaram a participar do estudo e que possuíam os critérios de elegibilidade foram instruídos a assinarem por extenso o TCLE (**apêndice A e B**) e preencherem o formulário (**apêndice C**) referente a dados pessoais e características individuais e/ou da exposição ocupacional, após serem dadas explicações e esclarecidas as possíveis dúvidas quanto ao projeto. O período de coleta dos participantes do grupo I e II foi de novembro de 2011 a maio de 2012, os postos de revenda de combustíveis se localizavam nas cidades de Ibitaré, Contagem e Belo

Horizonte (região Barreiro), e os analistas de combustíveis foram técnicos do Laboratório de Ensaio de Combustíveis (LEC), situado no campus da UFMG Pampulha. O grupo II foi formado por indivíduos oriundos da comunidade acadêmica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

## 5.2 Teste Cometa

### 5.2.1 Reagentes

- O padrão utilizado para provocar o dano ao DNA foi metilmetanosulfonato (MMS) da Sigma Aldrich;
- solução padrão de Brometo de etídio da marca Pht de 10 mg/ml utilizado para a coloração;
- água purificada foi obtida em um sistema Milli-Q Gradient (Millipore, USA);
- reagentes utilizados como agarose ultra pura da GibcoBRL, NaCl, EDTA dissódico, Tris-Cl, NaOH, DMSO, Triton X e sarcosinato de lauroil sódico foram de padrão analítico (p.a.) ou grau HPLC;
- tampão fosfato (PBS) de pH 7,2 utilizado foi adquirido pela Laborclin.

As agaroses de ponto de fusão normal (PFN) e baixo ponto de fusão (BPF) foram preparadas pela adição de 1,5% e 0,5% p/v de agarose em tampão PBS respectivamente, a dissolução do reagente em tampão PBS, foi feita através do aquecimento em forno micro-ondas. A solução de lise foi preparada através de uma dissolução altamente concentrada em sais (NaCl 2,5M, EDTA dissódico 100mM, Tris-Cl 10mM, Triton X 1%, DMSO 10% e sarcosinato de lauroil sódico 1%). A solução de eletroforese funciona como um tampão alcalino, composta de NaOH 10N e EDTA dissódico 200mM, sendo que o pH deve ser > 13. A solução de neutralização foi preparada com a adição de Tris-Cl 0,4M em água Mili-Q, e ajustando o pH para 7,5 e a solução de Brometo de etídio na concentração 20ug/mL, foi preparada a partir da solução padrão, em capela, dissolvendo-a em tampão PBS. Todas as soluções foram acondicionadas em frascos âmbar, sob temperatura ambiente as soluções de lise, eletroforese e neutralização e sob temperatura de refrigeração de 2 a 8 °C, o tampão PBS e a solução de Brometo de etideo 20 ug/mL.

### 5.2.2 Equipamentos

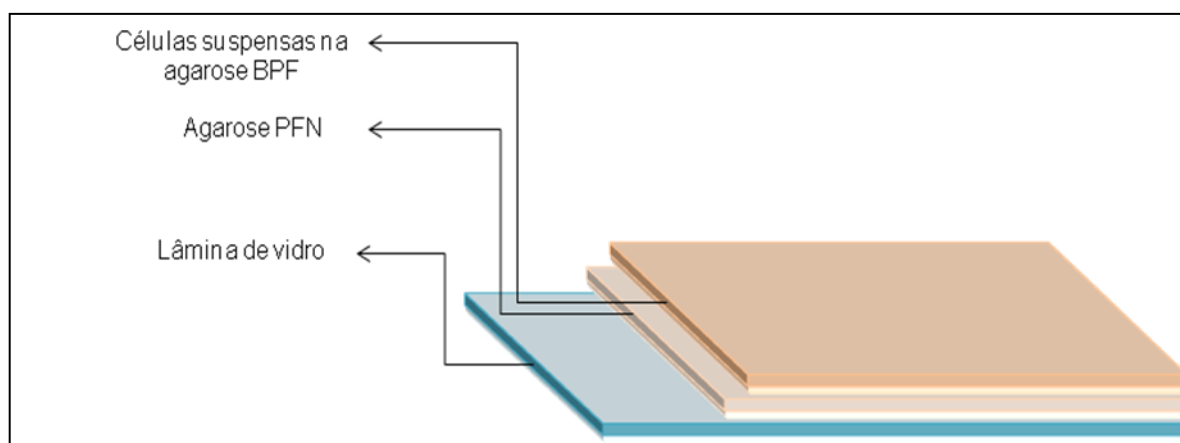
Os principais equipamentos utilizados foram: balança analítica marca Ohaus E02140, balança semi-analítica marca Bel SSR 600, peagâmetro da marca Digimed DM21, cuba de eletroforese horizontal da marca Loccus Biotecnologia 12cm x 14cm, banho maria da marca Hemoquímica HM1003 e microscópio de campo escuro da Carl Zeiss. Para o processo de irradiação das lâminas foi utilizado uma fonte de Cobalto-60 estocada a seco com atividade máxima de 2.200 TBq ou 60.000 Ci, do Laboratório de Irradiação Gama - LIG do CDTN.

### 5.2.3 Padronização e validação do método

A metodologia do Teste Cometa padronizada neste estudo, se baseou nos procedimentos descritos previamente por Rojas et al. (1999), Hartman et al. (2003), Tice et al. (2000) e Azqueta et al. (2011).

A primeira etapa para realização do Teste Cometa consiste na preparação da lâmina com agarose de ponto de fusão normal (PFN 1,5% p/v) e posterior suspensão celular da amostra com agarose de baixo ponto de fusão (BPF 0,5% p/v). A lâmina com agarose PFN foi feita pela imersão da lâmina na agarose em 60 °C. Após a secagem da lâmina com agarose PFN, a amostra preparada anteriormente é colocada na lâmina (Tice et al., 2000). A preparação da amostra consiste em misturar 5µl de sangue total a 120µl de agarose de baixo ponto de fusão BPF a 37 °C, como ilustrado na **figura 3**.

**Figura 3 - Aspecto da lâmina em que se realiza o teste cometa.**





Após o preparo das lâminas com o sangue total, foi realizada a lise das células com uma solução altamente concentrada em sais, que foi preparada em duas etapas. A solução de lise inicial resulta na dissolução do NaCl, Tris-Cl, EDTA dissódico e sarcosinato de lauroil sódico em água, ajustando o pH para 10 com NaOH, que pode ser armazenada por até seis meses. Já na solução de lise final, é acrescentado o Triton X e DMSO, esta foi utilizada somente no dia do experimento (Rojas et al., 1999). As lâminas com a amostra foram mantidas nesta solução final por no mínimo 1 hora.

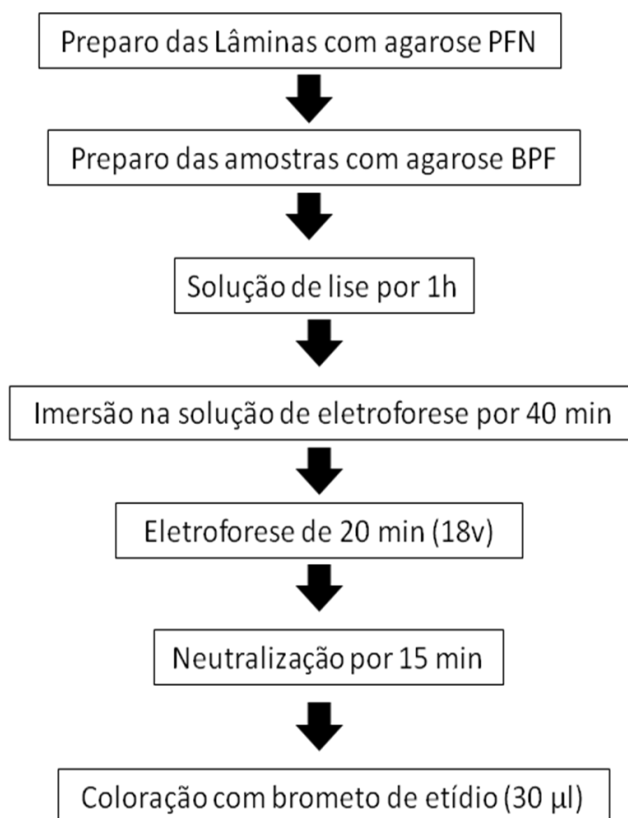
Após serem removidas da solução de lise, as lâminas foram secas e mergulhadas em solução tampão alcalina para eletroforese, com o  $\text{pH} > 13$ . As lâminas foram mantidas neste tampão alcalino por 40 minutos, permitindo o desenrolamento do DNA e o afrouxamento de suas ligações. A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal com a voltagem de 18v e corrente de 300 mA, pois foi estabelecido uma voltagem ótima de 1,15V/cm para 20 minutos de corrida (Azqueta et al., 2011). A eletroforese foi realizada na temperatura de 4 °C, sob banho de gelo e ausência de luz.

Posteriormente a eletroforese, foi realizada a neutralização das lâminas, que são retiradas da cuba eletroforética, secadas e incubadas com a solução de neutralização por 15 mim. As lâminas foram fixadas com etanol P.A por 5 minutos e armazenadas em recipiente próprio na geladeira até o momento da leitura, as lâminas sem a coloração podem ser conservadas por um período maior. Para a análise das lâminas foi adicionando 30uL de solução de brometo de etídeo (20ug/mL) sobre a lâmina e cobertas com lamínula, tais técnicas foram descritas por Rojas et al. (1999). Todos esses passos devem ser realizados na presença de baixa luminosidade.

O uso de controles na realização do procedimento permite verificar se o teste foi satisfatório, pois muitas substâncias podem provocar dano ao DNA e assim, o teste pode funcionar como controle positivo, para isso é necessário que esta substância seja conhecidamente genotóxica e causar dano detectável no teste cometa. Entre elas está o metilmetanosulfonato (MMS); etilmetanossulfonato (EMS); etilnitrosourea (ENU); N-nitrosodimetilamina (N-DMA) e 1-nitrosopiperidina, tais substâncias são

utilizadas em cada série de teste cometa com o objetivo de verificar se as etapas foram realizadas corretamente, principalmente a eletroforese, dependendo da concentração a ser utilizada do agente genotóxico, pode se esperar um dano ao DNA já estabelecido (Hartmann et al., 2003). Neste estudo, foi utilizado o MMS em 2 concentrações ( 0,8 mM e 0,4 mM) em todas as corridas do teste cometa, sabendo-se que é necessário incubar o a solução genotóxica juntamente com o sangue de um indivíduo pertencente ao grupo II, 2h antes da preparação da lâmina. O procedimento completo do teste cometa é ilustrado na **figura 4**.

**Figura 4 - Procedimento do teste cometa.**



O procedimento de Calibração do método consistiu na realização do estudo de linearidade e reprodutibilidade. Para construir a curva de linearidade foram seguidos os procedimentos já descritos na literatura (Pitozzi et al.2006, Collins, 2008), que utilizaram raios  $\gamma$  em diferentes doses (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 Gy) em amostras de sangue de indivíduos isentos de exposição à substâncias genotóxicas. Espera-se que a irradiação com raios  $\gamma$  danifique as células sanguíneas e que o dano provocado reflita quantitativamente nos cometas. Este ensaio é normalmente feito

através da medição danos nas células, após a irradiação das amostras com raios  $\gamma$  ou X, nas doses de 0 a 10 Gy. Sabe-se que 1 Gy de raios  $\gamma$  ou X pode introduzir cerca de 1000 quebras em cada célula diploide (Collins, 2008).

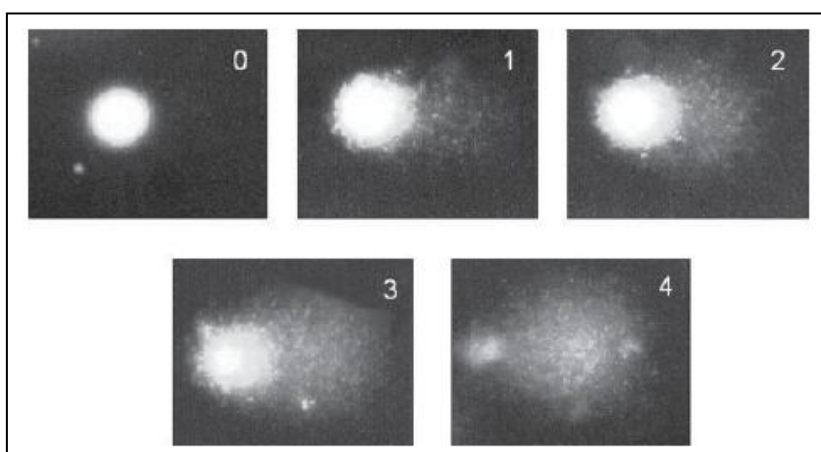
As amostras foram irradiadas no Laboratório de Irradiação Gama - LIG do CDTN, utilizando um Irradiador Panorâmico Múltipropósito de Categoria II, fabricado pela MDS Nordion no Canadá, Modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127. Para minimizar as possíveis interferências, como por exemplo, o reparo das quebras induzidas ao DNA por enzimas específicas (Collins, 2004), as amostras foram irradiadas já embebidas em agarose BPF e sob a temperatura de 4 °C. Foram utilizadas doses de 0 a 10 Gy.

Para avaliar a reprodutibilidade parcial do teste cometa foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos não expostos às substâncias genotóxicas, principalmente ao benzeno. Todas as amostras foram feitas em triplicata e irradiadas nas doses de 0,0; 5,0 e 10,0 Gy. Além disso, para avaliar o viés da observação individual foi utilizado um observador a mais para leitura do dano induzido. Os resultados foram comparados e estabelecidos os respectivos desvios padrão.

#### 5.2.4 Classificação do Dano ao DNA

De acordo com a aparência do cometa o dano no DNA pode ser classificado em 5 classes de cometa, de 0 (sem cauda) a 4 (quase todo o DNA na cauda), de acordo com Collins et al. (2004), ilustrado na **figura 5**.

**Figura 5 - Classificação dos cometas.**



Fonte: Collins, 2004

O resultado do Teste Cometa em cada amostra é estimado como “Índice de Dano” (ID), calculado a partir de 100 células (cometas) que foram contadas e para cada uma delas é atribuído um valor de 0 a 4 de acordo com a sua aparência. O ID pode variar de 0 a 400, como demonstrado na equação (1) abaixo:

$$ID = [(M0 \times 0) + (M1 \times 1) + (M2 \times 2) + (M3 \times 3) + (M4 \times 4)] \quad (1)$$

Onde;

ID= Índice de Dano

M0 = Número de células com classe de dano 0;

M1 = Número de células com classe de dano 1;

M2 = Número de células com classe de dano 2;

M3 = Número de células com classe de dano 3;

M4 = Número de células com classe de dano 4.

Para cada indivíduo foi calculado o valor médio de ID, dependendo da quantidade de lâminas feitas, como na equação (2) a seguir:

$$ID \text{ médio} = \frac{ID_{L1} + ID_{L2} + ID_{L3} \dots}{N^{\circ} \text{ de Lâminas}} \quad (2)$$

Onde;

ID<sub>L1</sub> = Índice de dano da lâmina 1;

ID<sub>L2</sub> = Índice de dano da lâmina 2;

ID<sub>L3</sub> = Índice de dano da lâmina 3;

Nº de L = número de lâminas usadas em cada indivíduo.

## 5.3 Análise do AttM-u

### 5.3.1 Reagentes

- O padrão primário do ácido trans-trans mucônico utilizado foi da marca Sigma Aldrich;
- água purificada foi obtida em um sistema Milli-Q Gradient (Millipore,USA);
- solventes orgânicos utilizados foram: metanol grau HPLC da J.T. Baker e ácido acético da Vetec;
- fase móvel do AttM foi preparada utilizando a proporção metanol/ácido acético 1% (1:9), filtrada a vácuo e acertando o pH para 2,72.

A solução padrão estoque do analito foi feita em metanol, na concentração de 200 µg/ml, já a solução padrão intermediária foi preparada através da solução padrão estoque, na concentração de 50 µg/mL, a partir desta solução (intermediária), a solução padrão em fase móvel de 0,2 µg/mL foi feita. As soluções padrão de uso foram preparadas em *pool* de urina, nas concentrações de 0,0625; 0,125; 0,250; 0,500; 0,750; 1,0 e 1,5 µg/mL, utilizando a solução padrão intermediária. O *pool* de urina foi preparado através da coleta de urina de cinco indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno e também não fumantes, posteriormente, o *pool* foi filtrado e armazenado. As soluções padrão estoque, intermediária e de uso, juntamente com a fase móvel foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, sob temperatura de refrigeração entre 2°C e 8°C.

### 5.3.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados foram: balança analítica marca Ohaus E02140, banho de ultrassom marca Soni-tech 404A; peagâmetro da marca Digimed DM21, coluna de troca iônica Bakerbond SPE™ (100mg de amina quaternária) da J.P.Baker; manifold para extração da marca agilent; cromatógrafo líquido da Hewlett Packard (HP), modelo 1100 equipado com detector ultravioleta e termostato para coluna, sendo esta do modelo ACE 3 C18 de 3 µm.

### 5.3.3 Determinação do AttM-u

A determinação do AttM em amostras de urina foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Ocupacional (LATO) da Faculdade de Farmácia/UFMG, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV/VIS, utilizando o método de Ducos modificado por Paula et al. (2003)., já validado pelo referido laboratório.

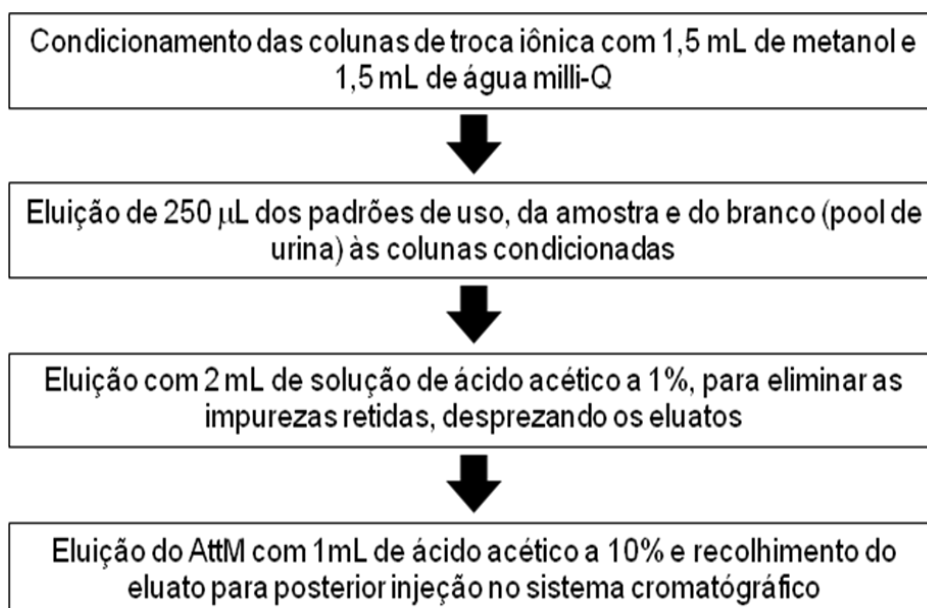
O método fundamenta-se na extração em fase sólida (SPE) do AttM presente na urina, utilizando-se uma coluna de troca iônica de amônia quaternária, seguida de identificação e quantificação, utilizando um cromatógrafo líquido equipado com detector ultravioleta.

### 5.3.4 Curva de calibração

Para determinação da concentração urinária do AttM foi usada uma curva de calibração, realizada a partir de soluções padrão de uso de AttM em urina nas concentrações 0,0625; 0,125; 0,250; 0,500; 0,750; 1,0 e 1,5  $\mu\text{g/mL}$ . O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método validado são 0,006  $\mu\text{g/ml}$  e 0,03  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

O método analítico consistiu no procedimento abaixo descrito na **Figura 6**:

**Figura 6 – Procedimento analítico do AttM-u**



## 6 RESULTADOS

### 6.1 Características da população estudada

A **Tabela 5** apresenta as principais características da população estudada e sua distribuição com relação à idade, sexo, tempo de exercício da profissão e consumo de álcool, sabendo-se que o grupo I é composto de frentistas e analistas de combustíveis e o grupo II, por indivíduos não expostos, como descrito no item 5.1.

A idade média do grupo I (exposto) foi de  $29 \pm 8,8$  anos, variando de 23 a 55 anos. A maioria eram frentistas (58%), homens (58%), entre 25 e 35 anos (54,8%) e que já trabalhavam há mais de 2 anos na profissão (38,7%). Como todos os indivíduos do grupo I trabalhavam 8hs por dia, esta não foi considerada uma variável a ser analisada. A idade média do grupo II (controle) foi de  $33 \pm 8,3$ , variando de 19 a 55, sendo que a maioria eram homens (59,1%) com idade entre 25 e 35 anos (54,5%).

**Tabela 5 – Características e estratificação da população estudada.**

<b>Características</b>	<b>Grupo I (Exposto)</b>	<b>Grupo II (Controle)</b>	<b>Valor p*</b>
Número de sujeitos	31	22	
Idade			
<25	9 (29%)	6 (27,3%)	
25 - 35	17 (54,8%)	12 (54,5%)	
>35	5 (16,2%)	4 (18,2%)	
<i>Idade média (anos <math>\pm</math> DP)</i>	$29,9 \pm 8,8$	$33 \pm 8,3$	>0,05
Profissão			
<i>Frentistas</i>	18 (58%)	–	>0,05
<i>Analistas</i>	13 (42%)	–	
Sexo			
<i>Feminino</i>	13 (42%)	9 (40,9%)	>0,05
<i>Masculino</i>	18 (58%)	13 (59,1%)	
Tempo de exposição			
> 6 meses	8 (25,8%)	–	>0,05
1 a 2 anos	11 (35,5%)	–	
> 2 anos	12 (38,7%)	–	
Consumo de álcool			
<i>Consumidores</i>	16 (51,6%)	12 (54,5%)	>0,05
<i>Não consumidores</i>	15 (48,4%)	10 (45,5%)	

\* O teste estatístico Mann Whitney

## 6.2 Teste cometa

### 6.2.1 Validação do teste cometa

Para validar o teste cometa foram realizados dois procedimentos: estudo da linearidade em relação às diferentes doses de radiação, para observação do dano induzido no DNA; e da reprodutibilidade, utilizando contagem das lâminas em triplicata, por dois observadores, sendo que somente os dados referentes ao primeiro observador, mais experiente, foram apresentados.

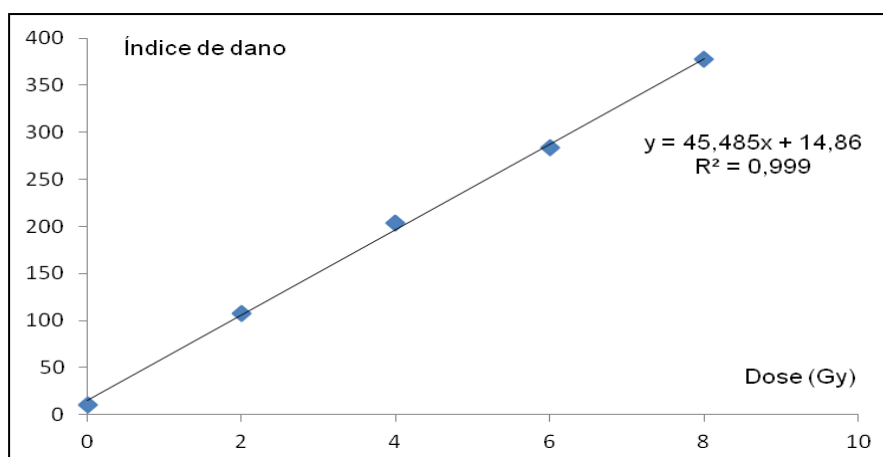
Os resultados das amostras irradiadas com as doses de 0,0 a 8,0 Gy são mostrados na **Tabela 6** e sua representação gráfica mostrada na **Figura 7**.

**Tabela 6 – Índice de Dano (ID) médio em relação às doses de radiação gama.**

Amostras	Doses em Gy				
	Basal (0,0)	2,0	4,0	6,0	8,0
1	10,7	107	203,3	301	389,7
2	8,7	102	207	300	384,4
3	13	111,3	201	265	361
4	11,3	110,7	203,6	269,7	375,7
ID Médio	10,9	107,8	203,7	283,9	377,7
Desvio Padrão	1,8	4,3	2,5	19,2	12,5

Os valores da tabela 6 foram plotados em um gráfico de regressão linear (**Figura 7**), observa-se que há uma relação linear entre o ID e a quantidade de irradiação  $\gamma$  recebida, medida em Gy, e que este método segue uma equação com limites definidos, sendo que o ID variou de 0 a 400. Foi observada boa correlação linear, apresentada pelo seu coeficiente ( $R^2$ ). Sendo  $R^2 = 0,999$ , ou seja, próximo de 1, o que indica uma forte correlação linear positiva entre as variáveis.

**Figura 7 – Índice de Dano em relação às doses de 0 a 8 Gy.**





Para avaliar a reprodutibilidade do teste cometa, foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos não expostos em triplicata e irradiação com as doses de 0,0; 5,0 e 10,0 Gy (**Tabela 7**).

**Tabela 7 – Teste de reprodutibilidade.**

Amostra / Dia	ID Médio			Valor p*	R <sup>2</sup>
	Doses				
	Basal 0 Gy	5 Gy	10 Gy		
Amostra 1 - 1º Dia	17,7	299,7	396,7	0,740	0,9328
Amostra 1 - 2º Dia	13	289,4	394,4		
Amostra 1 - 3º Dia	13,4	293,4	397,6		
Amostra 2 - 1º Dia	13,4	279,7	398	0,796	0,9442
Amostra 2 - 2º Dia	13,4	288	395		
Amostra 2 - 3º Dia	11,4	286,4	393,4		
Amostra 3 - 1º Dia	17,7	290,7	391	0,904	0,9397
Amostra 3 - 2º Dia	13,4	288,4	392,7		
Amostra 3 - 3º Dia	12,4	282,4	396,7		

\*O teste estatístico: kruskal Wallis.

O método se apresentou reprodutível, pois não houve diferença estatística entre os dados obtidos das três amostras testadas,  $p > 0,05$ . A relação linear foi mantida em  $R^2 > 0,9$ .

### 6.2.2 Análise do teste cometa em sangue periférico

O resultado do teste cometa realizado para ambos os grupos, é mostrado na **Tabela 8**. Os valores desse biomarcador, expresso em ID médio, apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparados os grupo I (exposto) e do grupo II (não exposto). Ao analisar os fatores individuais como sexo e idade, estes também apresentaram diferença entre os grupos, exceto para maiores que 35 anos, em que essa diferença não foi observada. O consumo de álcool entre os grupos I e II e a variável tempo de exposição, do grupo I não apresentaram correlações significativas.

Para o tipo de profissão exercida, encontramos ID aumentado em frentistas com relação aos analistas de combustíveis, conforme a **Tabela 9**. Para analistas entre 25

e 35 anos e do sexo feminino, a diferença no ID foi significativa, mas para analistas e frentistas < 25 anos e do sexo masculino não foi observada essa diferença.

**Tabela 8** – Resultado do teste cometa em ID na população estudada.

<b>Teste cometa</b>			
Índice de dano (ID) médio			
	Grupo I (exposto)	Grupo II (não exposto)	Valor p***
Número de sujeitos	31	19**	-
<b>Idade (n<sub>total</sub>)</b>			
<25 (15)	25,5	12,7	<0,05*
25 – 35 (29)	33,7	16,3	<0,05*
>35 (9)	30,7	28,8	>0,05
<b>Profissão (n)</b>			
<i>Frentistas</i> (18)	32,2	-	<0,05*
<i>Analistas</i> (13)	23,1	-	
<b>Sexo (n<sub>total</sub>)</b>			
<i>Feminino</i> (22)	27	16,3	<0,05*
<i>Masculino</i> (31)	29	19,3	<0,05*
<b>Tempo de exposição (n)</b>			
<i>6 meses a 2 anos</i> (19)	29,5	-	>0,05
<i>&gt; 2 anos</i> (12)	26,6	-	
<b>Consumo de álcool (n<sub>total</sub>)</b>			
<i>Consumidores</i> (28)	30,2	15,2	>0,05
<i>Não consumidores</i> (25)	26,7	23,1	>0,05
<b>Média total ± DP</b>	<b>28,4 ± 10,1</b>	<b>18,4 ± 10,1</b>	<b>&lt;0,05*</b>

\* valores estatisticamente significativos

\*\* não foi realizado teste cometa em três indivíduos do grupo II

\*\*\* O teste estatístico Mann Whitney.

**Tabela 9** – Resultado do teste cometa em ID na população exposta.

<b>Teste cometa</b>			
Índice de dano (ID) médio			
	Frentistas	Analistas	Valor p**
Número de sujeitos	18	13	
<b>Sexo</b>			
<i>Feminino</i>	39,3	19,3	<0,05*
<i>Masculino</i>	29,5	29,2	>0,05
<b>Idade</b>			
<25	28	23,6	>0,05
25 - 35	34,2	21,5	<0,05*
Média total ± DP	32,2 ± 10,6	23,1 ± 6,5	<0,05*

\* valores estatisticamente significativos

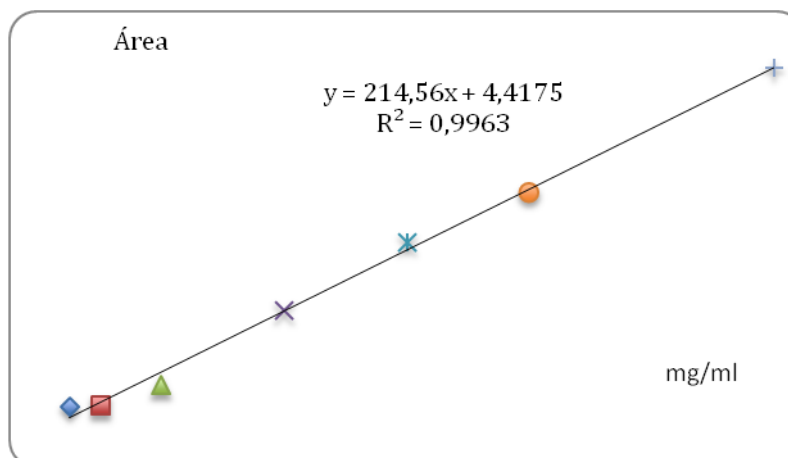
\*\* O teste estatístico Mann Whitney.

### 6.3 Análise do AttM-u

#### 6.3.1 Curva de calibração

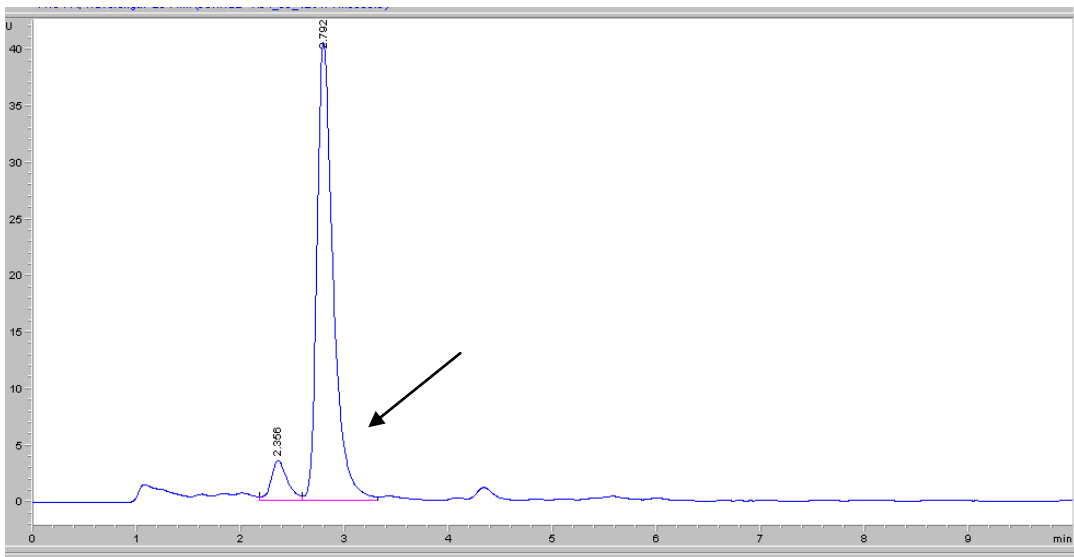
O método para extração do AttM foi realizado, conforme o item 5.3. A curva de calibração utilizada para determinar a concentração de AttM na urina é mostrada na **Figura 8**. Pode-se observar que o biomarcador obteve uma boa correlação linear,  $R^2 > 0,99$ , na faixa de concentração utilizada.

**Figura 8** - Curva de calibração do AttM em urina.

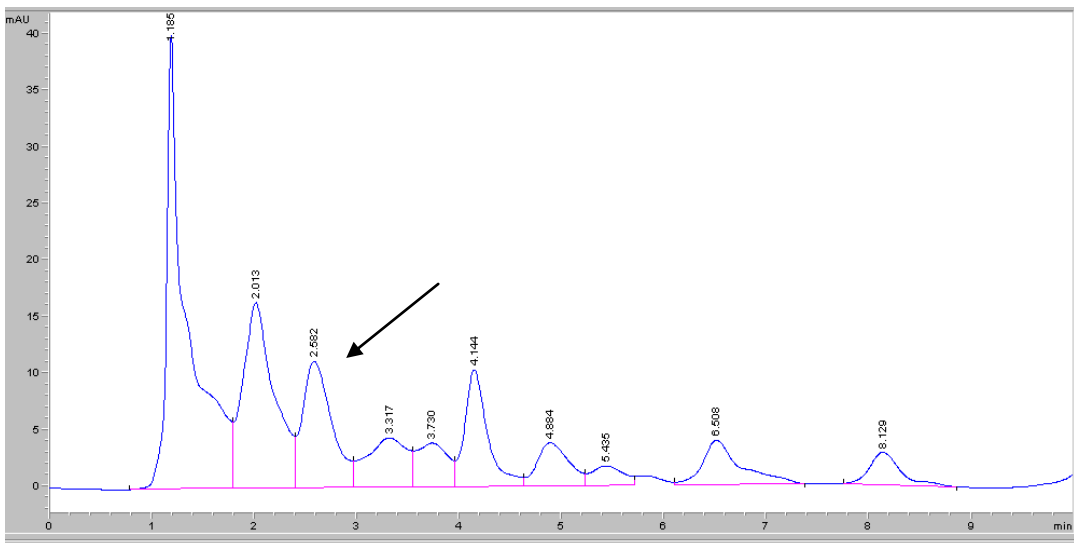


O tempo de retenção médio do AttM foi de  $2,56 \pm 0,21$  (**Figura 9**). O cromatograma apresentado na Figura 10, demonstra uma separação dos picos, podendo identificar com segurança o pico do AttM presente em uma amostra de urina. As figuras 11 e 12 demonstram os cromatogramas obtidos de análise de urina de indivíduos do grupo I e grupo II, respectivamente.

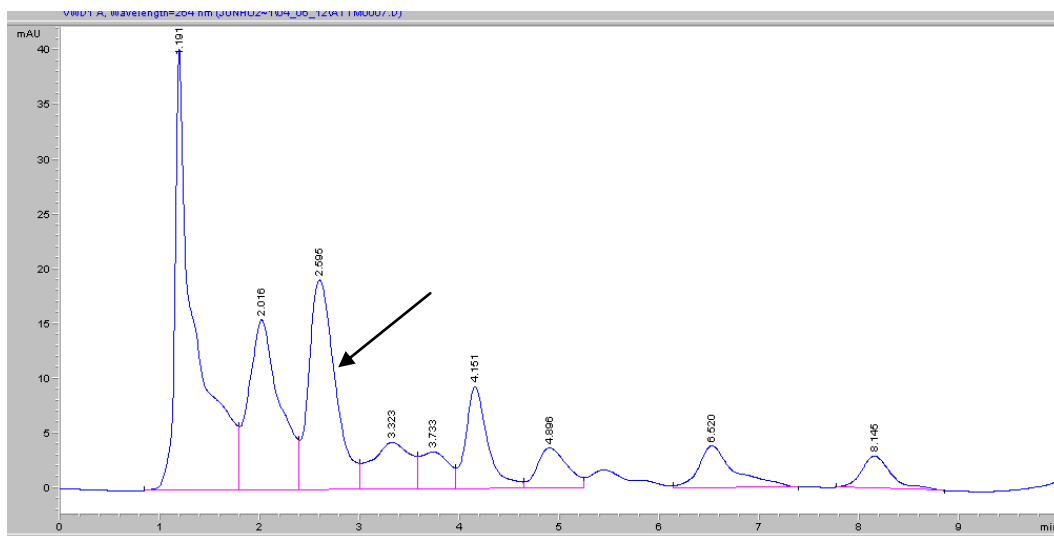
**Figura 9 – Cromatograma do padrão de AttM-u em fase móvel.**



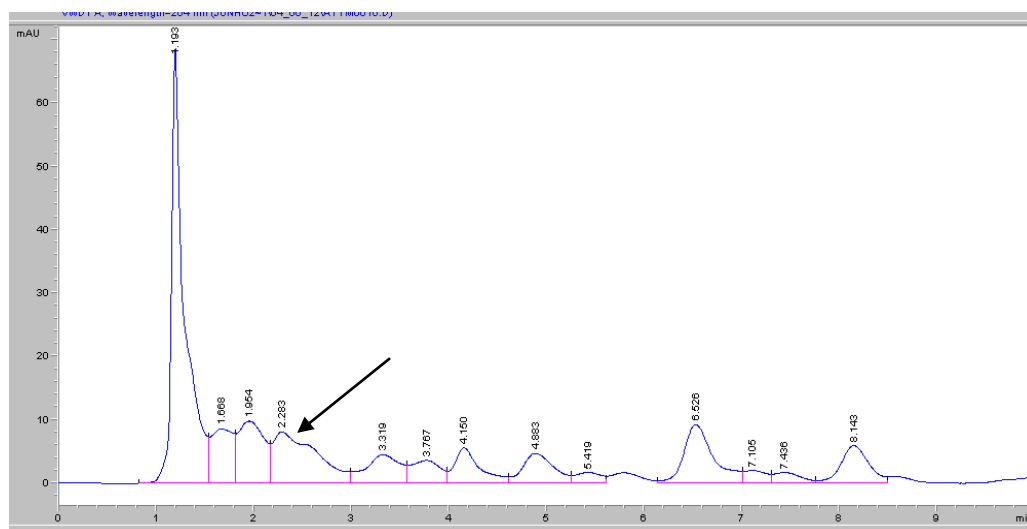
**Figura 10 – Cromatograma característico da análise do AttM-u por HPLC-UV-Vis.**



**Figura 11 – Cromatograma de uma amostra de urina de um indivíduo do grupo exposto por HPLC-UV-Vis.**



**Figura 12 – Cromatograma de uma amostra do grupo de um indivíduo do grupo não exposto por HPLC-UV-Vis.**



Os valores de ácido trans-trans mucônico na urina, foram corrigidos pela concentração de creatina na urina, por refletir um procedimento relevante na interpretação dos resultados dos metabólitos urinários. Essa correção é necessária, tendo em vista que a excreção dos metabólitos do benzeno pode ser alterada em presença de amostras muito concentradas (densidade > 1,030 e creatinina > 3 g/L) ou diluídas (densidade < 1,010 e creatinina < 0,5 g/L) (ACGIH, 1999). Para

realização do estudo, o valor de creatinina nas amostras de urina em desacordo com as especificações foram descartadas. Somente uma amostra do grupo exposto foi descartada, por estar extremamente diluída, esta amostra também não contribuiu com o teste cometa.

A análise do AttM foi realizada para ambos os grupos, conforme apresentado na **Tabela 10**. Os valores médios deste biomarcador de exposição ao benzeno no grupo exposto demonstrou diferença significativa, quando comparado com os valores do grupo não exposto ( $p < 0,05$ ). Ao analisar os fatores individuais como sexo e idade, estes continuaram a apresentar diferença entre os grupos, exceto para maiores que 35 anos e do sexo feminino. O consumo de álcool entre os grupos I e II e a variável, tempo de exposição, do grupo I não apresentaram correlações significativas.

Para o tipo de profissão exercida, encontramos excreção aumentada de AttM em frentistas em relação aos analistas de combustíveis, conforme a **Tabela 11**. Porém, ao estratificar o grupo I, a diferença se mantém somente para o sexo feminino.

**Tabela 10 – Ácido trans-trans mucônico médio em mg/g de creatinina.**

<b>Ácido <i>trans-trans</i> mucônico</b>			
AttM (mg/g) médio			
	Grupo I (exposto)	Grupo II (não exposto)	Valor p <sup>**</sup>
Número de sujeitos	31	22	-
<b>Idade (n<sub>total</sub>)</b>			
<25 (15)	1,34	0,22	<0,05*
25 – 35 (29)	1,14	0,37	<0,05*
>35 (9)	0,55	0,70	>0,05
<b>Profissão (n)</b>			
<i>Frentistas</i> (18)	1,38	-	<0,05*
<i>Analistas</i> (13)	0,61	-	
<b>Sexo (n<sub>total</sub>)</b>			
<i>Feminino</i> (22)	1,15	0,44	>0,05
<i>Masculino</i> (31)	1,11	0,44	<0,05*
<b>Tempo de exposição (n)</b>			
<i>6 meses a 2 anos</i> (19)	1,30	-	>0,05
<i>&gt; 2 anos</i> (12)	0,91	-	
<b>Consumo de álcool (n<sub>total</sub>)</b>			
<i>Consumidores</i> (28)	0,86	0,49	>0,05
<i>Não consumidores</i> (25)	1,40	0,40	
<b>Média total ± DP</b>	<b>1,13 ± 0,45</b>	<b>0,44 ± 0,33</b>	<b>&lt;0,05*</b>

\* valores estatisticamente significativos

\*\* O teste estatístico Mann Whitney.

**Tabela 11 - Ácido trans-trans mucônico médio em mg/g de creatinina por profissão.**

<b>Ácido <i>trans-trans</i> mucônico</b>			
AttM (mg/g) médio			
	Frentistas	Analistas	Valor p**
Número de sujeitos	18	13	
<b>Sexo</b>			
<i>Feminino</i>	1,91	0,38	<0,05*
<i>Masculino</i>	1,18	0,89	>0,05
<b>Idade</b>			
<25	1,76	0,78	>0,05
25 - 35	1,34	0,50	>0,05
Média total ± DP	1,38 ± 1,18	0,61 ± 0,35	<0,05*

\* valores estatisticamente significativos

\*\* O teste estatístico Mann Whitney

6.4 Correlação entre os biomarcadores de exposição (AttM) e genotoxicidade (teste cometa)

As **Tabelas 12 e 13** apresentam os dados obtidos dos biomarcadores de exposição e genotoxicidade, que foram reunidos para uma melhor análise. A **Tabela 12** apresenta os valores do teste cometa em ID e de AttM em mg/g de creatinina, para os grupos I e II estratificados por diferentes características. Já a **Tabela 13** apresenta os resultados do AttM e teste cometa entre frentistas e analistas de maneira distinta, buscando identificar o risco potencial em relação a exposição pela função exercida.



**Tabela 12 – Valores dos biomarcadores para a população estudada.**

<b>Valores dos biomarcadores entre o grupo I e II</b>					
	Teste cometa (ID médio)**		AttM (mg/g) médio**		Teste K <sup>a</sup>
Sujeitos	Grupo I	Grupo II	Grupo I	Grupo II	
	31	19	31	22	
<b>Sexo</b>					
<i>Feminino</i>	27*	16,3*	1,15	0,44	0,86
<i>Masculino</i>	29*	19,3*	1,11*	0,44*	0,77
<b>Idade</b>					
<25	25,5*	12,7*	1,34*	0,22*	0,53
25 - 35	33,7*	16,3*	1,14*	0,37*	0,84
>35	30,7	28,8	0,55	0,70	
Media Total ± DP	28,4* ± 10,1	18,4* ± 10,1	1,13* ± 0,45	0,44* ± 0,33	0,85

\* valores estatisticamente significativos

\*\* O teste estatístico Mann Whitney.

<sup>a</sup> Teste kappa para o grupo II

**Tabela 13 – Valores dos biomarcadores para o grupo I (exposto).**

<b>Valores dos biomarcadores entre frentistas e analistas</b>				
	Teste cometa (ID médio)**		AttM (mg/g) médio**	
	Frentista	Analista	Frentista	Analista
<b>Sujeitos</b>				
<b>Sexo</b>				
<i>Feminino</i>	39,3*	19,3*	1,91*	0,38*
<i>Masculino</i>	29,5	29,2	1,18	0,89
<b>Idade</b>				
<25	28	23,6	1,76	0,78
25 - 35	34,2*	21,5*	1,34	0,50
Media Total ± DP	32,2* ± 10,6	23,1* ± 6,5	1,38* ± 1,18	0,61* ± 0,35

\* valores estatisticamente significativos

\*\* O teste estatístico Mann Whitney.

## 7 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou possíveis efeitos genotóxicos de exposição do benzeno em frentistas e analistas de combustíveis. Para tal, utilizou-se o teste cometa para determinar a extensão do dano primário ao DNA em indivíduos expostos e não expostos, correlacionando os achados com valores determinados para o ácido trans-trans mucônico, biomarcador de exposição ao benzeno. Para a realização do teste cometa nas amostras de sangue dos indivíduos, o método foi padronizado e validado de acordo com os parâmetros de mérito estabelecidos.

O método de análise do teste cometa é relativamente fácil, rápido, barato, sensível e reproduzível para se mensurar dano (quebras) ao DNA, não sendo necessários equipamentos sofisticados para sua execução. Um laboratório pode ser facilmente adaptado para realizar rotineiramente o teste cometa, sendo necessários instrumentos simples como estufa, banho maria, cuba e fonte para eletroforese horizontal, sala escura e um microscópio de campo escuro, mas, com o uso da coloração de prata, já é possível a visualização em microscópio comum. Contudo, a realização do teste cometa requer prática, pois a maioria de seus processos são manuais, desde a preparação das lâminas até sua leitura. A execução do método por um técnico inexperiente, pode potencialmente interferir na sua qualidade como biomarcador (Moller et al. 2004; Brianezi et al. 2009). Várias recomendações sobre os procedimentos técnicos foram publicados para estabelecer uma metodologia padrão e servir como base para a sua execução (Tice et al., 2000; Hartman et al., 2003).

Após tomar conhecimento e prática do teste cometa, procedimentos para sua padronização e validação foram realizados. A partir dos ensaios realizados foi observado que a concentração da agarose de ponto de fusão normal (PFN) e de baixo ponto de fusão (BPF) é essencial para uma boa execução de todo o teste. Agarose de PFN abaixo ou acima de 1,5%, dificulta a produção das lâminas primárias (lâminas esmerilhadas cobertas com agarose PFN). Além disso, as lâminas devem estar secas e em temperatura ambiente para a aplicação da agarose 0,5%. A agarose de baixo ponto de fusão (BPF), com concentração acima de 0,5%, solidifica em 37°C, e por isso impede que a amostra (sangue total) seja colocada de

maneira homogênea na lâmina. Portanto todas as soluções foram cuidadosamente preparadas nas exatas concentrações padronizadas.

Outra etapa importante no teste cometa e que pode ser afetada por pequenas variações é a eletroforese. Vários experimentos foram realizados a fim de determinar uma voltagem e um tempo ótimo para a corrida, sempre conservando a amperagem em 300 mA. Observou-se que um tempo de incubação maior na solução de eletroforese danificava mais as células, e que, uma voltagem alta, fazia com que o cometa “esticasse” e uma voltagem baixa com que ele “encolhesse”. O tempo de incubação e corrida, bem como a voltagem ótima foi padronizado de acordo com a cuba utilizada, como discutido em Azqueta et al. (2011).

O estudo de calibração foi realizado pela irradiação  $\gamma$  (0 a 10 Gy) em amostra de sangue total, sabendo-se que ao irradiar células diploides com 1 Gy de radiação X ou  $\gamma$ , introduz cerca de 0,31 quebras por 109 dalton de DNA, que corresponde a cerca de 1000 quebras por célula (Kohn et al., 1976). Muitas discrepâncias podem surgir a partir de variações pequenas nos protocolos e na produção do dano ao DNA, decorrente das fontes de radiação, que diferem em tipo, energia ou mesmo em qualidade. Sendo assim, a literatura tem preconizado a utilização de doses de 0,2 a 10 Gy nas células para efeitos de calibração, isto engloba o nível de danos susceptíveis de serem encontrados nas células expostas ou não expostas a agentes mutagênicos (Collins, 2008; Pitozzi et al., 2006). Quando o dano provocado na célula é muito alto, ocorre um efeito de saturação, ou seja, a “cauda” do cometa aproxima-se do seu comprimento máximo e não há vestígios da sua “cabeça”, o que não é satisfatório, pois, nesse momento, o dano não pode ser medido com precisão.

Nos estudos realizados a fim de verificar a linearidade e reprodutibilidade parcial do método, observou-se uma boa correlação. Collins et al. (1996) também relataram dose-resposta linear dos danos causados no DNA, nas doses de 0 a 10 Gy, detectados pelo ensaio cometa em linfócitos irradiados com raios-X e Pouget et al. (1999), relataram tal correlação, a partir de irradiações  $\gamma$  nas dose de 0 a 8 Gy. Porém, o primeiro teste (0, 2, 4, 6 e 8 Gy) apresentou  $R^2$  maior que no segundo teste (0, 5 e 10 Gy), diferença que pode ser explicada pela quantidade de pontos

realizados. A reprodutibilidade foi verificada utilizando as doses (0, 5 e 10 Gy) por apresentar uma visualização melhor que (0, 2, 4, 6 e 8 Gy).

A quantificação do teste cometa pode ser feita por softwares ou manualmente. Para a medida automatizada, há vários programas que calculam o dano do DNA a partir da fluorescência utilizada na coloração, como o comprimento da cauda e a diferença de intensidade da fluorescência entre a cabeça e cauda do cometa, sendo estes expressos em parâmetros fornecidos pelo programa. No entanto, na quantificação manual, o olho humano pode ser facilmente treinado para distinguir os diferentes tipos de danos e classificar o cometa de acordo com sua aparência. A quantificação manual tem sido utilizada para expressar os resultados, caso o laboratório não disponha da automatização. Moller et al. (2004) e Moller (2006) ao comparar a quantificação manual e automatizada demonstraram uma relação muito próxima entre as duas formas, considerando um observador com prática. O fator “prática” foi observado no estudo de reprodutibilidade entre os observadores, em que foram testadas três amostras do grupo II (Não exposto) em três dias diferentes (**Tabela 7**). Nesse processo a leitura foi feita por mais de um observador, sendo que o primeiro era mais experiente e o segundo não. Na leitura dos dois observadores houve diferença estatística entre os observadores (para amostras 1 e 3), provavelmente devido a experiência distinta de ambos os observadores.

A coleta de amostras para estudo foi a que consumiu maior tempo do projeto, principalmente a do grupo I (Exposto). Muitas dificuldades foram encontradas, entre elas a mais importante foi à aprovação de gerentes ou proprietários dos postos de revenda de combustíveis, pois muitos acreditavam que o estudo era parte de uma investigação da vigilância sanitária sobre a saúde ocupacional de seus empregados, e que caso fossem encontradas irregularidades, o local poderia ser multado. Outras dificuldades encontradas foram: local inadequado para a coleta, dificuldade de compreensão sobre a utilidade dos exames (teste cometa e AttM), medo de agulha e receio de demissão, caso o exame estivesse alterado. Neste sentido, a abordagem esclarecedora junto aos voluntários foi importante para adesão ao estudo. Para o grupo de analistas de combustíveis, vale ressaltar que a contribuição do LEC foi essencial. Outras empresas, onde existe exposição ocupacional à combustíveis foram solicitadas, porém, o maior empecilho foi o desconhecimento e medo que a

palavra genotoxicidade, no caso o teste cometa, por se tratar de um exame que detecta danos ao DNA. Além de um entendimento equivocado de que se o teste cometa estivesse “alterado”, isso iria gerar processos trabalhistas. Portanto, o número de voluntários do grupo exposto foi pequeno, o que pode ser considerada uma limitação do estudo.

Após a coleta dos dados, foi realizada a sua análise, sendo que os resultados obtidos para o teste cometa demonstram que o grupo exposto exibiu um grau significativamente mais elevado de danos no DNA em linfócitos periféricos no teste cometa, do que o grupo não exposto (**Tabela 8**). Esse resultado acompanhou a excreção aumentada de AttM urinário (**Tabela 10**), de forma semelhante ao que foi relatado em outros países (Andreoli et al, 1997; Pandey et al., 2008; Keretsetse et al., 2008).

Ao estratificar a população, para o teste cometa, observamos que entre sexo e idade inferior a 35 anos, a diferença entre os dois grupos é mantida, mas que para maiores de 35 anos, não existe diferença de dano ao DNA para o grupo exposto e não exposto. Esse achado pode ser explicado pelo acúmulo de danos ao DNA (mutações) que ocorre naturalmente em indivíduos mais velhos (Moller, 2006). Essa pode ser, potencialmente, uma limitação no uso do teste cometa, como biomarcador para avaliar a exposição ao benzeno ou à outra substância genotóxica. Pois a sensibilidade pode ser afetada pela idade dos indivíduos expostos, sendo menor para grupos de indivíduos acima de 35 anos.

Para o consumo de álcool, não foram encontradas diferenças entre consumidores e não consumidores, dado também relatado por Rekhadevi et al. (2010). Nenhuma diferença estatística foi observada no grupo I, com relação a tempo de exposição, menor ou maior que 2 anos, concordando também com dados da literatura (Pandey et al., 2008).

Ao estratificar o grupo exposto por função (**Tabela 9**), entre frentistas e analistas, encontramos diferenças relevantes, o que pode estar relacionado ao fato de que os analistas de combustíveis geralmente possuem e trabalham com EPI's e em um local com fluxo de ar controlado, diminuindo o risco da exposição pelos solventes,

entre eles o benzeno. Porém o grupo de analistas, quando comparado ao controle, ainda possui um dano ao DNA relativamente mais alto e significativo.

Ao separar o grupo exposto (frentista e analistas) entre sexo e idade, observamos que o sexo feminino e a faixa etária de 25 a 35 anos, a diferença foi conservada, ou seja, o ID dos frentistas é estatisticamente maior em relação aos analistas. Porém, para o grupo de homens e a faixa etária menor que 25 anos, de ambos setores (frentista e analistas), essa diferença não é observada, resultando em um ID praticamente igual entre frentistas e analistas. O ID das frentistas mulheres foi maior que o ID dos homens frentistas, porém sem importância estatística.

Com relação à idade, a hipótese para explicar a diferença estatística encontrada somente na população de faixa etária de 25 a 35 anos é que, trabalhadores menores que 25 anos foram menos expostos e os efeitos crônicos do solvente ainda não foram estabelecidos. É importante ressaltar, que tais observações, necessitam de maior investigação para sua confirmação, pois a população estudada era pequena e existem poucos estudos que demonstram estas diferenças para o teste cometa.

Ao analisar o biomarcador clássico de exposição do benzeno, o ácido trans-trans mucônico, observamos que os níveis urinários foram significativamente maiores entre os trabalhadores, em comparação com o grupo não exposto (**Tabela 10**). Este resultado caracteriza o tipo de trabalho em que são expostos a baixas concentrações de benzeno diariamente, do processo de trabalho e da não utilização de equipamentos de proteção individual para solventes orgânicos. De acordo com a Portaria 34/200, a partir dos valores de AttM-u supõe-se que o benzeno está em torno de 0,3 a 0,6 ppm, cuja exposição está abaixo do VRT estabelecido. No entanto, a exposição ao benzeno abaixo do VRT não exclui o risco, como discutido anteriormente. Valores semelhantes para trabalhadores frentistas também foram relatados na literatura (Costa, 2009).

Os valores de ATTM encontrados nas amostras de urina do grupo não exposto estes estão de acordo com os relatados na literatura, onde são relatados valores basais variando de <0,01 a 0,66 mg/g de creatinina (Gobba et al., 1997; Ducos et al., 1992; Boogaard e Van Sittert, 1995).

A influência do hábito de fumar, da ingestão de ácido sórbico e seus sais, presentes em alguns alimentos industrializados, do uso de bebida alcoólica, do manuseio de produtos químicos que possam conter benzeno na sua composição e da co-exposição ao tolueno, são fatores que interferem na determinação do AttM urinário. No entanto, para evitar tais desvios na análise, foram excluídos indivíduos fumantes e um questionário detalhado (**Apêndice C**) foi aplicado para os dois grupos. O consumo de álcool não apresentou diferença estatística entre os grupos, como também relatado por Paula et al. (2003). Nenhum dos participantes do estudo relatou o consumo excessivo de alimentos com alto índice de conservantes como enlatados e embutidos.

Ao separar a população estudada entre idade, sexo e tempo de exposição, foi observada diferença estatística na excreção urinária de AttM entre grupos I e II. Essa diferença se conserva entre os menores que 35 anos e o sexo masculino. Esperava-se que o grupo feminino exposto e não exposto também apresentasse essa diferença, já que os valores de AttM do grupo exposto feminino são semelhantes ao grupo exposto masculino, mas como mencionado, esta análise estatística pode ter sido afetada pelo baixo número de voluntários na pesquisa.

Não houve diferença estatística na concentração do AttM, quando comparamos o tempo de exposição (6 meses a 2 anos e maior que 2 anos) e a faixa etária (maiores que 35 anos), fato também observado no teste cometa. Podemos observar que existe uma correlação positiva entre a idade e a excreção de AttM tanto para o grupo I (exposto), quanto para o grupo II (não exposto), ou seja, quanto mais velho, maior será a concentração de AttM encontrada, esta observação também foi relatada por Paula et al. (2003). No entanto, não foi vista diferença estatística para maiores de 35 anos, pois foi encontrado uma excreção diminuída no grupo exposto (0,55 mg/g), que contradiz a correlação positiva encontrada em indivíduos expostos menores que 35 anos, e este fato pode ser explicado pelo baixo número de participantes com idade superior a 35 anos (5 voluntários) e/ou alguma patologia renal não detectada pela creatinina, até mesmo algum erro na coleta do material, afetando a análise estatística.

Na avaliação do ácido trans-trans mucônico urinário entre os frentistas e analistas, o primeiro apresentou níveis de excreção médio de AttM acima daqueles observados entre os analistas, embora ambos estejam particularmente expostos ao benzeno durante a jornada de trabalho. A segregar o grupo exposto por sexo e idade, observamos esta diferença somente para o grupo feminino, e que as frentistas mulheres apresentaram maior excreção de AttM dentre os quatro grupos (**Tabela 11**), fato também observado também por meio do teste cometa.

Ao correlacionar os dois biomarcadores (**Tabela 12 e 13**), observamos que a diferença estatística encontrada entre os grupos I e II, com relação à idade, sexo, consumo de álcool, tempo de exposição, para o teste cometa, foram as mesmas para o AttM, salvo algumas restrições numéricas no grupo feminino. Esta correlação também foi observada por outros autores, como Sul et al. (2005), Pandey et al. (2008) e Andreoli et al. (1997). Além disso, o teste de correlação entre as variáveis (AttM e teste cometa), o teste kappa (**Tabela 12**), permite verificar que os dois biomarcadores possuem uma boa correlação entre si ( $k > 0,70$ ), porém ao realizar o teste por idade e sexo, ocorre um pequena diminuição no valor de k, devido talvez a ineficácia de correlacionar grupos pequenos.

O biomonitoramento de populações expostas a agentes mutagênicos ou potencialmente cancerígenos, através do teste cometa, pode proporcionar uma detecção precoce de algum defeito celular para o reparo no DNA. Nos últimos anos, este ensaio têm se tornado uma ferramenta importante para avaliar o dano ao DNA em populações expostas à substâncias mutagênicas (Collins, 2008). Embora essa detecção de danos ao DNA, utilizando linfócitos do sangue periférico, não represente a curto e médio prazo, o aparecimento de patologias relacionadas, especialistas aceitam que as células de sangue podem ser utilizadas como “células sentinelas” e que forneceria precocemente sinais de alerta para efeitos adversos em longo prazo à saúde (Anderson et al., 1998).

Um grande problema na interpretação de estudos de biomonitoramento é estimar o grau de exposição, e se o resultado encontrado reflete realmente à substância em estudo, pois pode existir uma co-exposição a outros agentes mutagênicos, além dos fatores individuais. É possível controlar, nos estudos de biomonitoramento, alguns



fatores como cigarro, álcool, idade, sexo, entre outros fatores de variabilidade, porém às vezes não é possível atribuir o dano genotóxico para uma substância química em particular, pois como discutido, não existe isenção de exposição para alguns solventes, como por exemplo, o benzeno. Assim, o dano ao DNA observado em nosso estudo pode não ser atribuído apenas ao benzeno, mas também a um efeito cumulativo de muitos outros compostos químicos e condições, que não foram avaliados e que podem fazer parte da vida dos participantes, sendo no ambiente de trabalho ou não. No entanto como o estudo teve um delineamento caso-controle, existem fortes evidências de que o dano ao DNA aumentado encontrado nesta população está ligado ao benzeno, e que a exposição constitui um risco à saúde.

É importante ressaltar que o teste cometa parece ser adequado como um ensaio rápido, barato e simples, para detectar o efeito biológico – dano ao DNA, no entanto ele não deve ser utilizado como biomarcador único na avaliação do risco para a saúde. Esta observação é sustentada pelo nosso conhecimento atual de que o teste do cometa é suscetível a fatores de confusão tais como sexo, idade, luz solar, exercício, infecções, poluição do ar e fatores dietéticos. Essas diferenças individuais não são avaliadas facilmente, pois é necessário estudos de grande porte e com populações que sejam praticamente “isentas” de exposição a agentes genotóxicos. O uso deste teste está sendo cada vez mais explorado em muitos laboratórios, são encontramos na literatura diferentes populações expostas ocupacionalmente à diversas substância químicas, sendo avaliadas pelo ensaio cometa. Entretanto, as experiências do teste cometa em estudos de biomonitoramento ainda são relativamente novas e são necessários estudos para se determinar o nível basal de danos no DNA e suas possíveis variações individuais, além da correlação com o surgimento de patologias a longo prazo em indivíduos e que apresentaram alterações no teste cometa (Moller et al., 2000).

Devido ao pequeno tamanho da amostra do estudo, uma investigação adicional envolvendo um grupo maior de indivíduos é necessária para se obter um espectro mais amplo dos efeitos da exposição ao benzeno e outros compostos orgânicos voláteis da gasolina. A possível influência fatores de confundimento sobre os resultados deve também ser mantido em mente. Pode-se concluir a partir deste estudo que a exposição ocupacional aos vapores da gasolina pode conduzir a um

risco ligeiramente aumentado de danos genéticos em trabalhadores deste ramo, e que os resultados para o teste cometa contribuem para a importância do biomonitoramento contínuo dos empregados em postos de gasolina, bem como de outros setores que tenham contato com combustíveis e derivados do petróleo, pois não há políticas de regulação e programas de vigilância epidemiológica (Machado et al., 2003).

É realmente necessário conhecer o impacto das substâncias genotóxicas sobre a saúde humana. Isso tem sido o objeto de inúmeros estudos que buscam caracterizar tais efeitos num estágio precoce com o objetivo de prevenir um dano definitivo ou irreversível. Entretanto, muitos estudos ainda não são suficientemente claros em relação ao efeito prejudicial que um dano ao DNA detectado no teste cometa pode revelar. Isso gera uma enorme dificuldade na interpretação dos resultados, principalmente devido ao desconhecimento de padrões de normalidade. Definir limites seguros de exposição e valores de referência para substâncias genotóxicas ainda não é possível, pois não se tem conhecimento toxicológico do efeito a longo prazo, além de que devemos levar em conta as diferenças intrínsecas da população. Ainda estamos no caminho que busca reunir o conhecimento, para uma futura decisão de que os biomarcadores de genotoxicidade possam fornecer uma avaliação de risco precoce e precisa.

## 8 CONCLUSÃO

A padronização e validação do teste cometa apresentaram os parâmetros de mérito adequados para o propósito de utilizá-lo como biomarcador, os danos provocados pela irradiação gama obedeceu a uma ordem linear e foi reprodutível.

O biomarcador de exposição de benzeno, o ácido trans-trans mucônico permitiu verificar que a população exposta estudada, estava em contato com a substância em questão e que existiam níveis aumentados para frentistas e analistas de combustível, caracterizando uma exposição ocupacional.

O teste cometa correlacionou de maneira positiva com os resultados do AttM, ou seja, quando houve uma excreção urinária maior do biomarcador, os danos ao DNA também eram maiores.

Ao correlacionar os resultados as diferentes variáveis (sexo e idade), a correlação positiva entre o teste cometa e AttM não foi mais observada, provavelmente devido aos fatores de confundimento de cada biomarcador ou pequeno número de indivíduos no estudo.

Os resultados encontrados nesse estudo permite confirmar e reconhecer que existe um risco ocupacional e genotóxico com relação a exposição ao benzeno, através da gasolina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIM (Associação Brasileira da Indústria Química). O Pacto Nacional da Indústria Química. São Paulo, 2010.

ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). Threshold limit values and biological exposure indices for 1999-2000. Cincinnati, 1999.

Amorim, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.

Anderson, D.; Yu T.W.; Mcgregor, D.B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**. v.13, n.6, p.539-555, 1998.

Andreoli, C.; Leopardi, P.; Crebelli, R. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. **Mutagenesis Research**. v. 377, n. 1-9, p. 95-104, 1997.

Angerer, J.; Ewers, U.; Wilhelm, M. Human biomonitoring: state of the art. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. v. 210, n. 3, p. 201-228, 2007.

ANP (Agência Nacional do Petróleo). Portaria nº 309, de 27 de dezembro de 2001. Disponível em <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder\\_portarias\\_anp](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_portarias_anp)>. Acesso em: 10 de maio 2012.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile For Benzene, 2007. Disponível em <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp3.pdf>> Acesso em: 05 de julho de 2012.

Azevedo, F.A.; Chasin, A.A.M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2004. 340 p.

Azqueta, A.; Gutzkow K.B; Brunborg, G.; Collins, A.R. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research**. v. 18,n. 724, p.41-45, 2011.

Azqueta, A.; Shaposhnikov, S.; Collins, A.R. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutagenesis Reserach**. v. 674, p.101 108, 2009.

Barbosa, E.M. **Exposição Ocupacional ao Benzeno: o ácido trans-trans mucônico como indicador biológico de exposição na indústria de refino de petróleo**. 1997. Dissertação (Mestrado) – CESTEHE, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 1997.

Bechtold, W.E.; Henderson, R.F. Biomarkers of Human Exposure to Benzene. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 40, n. 2, p. 377-386, 1993.

Belpaeme, K.; Cooreman, K.; Kirsch-Volders, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detection genomic damage in marine flat fish **Mutagenesis Reserach**. v.415, n.3. p.167-184, 1998.

Bocker, W.; Rolf, W.; Bauch, T.; Muller, W.U.; Streffer, C. Automated Comet Assay Analysis. **Cytometry**. v.35, n.2, p.134-144, 1999.

Bond, G.F., McLaren, E.A., Baldwin, C.L., Cook, R.R. An update of mortality among chemical workers exposed to benzene. **British Journal of Industrial Medicine**. v.43, p.685-691, 1986.

Boogaard, P.J.; Van Sittert, N.J. Biological Monitoring of Exposure to Benzene: a comparison between S-phenylmercapturic acid, trans,trans-muconic acid, and phenol. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 52, p. 611-616, 1995.

Brasil. Ministério da Saúde. Risco químico: atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno. Brasília, DF. MS, 2006.

Brasil. Ministério do Trabalho e Emprego. Secretaria de Segurança e Higiene e Medicina do Trabalho. Segurança e Medicina do Trabalho: Lei n. 6514, de 22 de dezembro de 1997, normas regulamentadoras (NR) aprovadas pela Portaria 3214, de 8 de junho de 1978. 43º ed. São Paulo: Atlas, 1999.

Brasil<sup>a</sup>. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria. Nº. 34, de 20 de dezembro de 2001.<Disponível em <http://www.trabalho.gov.br>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2012.

Brasil<sup>b</sup>. Ministério da Saúde. Doenças relacionadas ao trabalho: manual de procedimentos para os serviços de saúde. Brasília, 2001. 580p

Brianezi, G.; Camargo, J.L.V.; Miot, H.A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

Brilhante, O.M.; Caldas, L.Q.A. Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental. 1º ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1999. 155 p.

Castro, H.A.; Gouveia, N.; Escamilla-Cejudo, J.A. Questões metodológicas para a investigação dos efeitos da poluição do ar na saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v.6, n.2, p. 135-149, 2003.

Collins, A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. **Molecular Biotechnology**. v. 26, 2004.

Collins, A.R.; Dusinska, M.; Gedik, C.M.; Stetina, R. Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? **Environmental Health Perspectives**. v. 104, s. 3, p. 465–469, 1996.

Collins, A.R.; Oscoz, A.A.; Brunborg, G.; Gavião, I.; Giovannelli, L.; Kruzewski, M.; Smith, C.C.; Stetina, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**. v. 23, p.1-9, 2008.

Coronas, M.V.; Horn, R.C.; Ducatti, A.; Rocha, J.A.V.; Vargas, V.M.F. Mutagenic activity of airborne particulate matter in petrochemical industrial area. **Mutagenesis Reserach**. v. 650, p. 196–201, 2008.

Costa, D.F. **Prevenção da Exposição ao benzeno no Brasil**. 2009. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Costa, M.A.F; Costa, M.F.B. Benzeno: uma questão de saúde pública. **Interciencia**. v.27, n.4, p.201-204, 2002.

Costa, M.F.B. Estudo da Aplicabilidade do Ácido trans-trans mucônico Urinário como Indicador Biológico de Exposição ao Benzeno. 2001. 124p. Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.

Coutrim, M.X.; De 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, 2000.

Da Silva, J.; Heuser, V.; Andrade, V. Biomonitoramento Ambiental. In: Da Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J.A.P. **Genética Toxicológica**. v.1, p.167-178, 2003.

DeCaprio, A.P. Biomarkers: Coming of Age for Environmental Health and Risk assessment. **Environmental Science & Technology**. v. 31, n. 7, p. 1837–1848, 1997.

DeCaprio, A.P. The toxicology of hydroquinone - relevance to occupational and environmental exposure. **Critical Reviews in Toxicology**. v.29, n.3, p.283-330, 1999.

DEMEC (Departamento de Engenharia Mecânica – UFMG). Disponível em <<http://www.demec.ufmg.br/disciplinas/ema003/liquidos/gasolina/gasolina.htm#II>>. Acesso em: 26 maio 2012.

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft). "List of MAK and BAT Values, do, Report n° 32", página 156, item IX Carcinogenic Substances, 1996.

Ducos P, Gaudin R, Bel J, Marie C, Francin JM, Robert A et al. Trans, trans- muconic acid, a reliable biological indicator for the detection of individual benzene exposure down to the ppm level. **International Archives of Occupational and Environmental Health**. v. 64, p. 309-313, 1992.

Dusinska, M.; Collins, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene environment interactions. **Mutagenesis**. v. 23, p. 191-205, 2008.

Eastmond, D.A.; Mondrala, S.T.; Hasegawa, L. Topoisomerase II inhibition by myeloperoxidase-activated hydroquinone: A potential mechanism underlying the genotoxic and carcinogenic effects of benzene. **Chemico-Biological Interactions**. v. 153–154, p. 207-216, 2005.

Einig, T.; Dehnen, W. Sensitive Determination of the Benzene Metabolite S-Phenylmercapturic Acid in Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Journal of Chromatography A**. v. 697, p.371-375, 1995.

EPA (United States Environment Protection Agency). Overview: Pollutants and Programs - Mobile Source Air Toxics. Disponível em <<http://www.epa.gov/otaq/toxics.htm>> Acesso em: 21/05/2012.

Faust, F.; Kassie, F.; Knasmuller, S.; Kevekordes, S.; Merschundermann, V. Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies. **Toxicology**. v. 198, p. 41- 350, 2004.

Fenech, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**. v. 181-182, p. 411-416, 2002.

Fernandes, M.; Brickus, L. S. R.; Moreira, J. C.; Cardoso, J. N.; Atmospheric BTX and polyaromatic hydrocarbons in Rio de Janeiro, Brazil. **Chemosphere**. v. 47, p 417-425, 2002.

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.

Fundacentro (Fundação Jorde Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho). Acordo e Legislação sobre o Benzeno. São Paulo, 1996.

Fustinoni, S.; Buratti, M.; Giampiccolo, R.; Colombi, A. Biological and environmental monitoring of exposure to airborne benzene and other aromatic hydrocarbons in Milan traffic wardens. **Toxicology Letters**. v.77, p. 387-392, 1995.

Ghittori, S.; Fiorentino, M.; Maestri, L.; Gordioli, G.; Imbriani, M. Urinary Excretion of Unmetabolized Benzene as an Indicator of Benzene Exposure. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 38, p.233-243, 1993.

Gilli, G.; Scursatone, E.; Bono, R. Geographical distribution of benzene in air in northwestern Italy and personal exposure. **Environmental Health Perspectives**. v.104, p.1137-1140, 1996.

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. **Science of the Total Environment** . v. 199, p. 41-49, 1997.

Hartmann, A.; Agurell, E.; Beevers, C. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**. v.18, n.1, p.45-51, 2003.

Heddle, Ja. Implications for genetic toxicology of the chromosomal breakage syndromes. **Mutation Research**. v. 247, p. 221-229, 1991.

Hoet, P. 1996. General Principles. In: WHO (org.) Occupational Health for all: Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace: (p.1-19). Geneva: WHO.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. 1989.

Jo, W., Moon, K. Housewives exposure to volatile organic compounds relative to proximity to roadside service stations. **Atmospheric environment**. v.33, p. 2921-2928, 1999.

Keretetse, G.S.; Laubscher, P.J.; Du, P.J.L, et al. DNA Damage and Repair Detected by The Comet Assay in Lymphocytes of African Petrol Attendants: A Pilot Study. **Annals of Occupational Hygiene**. v.52, n.7, p.653-662, 2008.

Keshava, N.; Ong, T. Occupational exposure to genotoxic agents. **Mutation Research**. v.473, p. 175-194, 1999.

Kim, J.k.; Shin, H.S; Lee J.H; Lee J.J; Lee J.H. Genotoxic effects of volatile organic compounds in a chemical factory as evaluated by the Tradescantia micronucleus assay and by chemical analysis. **Mutation Research**. v. 541, p. 55-61, 2003.

Kohn, K.W.; Erickson, L.C.; Ewig, R.A.G.; Friedman, C.A. "Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution". **Biochemistry**. v. 15, p. 4629–4637, 1976.

Larsen, J.C.; Larsen, P.B. Chemical carcinogens. *Air Pollution and Health*. **The Royal Society of Chemistry**. p. 33-56, 1998.

Lauwerys, R.R.; Hoet, P. Industrial Chemical Exposure–Guidelines for Biological Monitoring. London, Lewis Publishers, 1993.

Leon-Mejía, G.; Espitia-Perez, L.; Hoyos-Giraldo, L.S. et al. Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. **Science of the Total Environment**, v.409, n.4, p.686-691, 2011.

Machado, J. M. H. Processo de vigilância em saúde do trabalhador. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 13, s. 2, p.33-46, 1997.



Machado, J.M.H.; Costa, D.F.; Cardoso, L.M.; Arcuri, A. Alternativas e processos de vigilância em saúde do trabalhador relacionados à exposição ao benzeno no Brasil. **Ciência Saúde Coletiva**. v. 8, p. 913-921. 2003.

Marcon, F.; Zijno, A.; Crebelli, R.; Carere, A.; Veidebaum, T.; Peltonen, K.; Parks, R.; Schuler, M.; Eastmond, D. Chromosome damage and aneuploidy detected by interphase multicolour FISH in benzene-exposed shale oil workers. **Mutation Research**. v. 445, p. 155-166, 1999.

Medinsky, M.A.; Kenyon, E.M.; Schlosser, P.M. Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. **Toxicology**. v.105, n.2-3, p.225-233, 1995.

Menezes, M.; Balbão, M.S.; Siqueira, E.P.B. Influência do hábito de fumar na excreção urinária do ácido trans, trans-mucônico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 3, 2008.

Mitchelmore, C.L.; Chipman, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**. v.399, n.2, p.135-147, 1998.

Mocsáry, E. N.; Tolvaj, K.; Juhász, M. Identification of compounds in gasoline range mixtures using combined group – Type and capillary GC separation. **Chromatography Research Supplies**. v.51, p. s-261 – s-266, 2000.

Moller, P. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 98, p. 336-345, 2006.

Moller, P.; Friis, G.; Christensen, P.H.; Risom, L.; Plesner, G.; Kjaersgaard, J.; Vinzents, P.; Loft, S.; Jensen, A.; Tved, M. Intra-laboratory Comet Assay Sample Scoring Exercise for Determination of Formamidopyrimidine DNA Glycosylase Sites in Human Mononuclear Blood Cell DNA. **Free Radical Research**. v. 38, n. 11, p. 1207–1214, 2004.

Moller, P.; Knudsen, L.E.; Loft, S.; Wallin, H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 9, n. 10, p. 1005-1015, 2000.

Negri, S.; Bono, R.; Maestri, L.; Ghittori, S.; Imbriani, M. High pressure chromatographic-mass spectrometric determination of sorbic acid in urine: verification of formation of trans, trans-muconic acid. **Chemico-Biological Interactions**. v.153-4, p.243-6, 2005.

Oga, S., Batistuzzo, J.A.O., Camargo, M.M.A. Fundamentos de Toxicologia - 3ª Ed, 696 p, 2008.

Ong, C.N.; Kok, P.W.; Ong, H.Y.; Shi, C.Y.; Lee, B.L.; Phoon, W.H.; Tan, K.T. Biomarkers of exposure to low concentrations of benzene: a field assessment. **Occupational and Environmental Medicine**. v.53, n.5, p.328-333, 1996.

Ostling O, Johanson KJ. Microeletrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.123, n.1, p.291-298, 1984.

Pagès, V.; Fuchs, R.P.P. How DNA lesions are turned into mutations within cells? **Oncogenesis**. v.16, n. 58, p. 8957-8966, 2002.

Pandey A.K.; Bajpayee, M.; Parmar, D. et al. Multipronged Evaluation of Genotoxicity in Indian Petrol-Pump Workers. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v.49, n.9, p.695-707, 2008.

Paula, F.C.S.; Silveira, J.N.; Junqueira, J.G.; Leite, E.M.A. Avaliação do ácido trans, trans-mucônico urinário como bioindicador de exposição ao benzeno. **Revista de Saúde Pública**. v.37, p.780-785, 2003.

Pavanello, S.; Clonfero, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. **Mutation Research**. v. 463, n. 3, p. 285-308, 2000.

Pitozzi, V.; Pallotta, S.; Balzi, M., Bucciolini, M.; Becciolini, A.; Dolara, P.; Giovannelli, L. Calibration of the comet assay for the measurement of DNA damage in mammalian cells. **Free Radical Research**. v. 40, n. 11, p. 1149-1154, 2006.

Pouget, J.P.; Ravanat, J.L.; Douki, T. Richard, M.J.; Cadet, J. Measurement of DNA base damage in cells exposed to low doses of g-radiation: comparison between HLPC-EC and comet assays. **International Journal of Radiation Biology**. v.75, p. 51-58, 1999.

Rekhadevi, P.V.; Rahman, M.F.; Mahboob, M.; Grover, P. Genotoxicity in filling station attendants exposed to petroleum hydrocarbons. **The Annals of Occupational Hygiene**. v. 54, n. 8, p. 944-54, 2010.

Rojas, E.; Lopez, M.C.; Valverde, M. Single cell eletrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**. v. 722, n. 1, p. 225-254, 1999.

Rydberg, B.; Johanson. K.B. Estimation of DNA strand breaks in sigle mammalian cells. In: Hanawalt, P.C.; Fridberg, E.C.; Fox, C.F. DNA Repair Mechanisms. New York: Academic Press, p. 465-468, 1978 apud Ostling O, Johanson KJ. Microeletrophoretic study of radiation included DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.123, n.1, p.291-298, 1984.

Salgado, P.E.T.; Pezzagno, G. Indicadores Biológicos da Exposição ao Benzeno. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**. v. 19, p.25-3, 1991.

SCCNFP - The Scientific Committee On Cosmetic Products And Non-Food Products Intended For Consumers. Proposal for recommended mutagenicity/genotoxicity tests for the safety testing of cosmetic ingredients to be included in the annexes to Council Directive 76/768/EEC. SCCNFP/0755/03, notas do guia, 9/12/2003, 12p.

Sheets, P.L.; Yost, G.L.; Carlson, G.P. Benzene metabolism in human lung cell lines BEAS-2B and A549 and cells overexpressing CYP2F1. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. v.18, n.2, p.92-99, 2004.

Silva, E.F. Gestão ambiental dos postos revendedores de combustíveis no Estado do Rio de Janeiro: uma avaliação crítica na visão ocupacional e ambiental da presença do benzeno na gasolina automotiva. Dissertação (Mestrado Profissional em Sistemas de Gestão. Área de Concentração: Gestão de Ambiental) – Universidade Federal Fluminense. 2004.

Silva, M.C.; Gaspar, J.; Silva, I. D.; Leão, D.; Rueff, J. Mechanisms of induction of chromosomal aberrations by hydroquinone in V79 cells. **Mutagenesis**, v.18, n.6, p.491-496, 2003.

Snyder, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. **Drug Metabolism Reviews**. v.36, n.3-4, p.531-547, 2004

Sul, D.; Lee, E.; Lee, M.Y.; Oh, E.; Im, H.; Lee, J.; Jung, W.W.; Won, N.; Kang, H.S.; Kim, E.M; Kang, S.K. DNA damage in lymphocytes of benzene exposed workers correlates with trans,trans-muconic acids and breath benzene levels. **Mutation Research**. v. 582, p.61-70, 2005.

Tambellini, A.T. et al. Subsídios ao plano diretor de saúde e ambiente no âmbito do Sistema Único de Saúde - Contributions to the environment health plan in the scope of the Brazilian health system. **Cadernos de Saúde coletiva**. v.13, n.1, p.294-316, 2005.

Tarantini A, Maître A, Lefebvre E, Marques M, Marie C, Ravanat JL, Douki T. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. **Mutation Research**. v.671, n.1, p.67-75, 2009.

Tiburtius, E. R. L.; Peralta-Zamora, P.; Leal, E. S. Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites. **Química Nova**. v . 27, n.3, 2000.

Tice, R. R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C.; Sasaki, Y.F. Single Cell Gel / Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

Valverde, M.; Rojas, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutation Research**. v. 681, n. 1, p.93-109, 2009.

Wakamatsu, C.L.; Fernicola, N.A.G.G. Intoxicação profissional por benzeno. In: **Medicina do Trabalho/Doenças Ocupacionais** (R. Mendes. Org), p. 479-486, São Paulo: Sarvier, 1980.

Wallace, L.A. Environmental exposure to benzene: a update. **Environmental Health Perspectives**. v. 104, p. 1129-1136, 1996.

WHO – World Health Organization. Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva, 1993.

WHO (World Health Organization). Occupational Health For All Biological Monitoring Of Chemical Exposure In the Workplace. Volume 2. Geneva. 1996.

Whysner, J.; Reddy, M.; V.; Ross, P.M.; Mohan, M.; Lax, E.A. Genotoxicity of benzene and its metabolites. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. v. 566, p. 99-130, 2004.

Yoonho, C.; Dongchun, S.; Seongeun, P.; Yong, C.; Myungsoo, K. Biological Monitoring of Benzene in Residents Living near Petrochemical Industrial Areas in Korea. **The Journal of Occupational Health**. v. 42, p.31-37, 2000.

## APÊNDICE A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Para o grupo 1 – Trabalhadores de postos de combustível

PROJETO DE PESQUISA: "AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO BENZENO EM TRABALHADORES NOS POSTOS DE REVENDA DE COMBUSTÍVEIS ATRAVÉS DE BIOMARCADOR DE GENOTOXICIDADE: TESTE COMETA"

Prezada Sr(a),

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa que tem por objetivo analisar o uso do teste cometa como potencial biomarcador de genotoxicidade em indivíduos expostos ao benzeno, para oferecer suporte nas ações de vigilância e na adoção de medidas de controle do risco em postos de gasolina, visando a proteção e prevenção da saúde do trabalhador.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 9mL do seu sangue e 60ml de urina para realização dos exames e armazenamento em um banco de amostras biológicas para estudos genéticos futuros. Esclarecemos que este banco de amostras está aprovado e registrado no Comitê de Ética/UFMG sob o nº ETIC 0216/06.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum comprometimento ao seu atendimento e tratamento.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Responsáveis:

Ana Paula Salles Moura Fernandes Tel: 3409-6884

Leiliane Coelho André Amorim Tel: 3409-6889

Maria Augusta Amaral Campos Tel: 8686-8661

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. Sala 2005 – 2º andar. CEP: 31270-901. Telefone: 3409-4592.

NOME: \_\_\_\_\_

Carteira de identidade: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Responsável

Agradecemos sua valiosa participação!

## APÊNDICE B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Para o grupo 2 – Pessoas não expostas ocupacionalmente ao benzeno

PROJETO DE PESQUISA: "AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO BENZENO EM TRABALHADORES NOS POSTOS DE REVENDA DE COMBUSTÍVEIS ATRAVÉS DE BIOMARCADOR DE GENOTOXICIDADE: TESTE COMETA"

Prezada Sr(a),

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa que tem por objetivo analisar o uso do teste cometa como potencial biomarcador de genotoxicidade em indivíduos expostos ao benzeno, para oferecer suporte nas ações de vigilância e na adoção de medidas de controle do risco em postos de gasolina, visando a proteção e prevenção da saúde do trabalhador.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 9mL do seu sangue e 60ml de urina para realização dos exames e armazenamento em um banco de amostras biológicas para estudos genéticos futuros. Esclarecemos que este banco de amostras está aprovado e registrado no Comitê de Ética/UFMG sob o nº ETIC 0216/06.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum comprometimento ao seu atendimento e tratamento.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Responsáveis:

Ana Paula Salles Moura Fernandes Tel: 3409-6884  
Leiliane Coelho André Amorim Tel: 3409-6889  
Maria Augusta Amaral Campos Tel: 8686-8661

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. Sala 2005 – 2º andar. CEP: 31270-901. Telefone: 3409-4592.

NOME: \_\_\_\_\_

Carteira de identidade: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Agradecemos sua valiosa participação!

## APÊNDICE C

### SOLICITAÇÃO DE EXAMES E PROTOCOLO TOXICOLÓGICO Faculdade de Farmácia - Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

#### INFORMAÇÕES PESSOAIS:

Nome: \_\_\_\_\_.

Idade: \_\_\_\_\_ anos.

Sexo:  Feminino  Masculino.

#### DADOS SOBRE A AMOSTRAGEM:

Número da amostra: \_\_\_\_\_, Data da coleta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Hora da coleta: \_\_\_\_:\_\_\_\_.

#### EXAMES SOLICITADOS:

ATTM-u                       Teste cometa

#### DADOS CLÍNICOS:

Você Fuma?	<input type="checkbox"/> Não sou fumante <input type="checkbox"/> Um a cinco cigarros por dia <input type="checkbox"/> Seis a dez cigarros por dia <input type="checkbox"/> Onze a vinte cigarros por dia <input type="checkbox"/> Mais de vinte cigarros por dia	Há quanto tempo?	<input type="checkbox"/> Um mês <input type="checkbox"/> Dois meses <input type="checkbox"/> Um ano <input type="checkbox"/> Dois anos <input type="checkbox"/> Mais de dois anos
------------	---	------------------	---

Você faz uso de bebidas alcoólicas?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Com que frequência?	<input type="checkbox"/> Esporadicamente <input type="checkbox"/> Uma vez por semana <input type="checkbox"/> Duas vezes por semana <input type="checkbox"/> Três vezes por semana <input type="checkbox"/> Cinco vezes por semana <input type="checkbox"/> Diariamente
-------------------------------------	--	---------------------	--

Você costuma beber refrigerantes?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Com que frequência?	<input type="checkbox"/> Esporadicamente <input type="checkbox"/> Uma vez por semana <input type="checkbox"/> Duas vezes por semana <input type="checkbox"/> Três vezes por semana <input type="checkbox"/> Cinco vezes por semana <input type="checkbox"/> Diariamente
-----------------------------------	--	---------------------	--

Na sua alimentação, você faz uso de:	<input type="checkbox"/> Ameixas <input type="checkbox"/> Pêssegos <input type="checkbox"/> Ketchup <input type="checkbox"/> Refrigerante <input type="checkbox"/> Mostarda <input type="checkbox"/> Alimentos em conserva
--------------------------------------	---

Você faz uso diário de café?  Sim  Não

## APÊNDICE C

Você faz uso de algum medicamento? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual(is):

---

---

Você tem algum problema renal, hepático, pulmonar ou hematológico (anemia, por exemplo)?

( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual(is):

---

---

Existe alguma indústria perto de sua casa? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual(is):

---

---

### INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO:

Qual a atividade executada?

---

---

Jornada de trabalho de: \_\_\_\_\_ horas por semana. Quanto tempo?

---

---

Já trabalhou com outra atividade? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual(is)?

---

---