

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE  
INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO  
TOLUENO E O ESTRESSE OXIDATIVO EM  
EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE A TINTAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Angela Maria Moro**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2010**

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE  
INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO  
TOLUENO E O ESTRESSE OXIDATIVO EM EXPOSTOS  
OCUPACIONALMENTE A TINTAS**

por

**Angela Maria Moro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

**Orientador (a): Profa. Dra. Solange Cristina Garcia**

**2010  
Santa Maria, RS, Brasil**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE INDICADORES  
BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO TOLUENO E O ESTRESSE  
OXIDATIVO EM EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE A TINTAS**

elaborada por  
**Angela Maria Moro**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Solange Cristina Garcia, Dra.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Andréia Buffon, Dra.**  
(UFRGS)

---

**Tatiana Emanuelli, Dra.**  
(UFSM)

Santa Maria, 19 de março de 2010.

*Dedico este trabalho aos meus amados pais Leuzir e Marinêz,  
que são o meu porto seguro e refúgio constante;  
meu exemplo maior de amor, dedicação e persistência;  
meu orgulho, meu amor incondicional.  
Agradeço por estarem sempre ao meu lado, incentivando e  
apoíando; agradeço por todo amor e dedicação;  
por confiarem em mim.  
Vocês são o maior de todos os presentes que a vida me deu!*

*Dedico também, à minha irmã Bianca,  
por tornar os meus dias muito mais felizes  
com a sua doce presença!  
Obrigada por todo carinho!*

*Amo muito vocês!*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À professora **Dr<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia**, exemplo de dedicação e determinação profissional. Agradeço por todas as oportunidades concedidas, e por todos os ensinamentos transmitidos; por todos os anos de convívio e pela amizade cativada ao longo desses anos. Agradeço pela orientação deste trabalho e auxílio constante no meu aperfeiçoamento científico. Muito obrigada por tudo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida; por SUA presença e amor constante nos meus dias; pela saúde e pelas oportunidades que tem colocado em meu caminho e, por permitir que eu tenha pessoas maravilhosas em minha companhia.

A toda minha família: pais, irmã, avó, primas, primos, tios, tias. Muito obrigada pelo apoio e carinho. Por me mostrarem que a distância só consolida os verdadeiros laços de amor, e que a família é a base para lutarmos pelos nossos sonhos. Obrigada por tudo. Amo todos vocês.

À minha grande amiga e “prima” Michele, pela companhia insubstituível e por sua presença nos momentos de alegrias e angústias. Por ser a minha família e meu porto seguro em Santa Maria; e por ter sempre uma palavra de motivação e carinho para com todos. Obrigada por tudo prima.

A todos os meus amigos e irmãos de coração, por povoarem a minha existência de tanta alegria. Obrigada por todos os momentos passados juntos, por todas as palavras de carinho, por todas as conversas, alegrias e sorrisos. Obrigada por todo auxílio e companhia durante essa jornada. Obrigada por me fazerem compreender o que “amigos vão e vem, mas nunca abra mão de uns poucos e bons”.

A todos os meus colegas e amigos do LATOX, minha segunda família. Obrigada aos colegas “latoxianos” que passaram e/ou ficaram em Santa Maria, e que fizeram com a pesquisa sempre tivesse um sentido a mais em suas companhias. Obrigada também aos que permaneceram e aos novos integrantes do LATOX, por todo o suporte técnico na realização do projeto de mestrado, por toda disposição durante as coletas e análises, mesmo quando o tempo parecia ser insuficiente. Sem vocês não seria possível. Agradeço também aos colegas que se tornaram amigos, durante toda essa jornada, e que demonstram a cada dia o valor e a importância da amizade. Obrigada por tudo.

Aos Professores Andréia Buffon, Carin Von Mühlen, Flávia Thiessen, Rafael Linden, Rafael Moresco, Miriam Salvador, Tatiana Emanuelli; à Psicóloga Faltemara Forsin Tessele; à Farmacêutica Carina Cassini; à Estatística Vânia Hirakata, por todo auxílio e apoio tecnológico durante toda esta pesquisa.

À Empresa METASA/SA Indústria Metalúrgica, em especial à Técnica de Enfermagem Terezinha Pedrolo, pela receptividade, atenção dispensada e colaboração com este trabalho.

Aos voluntários que participaram deste estudo, pela colaboração e disposição.

Aos professores Andréia Buffon, Tatiana Emanuelli, Rafael Moresco, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

À UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (professores e funcionários) pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao CNPq pelo fomento através da concessão da bolsa.

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

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO TOLUENO E O ESTRESSE OXIDATIVO EM EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE A TINTAS**

AUTORA: ANGELA MARIA MORO

ORIENTADOR (A): SOLANGE CRISTINA GARCIA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de março de 2010.

A exposição ocupacional a tintas representa um importante problema de saúde devido à ampla variedade de substâncias químicas e xenobióticos presentes na sua constituição. Solventes orgânicos e metais pesados encontram-se entre os principais compostos químicos constituintes das tintas. Tendo em vista a variedade de substâncias presentes na composição das tintas, pode-se constatar que pintores encontram-se simultaneamente expostos a diferentes xenobióticos, caracterizando um processo de co-exposição ou exposição mista. A monitorização biológica é uma ferramenta essencial para a avaliação do risco à saúde e práticas de saúde ocupacional. Por outro lado, sabe-se que existe uma estreita relação entre os xenobióticos constituintes de tintas e o estresse oxidativo, como mecanismo toxicológico. Neste estudo foi avaliado o dano oxidativo, através da quantificação de biomarcadores sanguíneos do estresse oxidativo, como malondialdeído (MDA), glutatona reduzida (GSH), enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT); em indivíduos expostos (n=48) e não expostos (n=30) ocupacionalmente a tintas. A monitorização biológica do tolueno foi realizada através da quantificação dos diferentes biomarcadores de exposição, ácido hipúrico e *orto*-cresol urinários, e tolueno sanguíneo. Para xileno, estireno, etilbenzeno e chumbo foram quantificados os níveis urinários dos ácidos metil-hipúrico, mandélico, fenilgloxílico, e chumbo sanguíneo, respectivamente. Apesar de todos os IBEs se encontrarem abaixo dos índices biológicos máximos permitidos (IBMP), alterações significativas nos biomarcadores do estresse oxidativo foram encontradas no grupo de expostos. Os níveis plasmáticos de MDA e das enzimas sanguíneas antioxidantes (SOD e CAT) se mostraram aumentados no grupo de pintores quando comparados com o grupo não exposto; esse aumento foi acompanhado pela depleção nos níveis de GSH e inibição da enzima ALA-D. Foram observadas ainda várias correlações entre os biomarcadores do estresse oxidativo e biomarcadores de exposição aos xenobióticos presentes nas tintas. Através de testes estatísticos foram avaliados quais dos constituintes das tintas desempenhavam maior influência sobre as alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo, nesse caso de co-exposição. Dentre os biomarcadores de exposição analisados, o tolueno sanguíneo foi sugerido como o principal responsável pelo aumento da peroxidação lipídica; além de ser apontado como um novo e importante inibidor da enzima ALA-D. Dessa forma, sugere-se que a avaliação conjunta de biomarcadores de exposição e biomarcadores do estresse oxidativo possa ser útil para assegurar, em longo, prazo a saúde do trabalhador.

**Palavras-chave:** tintas; co-exposição; xenobióticos; exposição ocupacional; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Master dissertation  
Post Graduate Course on Pharmacology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE LEVELS OF BIOLOGICAL EXPOSURE INDICES AND OXIDATIVE STRESS IN OCCUPATIONALLY EXPOSED TO PAINTS

AUTHOR: ANGELA MARIA MORO

ADVISER: SOLANGE CRISTINA GARCIA

Date and place of the defense: Santa Maria, march 19, 2010.

Paints occupational exposure is an important health problem due to the wide variety of chemicals and xenobiotics present in their constitution. Organic solvents and heavy metals are among the main chemical constituents of paints. In the view of the variety of substances found in paints, can be noted that painters are simultaneously exposed to various xenobiotics, suggesting a case of co-exposure or exposure mixed. Biological monitoring is an essential tool for assessing the risk to health and occupational health practices. Moreover, it is known that there is a close relationship between the xenobiotics constituents of paints and oxidative stress, such as toxicological mechanism. In this study was evaluated oxidative damage by quantification of blood biomarkers of oxidative stress such as malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH),  $\delta$ -aminolevulinatase enzyme (ALA-D), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), in individuals occupationally exposed to paints (n = 48) and non-exposed subjects (n = 30). Biological monitoring of toluene was performed by quantification of different biomarkers of exposure, urinary hippuric acid and ortho-cresol, and blood toluene. For xylene, styrene, ethylbenzene and lead were quantified urinary levels of methylhippuric acid, mandelic acid, phenylglyoxylic acid and blood lead, respectively. Despite all IBEs were below the biological limit exposure (BEL), significant changes in oxidative stress biomarkers were found in exposed group. Plasma levels of MDA and blood antioxidant enzymes (SOD and CAT) had shown increased in the group of painters when compared with non-exposed group; this increase was accompanied by GSH levels depletion and enzyme ALA-D inhibition. It was also observed several correlations between the oxidative stress biomarkers and biomarkers of exposure to xenobiotics present in paints. By statistical tests were evaluated which of the paints constituents played the greatest influence on changes in oxidative stress biomarkers, in this case of co-exposure. Among the exposure biomarkers tested, blood toluene was suggested as the main responsible for increased lipid peroxidation; in addition, it was appointed as a new and important inhibitor of the enzyme ALA-D. Thus, it is suggested that a joint evaluation of biomarkers of exposure and oxidative stress biomarkers might be useful to ensure, in long-term, the worker's health.

**Key-words:** paints; co-exposure; xenobiotics; occupational exposure; oxidative stress.

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| <b>TABLE 1</b> | - Temperature program of graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) for lead quantification.....  | 91 |
| <b>TABLE 2</b> | - Characteristics of studied population.....   | 92 |
| <b>TABLE 3</b> | - Biomarkers of exposure of organic solvents found in the urine of the studied population.....   | 93 |
| <b>TABLE 4</b> | - <i>Pearson's</i> correlation coefficients between biomarker of oxidative damage and antioxidants versus MDA in the studied population (n=78).....  | 94 |
| <b>TABLE 5</b> | - <i>Pearson's</i> correlation coefficients between MDA and exposure biomarkers; <i>Pearson's</i> correlation coefficients between ALA-D enzyme and biomarkers of exposure in the studied population (n=78)..... | 94 |
| <b>TABLE 6</b> | - <i>Pearson's</i> correlation coefficients and standardized coefficient beta between antioxidant GSH and biomarkers of exposure of constituents of paints (n=78).....   | 95 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### DISSERTAÇÃO

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>FIGURA 1</b>  | - Subdivisão dos biomarcadores de exposição na avaliação do risco (Adaptado de MANINI et al., 2007).....   | 25 |
| <b>FIGURA 2</b>  | - Estrutura química do tolueno.....  | 31 |
| <b>FIGURA 3</b>  | - Principais vias de biotransformação do tolueno no organismo (Adaptado de PIERCE et al., 2002).....   | 33 |
| <b>FIGURA 4</b>  | - Estruturas químicas dos isômeros do xileno.....  | 37 |
| <b>FIGURA 5</b>  | - Esquema de biotransformação do <i>para</i> -xileno (Adaptado de OGA,2008).....   | 38 |
| <b>FIGURA 6</b>  | - Estrutura química do estireno.....   | 40 |
| <b>FIGURA 7</b>  | - Biotransformação do estireno (Adaptado OGA, 2008).....   | 42 |
| <b>FIGURA 8</b>  | - Estrutura química do etilbenzeno.....  | 44 |
| <b>FIGURA 9</b>  | - Etapas do processo de peroxidação lipídica.....  | 50 |
| <b>FIGURA 10</b> | - Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima $\delta$ -aminolevulinato desidratase, formando o porfobilinogênio (PBG).....  | 53 |
| <b>FIGURA 11</b> | - Sistema antioxidante enzimático (Adaptado de SIES et al., 1972).....   | 55 |
| <b>FIGURA 12</b> | - Interconversão da glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) (Adaptado ROVER JR et al., 2001)..... | 57 |

## MANUSCRITO

- FIGURE 1** - GSH levels ( $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) and ALA-D activity ( $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ ) from non-exposed group (n=30) and exposed group (n=48). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, being \*p<0.001..... 97
- FIGURE 2** - Correlation between lipid peroxidation biomarker (MDA) vs. blood toluene levels (r= 0.682; p= 0.000; n=78)..... 98
- FIGURE 3** - Correlation between  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase enzyme vs. blood toluene levels (r= -0.582; p= 0.000; n=78)..... 99
- FIGURE 4** - Correlation between catalase activity (CAT) and blood toluene levels (r= 0.270; p= 0.019; n=78)..... 100

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |  |
|--------|--|
| 4-HNE  | - 4-Hidroxinonenal   |
| ABHO   | - Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais  |
| ACGIH  | - American Conference of Governmental Industrial Hygienists /<br>Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais |
| ALA    | - Ácido $\delta$ -Aminolevulínico  |
| ALA-D  | - $\delta$ -Aminolevulinato Desidratase  |
| ATP    | - Adenosina Trifosfato   |
| ATSDR  | - Agency for Toxic Substances and Disease Registry   |
| BEI    | - Índice Biológico de Exposição / Biological Exposure Index  |
| BEL    | - Limite Biológico de Exposição / Biological Exposure Limit  |
| BM     | - Biological Monitoring / Biomonitoring  |
| CAT    | - Catalase   |
| CYP450 | - Citocromo P-450  |
| DFG    | - Deutsche Forschungsgemeinschaft / Fundação de Pesquisa Alemã   |
| DNA    | - Ácido Desoxirribonucléico  |
| DTNB   | - 5,5'-Dithio-Bis(2- Nitrobenzoic acid)  |
| DTT    | - Dithiothreitol   |
| EDTA   | - Ethylene Diamine Tetracetic Acid   |
| ERNS   | - Espécies Reativas de Nitrogênio  |
| EROS   | - Espécies Reativas de Oxigênio  |
| EUA    | - Estados Unidos da América  |
| FID    | - Flame Ionization Ddetector   |
| GFAAS  | - Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry  |
| GPx    | - Glutational Peroxidase   |
| GR     | - Glutational Redutase   |

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| GSH              | - | Glutathiona Reduzida                             |
| GSSG             | - | Glutathiona Oxidada                              |
| GST              | - | Glutathiona Transferase                          |
| HA               | - | Hippuric Acid                                    |
| Hb               | - | Hemoglobina                                      |
| HPLC             | - | High Performance Liquid Chromatography           |
| IARC             | - | International Agency for Research on Cancer      |
| IBE              | - | Indicador Biológico de Exposição                 |
| IBMP             | - | Índice biológico Máximo Permitido                |
| IMAO             | - | Inibidores da Monoamina Oxidase                  |
| IPCS             | - | International Programme on Chemical Safety       |
| IS               | - | Internal Standard                                |
| MA               | - | Mandelic Acid                                    |
| MDA              | - | Malondialdeído                                   |
| mHA              | - | Methylhippuric Acid                              |
| NADPH            | - | Nicotinamida Adenina Dinucleotídio               |
| NR-7             | - | Norma Regulamentadora nº7                        |
| NRC              | - | National Research Council                        |
| NTP              | - | National Toxicology Program                      |
| <i>o</i> -C      | - | <i>Ortho</i> -cresol                             |
| <i>o</i> -cresol | - | <i>Orto</i> -cresol                              |
| PBG              | - | Porfobilinogênio                                 |
| PCMSO            | - | Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional |
| PGA              | - | Phenylglyoxylic Acid                             |
| PSSG             | - | Glutathiona ligada a proteínas                   |
| <i>p</i> -xileno | - | <i>Para</i> -xileno                              |
| RBC              | - | Red Blood Cells                                  |
| RLs              | - | Radicais Livres                                  |
| ROS              | - | Reactive Oxygen Species                          |
| SEM              | - | Standard Error Medium                            |
| -SH              | - | Grupamentos sulfidrílicos                        |
| SOD              | - | Superóxido Dismutase                             |
| SNC              | - | Sistema Nervoso Central                          |
| SPME             | - | Solid-Phase Microextraction                      |

- t <sub>½</sub> - Tempo de meia vida
- TBA - Thiobarbituric Acid
- TLVs - Threshold Limit Values / Limites de tolerância
- VR - Valor de Referência
- WHO - World Health Organization

## LISTA DE ANEXOS

|                |  |     |
|----------------|--|-----|
| <b>ANEXO A</b> | - Comprovante de submissão do manuscrito “ <b>Effects of low levels exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers</b> ” à Revista <i>Science of the Total Environment</i> ..... | 125 |
| <b>ANEXO B</b> | - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....  | 126 |

## SUMÁRIO

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                     | <b>20</b> |
| <b>2</b>   | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>          | <b>22</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Toxicologia ocupacional.....</b>        | <b>22</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Monitorização biológica.....</b>        | <b>23</b> |
| 2.2.1      | Biomarcadores.....                         | 24        |
| 2.2.2      | Limites biológicos de exposição.....       | 27        |
| <b>2.3</b> | <b>Exposição ocupacional a tintas.....</b> | <b>28</b> |
| 2.3.1      | Solventes orgânicos.....                   | 29        |
| 2.3.1.1    | Tolueno.....                               | 30        |
| 2.3.1.1.1  | Toxicocinética.....                        | 31        |
| 2.3.1.1.2  | Toxicodinâmica e sinais clínicos.....      | 33        |
| 2.3.1.1.3  | Monitorização biológica.....               | 34        |
| 2.3.1.2    | Xileno.....                                | 36        |
| 2.3.1.2.1  | Toxicocinética.....                        | 37        |
| 2.3.1.2.2  | Toxicodinâmica e sinais clínicos.....      | 38        |
| 2.3.1.2.3  | Monitorização biológica.....               | 39        |
| 2.3.1.3    | Estireno.....                              | 39        |
| 2.3.1.3.1  | Toxicocinética.....                        | 40        |
| 2.3.1.3.2  | Toxicodinâmica e sinais clínicos.....      | 42        |
| 2.3.1.3.3  | Monitorização biológica.....               | 43        |
| 2.3.1.4    | Etilbenzeno.....                           | 43        |
| 2.3.1.4.1  | Toxicocinética.....                        | 44        |
| 2.3.1.4.2  | Toxicodinâmica e sinais clínicos.....      | 44        |
| 2.3.1.4.3  | Monitorização biológica.....               | 45        |
| 2.3.2      | Metais Pesados.....                        | 45        |
| 2.3.2.1    | Chumbo.....                                | 46        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 2.3.2.1.1  | Toxicocinética.....   | 46         |
| 2.3.2.1.2  | Toxicodinâmica e sinais clínicos.....   | 47         |
| 2.3.2.1.3  | Monitorização biológica.....  | 48         |
| <b>2.4</b> | <b>Estresse oxidativo e biomarcadores do estresse oxidativo.....</b>              | <b>48</b>  |
| 2.4.1      | Estresse oxidativo.....   | 48         |
| 2.4.2      | Agentes oxidantes.....  | 49         |
| 2.4.3      | Peroxidação lipídica.....   | 50         |
| 2.4.4      | Oxidação de proteínas.....  | 51         |
| 2.4.4.1    | Inibição da $\delta$ -aminolevulinato desidratase.....                            | 52         |
| 2.4.5      | Antioxidantes.....  | 53         |
| 2.4.5.1    | Sistema enzimático.....   | 54         |
| 2.4.5.2    | Sistema não-enzimático.....   | 56         |
| <b>2.5</b> | <b>Relação entre a exposição ocupacional a tintas e o estresse oxidativo.....</b> | <b>57</b>  |
| <b>3</b>   | <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>61</b>  |
| <b>3.1</b> | <b>Manuscrito.....</b>  | <b>62</b>  |
|            | Abstract.....   | 64         |
|            | Introduction.....   | 65         |
|            | Materials and methods.....  | 67         |
|            | Results.....  | 72         |
|            | Discussion.....   | 75         |
|            | Conclusions.....  | 82         |
|            | References.....   | 83         |
| <b>4</b>   | <b>DISCUSSÃO.....</b>   | <b>101</b> |
| <b>5</b>   | <b>CONCLUSÕES.....</b>  | <b>106</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>107</b> |
|            | <b>ANEXOS.....</b>  | <b>124</b> |
|            | <b>Anexo A.....</b>   | <b>125</b> |
|            | <b>Anexo B.....</b>   | <b>126</b> |

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação de mestrado são apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item RESULTADOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados ao manuscrito deste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são relacionadas às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

# 1 INTRODUÇÃO

A toxicologia ocupacional, através da monitorização biológica busca prevenir prejuízos, em longo prazo, à saúde dos trabalhadores expostos a agentes químicos (LAUWERYS, 1996). Além disso, procura entender as relações causais entre exposição e efeito para que possa de alguma forma, atuar nas etapas iniciais do processo, quando os danos orgânicos ainda são reversíveis (OGA, 2008).

No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7) de 29 de dezembro de 1994 da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho, estabeleceu os parâmetros biológicos para controle da exposição a agentes químicos, definidos como indicadores biológicos de exposição (IBE) e atualmente denominados biomarcadores de exposição. Conforme esta Portaria, todas as instituições que admitam trabalhadores como empregados são obrigadas a elaborar e implementar o Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), que tem por objetivo promover e preservar a saúde dos trabalhadores (BRASIL, 1994).

A exposição ocupacional a tintas representa um importante problema de saúde devido à ampla variedade de substâncias químicas e xenobióticos presentes na sua constituição. Pintores representam um importante grupo de risco dentro da população ocupacionalmente exposta, uma vez que se encontram simultaneamente expostos a uma mistura de solventes orgânicos e outros componentes voláteis das tintas, (IARC, 1989; BRAUTBAR & WILLIAMS, 2002), caracterizando um processo de co-exposição ou exposição mista.

O tolueno destaca-se dentre os solventes orgânicos presentes na formulação das tintas (WHO, 1996; PIERCE et al., 1998; SAMOTO et al., 2006), entretanto, outros solventes orgânicos, bem como alguns metais pesados também podem ser encontrados na sua constituição (IARC, 1989).

A presença desses agentes tóxicos no ambiente de trabalho vem sendo cada vez mais preocupante, representando significativo risco à saúde do trabalhador. Doenças podem ser desencadeadas ou agravadas pela contaminação ocupacional resultante da exposição a esses xenobióticos, que podem provocar intoxicações exógenas, agudas e/ou crônicas, e desenvolver sintomas e sinais que contribuem

em médio e longo prazo para a queda na qualidade de vida dos indivíduos expostos (SCHENCK et al., 2008).

As atividades ocupacionais associadas à pintura e fabricação de tintas encontram-se largamente ligadas ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer; além disso, efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central, fígado, rim e órgãos hematopoiéticos também têm sido associados ao contato ocupacional a tintas (IARC, 1989).

Além disso, sabe-se que exposições ocupacionais a tintas também têm sido associadas ao estresse oxidativo, processo desencadeado pelo desequilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes do organismo, podendo estar relacionado a inúmeras patologias crônicas (KLAASSEN et al., 2001; OGA, 2008). Alguns constituintes das tintas vêm sendo apontados como causadores de injúria tecidual em diferentes órgãos devido ao aumento da produção de radicais livres e/ou espécies reativas (GROMADZINSKA & WASOWICZ, 2003; COSTA et al., 2005; PRASANTHI et al., 2009). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo algumas degenerativas, além de cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (AMES et al., 1993; SIES & STAHL, 1995).

Sendo assim, casos de co-exposição podem resultar em danos permanentes ou muitas vezes fatais. Dessa forma, estudos abordando a exposição ocupacional a tintas, co-exposição e os biomarcadores do estresse oxidativo são relevantes para avaliar mecanismos envolvidos no desenvolvimento de processos patológicos e, com isso, possibilitar a tomada de medidas preventivas aos danos à saúde dos trabalhadores, uma vez que existem poucos estudos na literatura relacionando casos de co-exposição aos xenobióticos presentes em tintas e avaliação de biomarcadores do estresse oxidativo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Toxicologia ocupacional

A toxicologia ocupacional avalia níveis de xenobióticos, substâncias químicas estranhas ao organismo, presentes no ambiente de trabalho e seus reflexos sobre a saúde do trabalhador, com o objetivo principal de prevenir, em longo prazo, o desenvolvimento de patologias humanas crônicas decorrentes da exposição ocupacional. Além disso, busca entender as relações causais entre a exposição e o efeito para que se possa atuar nas etapas iniciais do processo, quando os danos orgânicos ainda são reversíveis (LAUWERYS, 1996; OGA, 2008).

Inúmeros são os agentes químicos, potencialmente tóxicos, aos quais a população encontra-se exposta diariamente (AMORIM, 2003). A exposição ocupacional é decorrente da atividade profissional, em que o trabalhador encontra-se em contato com agentes químicos de tal forma que estes possam produzir efeitos sistêmicos negativos à sua saúde (OGA, 2008; SCHENCK et al., 2008). Tendo em vista que as pessoas passam mais de  $\frac{1}{4}$  de suas vidas no ambiente de trabalho (FRITSCHI et al., 2009), a exposição ocupacional a xenobióticos torna-se, cada vez mais, um relevante problema de saúde pública (NEVES, 1999).

A absorção de agentes tóxicos pelo organismo depende principalmente de suas propriedades físico-químicas (MANAHAN, 1992). Exposições ocupacionais e ambientais ocorrem predominantemente pela via respiratória (LITOVITZ et al., 1993), mas também podem ser decorrentes da absorção cutânea e digestiva (CÂMARA & GALVÃO, 1995). Vários fatores podem influenciar a real dose de substâncias absorvidas da atmosfera, incluindo a carga de trabalho físico, o manuseio das substâncias, o uso ou não de dispositivos de proteção, as condições ambientais e de trabalho, bem como as diferenças individuais de cada metabolismo exposto (MANINI et al., 2007). Tais variáveis devem ser adequadamente estudadas e registradas, afim de que possam ser avaliadas dentro de conceitos de monitorização (OGA, 2008).

## 2.2 Monitorização biológica

A avaliação da exposição, associada aos conhecimentos relativos dos efeitos na saúde e os limites considerados seguros, permitem estabelecer as prioridades e as formas efetivas de intervenção para proteger uma população dos riscos químicos. O estudo dos efeitos das substâncias químicas sobre a saúde possibilita avaliar o risco da população exposta, além de contribuir para o estabelecimento de normas ambientais para contaminantes químicos presentes no meio (AMORIM, 2003).

Segundo Manno et al. (2009), a monitorização biológica é definida como um controle repetitivo na quantificação de determinado produto químico e/ou de seus metabólitos em diferentes fluidos biológicos (urina, sangue), ar exalado ou tecidos de indivíduos expostos à agentes de risco químico, físico ou biológico, que encontram-se presentes no ambiente de trabalho e/ou no ambiente em geral.

A monitorização biológica visa à detecção precoce e preferencialmente reversível de sinais biológicos (biomarcadores), que são indicadores da condição de exposição, e podem resultar, em longo prazo, em danos à saúde (MANNO, et al., 2009). Além disso, busca definir a exposição ocupacional, quantificar a dose (interna, efetiva, acumulada) da exposição e verificar se os limites de exposição são respeitados (MANINI et al., 2007). Em relação aos trabalhadores, tem como função avaliar a exposição de forma individual ou coletiva, além proteger e avaliar os riscos à saúde (MANNO et al., 2009).

A avaliação biológica da exposição às substâncias químicas somente é possível quando estiverem disponíveis informações toxicológicas suficientes referentes ao mecanismo de ação e/ou à toxicocinética dos agentes químicos aos quais os indivíduos estão expostos. Desta forma, é necessário o conhecimento de como a substância é absorvida pelas diferentes vias de absorção do organismo; de como é distribuída, biotransformada e eliminada, sendo também de extrema importância o conhecimento sobre o acúmulo de tal substância no organismo (BERNARD & LAUWERYS, 1986; RÜDIGER, 1999).

A monitorização biológica complementa a monitorização ambiental, entretanto em termos de padronização e interpretação é muito mais complexa. A monitorização biológica avalia assim, todas as vias de absorção (respiratória, cutânea e digestiva), levando em conta as diferenças individuais de absorção, a capacidade metabólica

de cada exposto, bem como as variações na carga de trabalho e casos de co-exposição, em que os indivíduos encontram-se simultaneamente expostos a uma complexa mistura de xenobióticos (MANINI et al., 2007).

Órgãos internacionais como a ACGIH (Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais) e a DFG (Fundação de Pesquisa Alemã) são entidades formadas por especialistas em Higiene e Toxicologia Ocupacional, que congregam as melhores informações científicas voltadas para essa área. Anualmente a ACGIH publica uma lista de valores referentes aos Limites de Tolerância (TLVs) e Índices Biológicos de Exposição (BEI), que servem de diretrizes para promover a saúde e a segurança no ambiente de trabalho. Esses valores representam condições sob as quais se acredita que todos os trabalhadores possam estar expostos repetidamente sem efeitos adversos à saúde, entretanto não são considerados como um índice relativo de toxicidade entre exposições ocupacionais seguras e nocivas (ACGIH, 2004).

A ABHO (Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais) edita anualmente os valores recomendados pela ACGIH. No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7) de 29 de dezembro de 1994 da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho, estabeleceu parâmetros biológicos para controle da exposição a agentes químicos. Conforme esta Portaria, todas as instituições que admitam trabalhadores como empregados são obrigados a elaborar e implementar o Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), que tem por objetivo promover e preservar a saúde dos trabalhadores (BRASIL, 1994).

O PCMSO inclui a realização obrigatória de exames médicos, entre eles avaliação clínica, envolvendo anamnese ocupacional, exame físico e metal, além de outros exames complementares realizados de acordo com termos específicos da NR-7. A periodicidade das avaliações clínicas deve ser no mínimo, semestral, podendo ser reduzida a critério do médico do trabalho (BRASIL, 1994).

### 2.2.1 Biomarcadores

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados em decorrência da interação do organismo com xenobióticos. Entretanto, a

determinação quantitativa destes parâmetros, usados como biomarcadores somente será possível se existir correlação entre a intensidade da exposição e o efeito provocado pela substância (AMORIM, 2003).

Os biomarcadores são definidos como alterações em componentes celulares ou bioquímicos, estruturas ou funções do organismo que podem ser quantificadas em qualquer sistema ou amostra biológica; e que avaliam a intensidade da absorção e o risco à saúde (WHO, 1996; MANNO et al., 2009).

Os biomarcadores são subdivididos em: biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de suscetibilidade, de acordo com a sua importância toxicológica (NRC 1987; WHO, 2001; IUPAC, 2007). A subdivisão dos biomarcadores é representada na Figura 1.

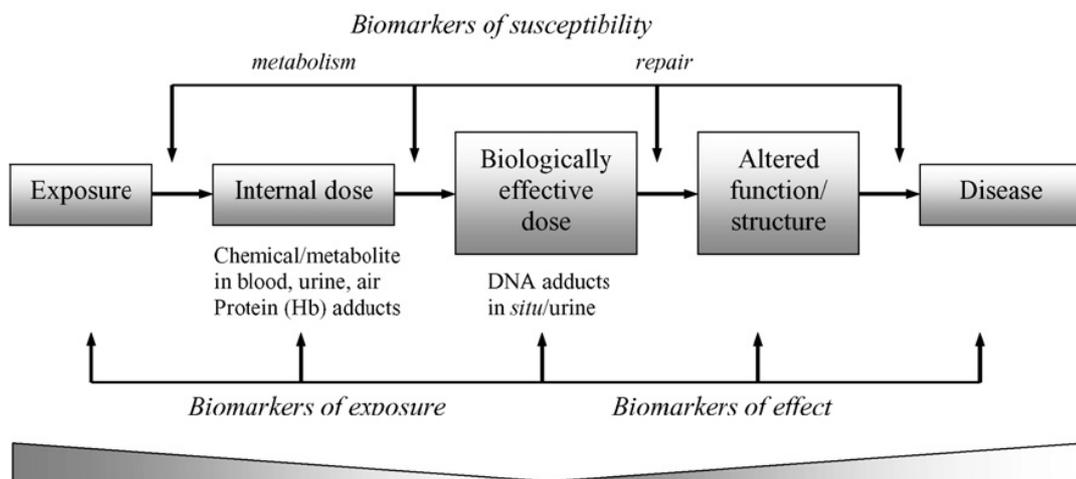


Figura 1 - Subdivisão dos biomarcadores na avaliação do risco (Adaptado de MANINI et al., 2007).

Os biomarcadores de exposição, também denominados indicadores biológicos de exposição (IBE) são definidos como o xenobiótico propriamente dito e/ou seus metabólitos ou ainda, como produtos de interação entre o xenobiótico e alguma molécula-alvo ou célula do organismo (NRC, 1987; MANNO et al., 2009). O principal exemplo de biomarcadores de exposição é a presença de metabólitos urinários decorrentes da exposição ocupacional a solventes orgânicos (OGA, 2008).

Existem diferentes tipos de biomarcadores para o mesmo xenobiótico, sendo assim, a escolha destes deve atender uma série de requisitos (BERNARD, 1995).

Um biomarcador ideal deve ser específico para a exposição de interesse, apresentar possibilidade de detecção em pequenas quantidades amostrais, bem como ser quantificado por método não invasivo e de baixo custo (HENDERSON et al., 1989). Segundo Oga (2008), o conhecimento da toxicocinética e toxicodinâmica, bem como o da relação dose-efeito e dose-resposta; técnicas analíticas confiáveis e amostragem de fácil execução são os parâmetros considerados necessários para escolha de um biomarcador eficiente.

Dessa forma, o uso de indicadores biológicos de exposição na toxicologia é bastante amplo, tendo como função esclarecer a relação entre causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco a saúde com objetivo de diagnóstico clínico; além de serem importantes ferramentas na monitorização biológica (IPCS, 1993).

Os biomarcadores de efeito são caracterizados como qualquer alteração bioquímica ou fisiológica mensurável, dentro do organismo, que dependendo da magnitude pode ser reconhecido como um distúrbio potencial da saúde ou doença propriamente dita (NRC, 1987; MANNO et al., 2009). Este tipo de biomarcador é representado por um grupo heterogêneo de sinais. A presença de proteínas na urina de indivíduos expostos a solventes orgânicos ou determinados metais como o cádmio, é um exemplo clássico de biomarcador de efeito para dano renal, que exige conhecimentos sobre a toxicocinética e toxicodinâmica do xenobiótico (MANNO et al., 2009); a inibição da atividade da enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) e conseqüente inibição da síntese do heme pelo chumbo inorgânico também são exemplos dessa classe de biomarcador (OGA, 2008).

Os biomarcadores de suscetibilidade são definidos como indicadores que exprimem uma condição adquirida ou congênita, baseada na capacidade limitada do organismo, frente à exposição a uma substância química específica (NRC, 1987; OGA, 2008). Esta categoria de biomarcador pode evidenciar alterações de absorção, distribuição, interações com macromoléculas, assim como a capacidade de causar modificações no organismo, decorrente da exposição ao xenobiótico (OGA, 2008). Um exemplo de biomarcador com essa característica é representado pelo citocromo P-450 (CYP450), complexo enzimático altamente utilizado em reações de desintoxicação de produtos químicos ocupacionais e ambientais, representado principalmente pela isoforma CYP2E1. Alterações nessa isoforma, decorrente de diferenças individuais, podem resultar em expressões distintas de sinais clínicos decorrentes da toxicidade química (MANNO, et al., 2009). O

polimorfismo de outras enzimas de desintoxicação, como a glutathione transferase (GST), também foi reconhecido como importante fator de suscetibilidade humana frente a substâncias químicas tóxicas. Isto é decorrente da menor capacidade de desintoxicação química, associada às isoformas variantes da enzima GST que apresentam atividade catalítica diminuída ou ausente (MANNO et al., 2009). Outro provável exemplo de biomarcador de suscetibilidade que pode ser investigado é polimorfismo enzimático da enzima ALA-D e a toxicidade ao chumbo (KELADA et al., 2001).

Segundo Manno et al. (2009), embora os biomarcadores estejam categoricamente separados, nem sempre é possível classificá-los somente em uma única denominação. A atribuição categórica de um biomarcador depende da sua importância toxicológica e do contexto em que está sendo usado.

Além disso, a validação (sensibilidade e especificidade) do biomarcador também é um aspecto importante a ser considerado. Este processo envolve propriedades intrínsecas do biomarcador, bem como o procedimento analítico de quantificação utilizado (BONASSI et al., 2001). A validação também envolve o esclarecimento da importância toxicológica do biomarcador e sua relação com o mecanismo de ação, bem como sua capacidade de detectar ou prever efeitos tóxicos (MANNO et al., 2009).

### 2.2.2 Limites biológicos de exposição

Os limites biológicos de exposição são representados pelos valores máximos dos indicadores biológicos de exposição (IBEs) para os quais se supõe que a maioria das pessoas ocupacionalmente expostas a xenobióticos, dentro dos níveis ambientais aceitáveis, não corre risco de dano à saúde (BRASIL, 1994; KLAASSEN, et al., 2001; OGA, 2008).

No Brasil, os limites biológicos de exposição são representados pelo IBMP (Índice Biológico Máximo Permitido), que são determinados por meio de estudos epidemiológicos, experimentais e casos clínicos para assegurar a saúde do trabalhador (BRASIL, 1994).

Os valores de biomarcadores de exposição inferiores ao IBMP apresentam relativa aceitação ou tolerância da exposição, não correspondendo a uma situação de risco para a saúde do trabalhador. Entretanto, valores de monitorização biológica constantemente inferiores aos valores máximos permitidos não garantem que o trabalhador não possa vir a apresentar alterações no estado de saúde (OGA, 2008).

Bulcão (2008) demonstrou que, mesmo com valores de biomarcadores de exposição abaixo dos limites biológicos permitidos, trabalhadores expostos ocupacionalmente apresentaram danos celulares e alterações bioquímicas que contribuem para o desenvolvimento de doenças ocupacionais. Sendo assim, a avaliação biológica periódica de trabalhadores expostos a baixas concentrações de xenobióticos, também é de extrema importância, uma vez que danos ao organismo também podem ser desenvolvidos.

Níveis acima dos IBMP indicam exposição excessiva e possibilidade de surgimento de efeitos em longo prazo, mesmo que os indivíduos não apresentem sinais e sintomas resultantes do processo de toxicidade. Em casos assim, os trabalhadores devem ser afastados do local de trabalho, ou do risco, até que os biomarcadores de exposição apresentem níveis abaixo do IBMP e as medidas de controle nos ambientes de trabalho tenham sido adotadas (BRASIL, 1994).

### **2.3 Exposição ocupacional a tintas**

Aproximadamente 200 mil trabalhadores em todo mundo estão empregados em indústrias de tintas. Assim como as demais indústrias químicas, a indústria de tintas utiliza grande quantidade de substâncias químicas. Milhares de compostos químicos são usados na constituição de tintas, sendo utilizados com a função de pigmentos, diluentes, aglutinantes, solventes e aditivos (IARC, 1989).

As tintas, na sua maioria, são constituídas por uma mistura complexa de solventes orgânicos (hidrocarbonetos, cetonas entre outros) e metais pesados, entre outros xenobióticos, em diferentes concentrações (IARC, 1989). Dentre os xenobióticos presentes na constituição das tintas, o tolueno é tido como o principal componente (WHO, 1996; MOON et al., 2001; SAMOTO et al., 2006; OGA, 2008), entretanto, outros solventes orgânicos, bem como alguns metais pesados também

podem ser encontrados na sua constituição (IARC, 1989). A presença dessas substâncias em diferentes concentrações no ambiente de trabalho pode representar significativo risco à saúde do trabalhador.

Este trabalho de mestrado tem como foco principal, o solvente orgânico tolueno, uma vez que é o principal constituinte de tintas, e é o único agente químico cuja monitorização biológica periódica é obrigatória em pintores; entretanto, na revisão bibliográfica também serão abordados os solventes orgânicos xileno, estireno e etilbenzeno, bem como metal pesado, chumbo.

Do ponto de vista da medicina do trabalho, a exposição ocupacional apresenta-se mais vinculada a uma mistura complexa de agentes químicos presentes no ambiente de trabalho, do que a um xenobiótico isoladamente (BRAUTBAR & WILLIAMS, 2002). Sendo assim, indivíduos que trabalham expostos a tintas estão simultaneamente expostos a diferentes tipos de xenobióticos, caracterizando um processo de co-exposição ou exposição mista, que pode resultar em inibição ou indução das etapas de biotransformação de xenobióticos. As inibições resultantes de co-exposições a solventes orgânicos são mais frequentes quando os compostos são biotransformados por um mesmo sistema enzimático. Como as enzimas em geral e as oxidases de função mista apresentam baixa especificidade, não é surpreendente que um solvente possa competir com outro pela biotransformação e, que até mesmo ocorra saturação enzimática (IKEDA, 1995; KLAASSEN et al., 2001; OGA, 2008). Apesar disso, o conhecimento sobre a toxicidade em casos de co-exposição a solventes orgânicos é ainda relativamente escasso quando comparado a exposição individual (KLAASSEN et al., 2001).

### 2.3.1 Solventes orgânicos

Os solventes orgânicos são produtos químicos líquidos à base de carbono, compostos por diversas estruturas químicas, com lipofilicidade e volatilidade variável (McDIARMID & AGNEW, 1995; KLAASSEN et al., 2001).

A absorção pelo trato respiratório é a principal via de entrada dos solventes orgânicos no organismo. A capacidade de penetração dos vapores dos solventes no fluxo sanguíneo e sua velocidade de transporte pelas membranas dependem da

solubilidade lipídica do solvente, uma vez que as lipoproteínas das membranas celulares têm que ser atravessadas. Uma segunda via de exposição é a pele, sendo que o contato frequente com solventes lipossolúveis pode levar a irritações dérmicas, entre outras injúrias (KLAASSEN, et al., 2001).

Dentre os solventes orgânicos, destacam-se tolueno, os xilenos, estireno e etilbenzeno como agentes químicos potencialmente importantes no risco ocupacional de exposição e toxicidade (ASTIER, 1992; LAFFON et al., 2001; GROMADZINSKA & WASOWICZ, 2003).

Os principais determinantes da toxicidade dos solventes são: número de átomos de carbono; números de ligações químicas entre átomos de carbono; estrutura molecular e a presença de grupamentos funcionais (KLAASSEN et al., 2001; AZEVEDO, 2004).

#### 2.3.1.1 Tolueno

O solvente orgânico tolueno ou também chamado metil-benzeno é um hidrocarboneto aromático, incolor e de odor característico. Sua fórmula molecular é  $C_6H_5CH_3$ , com peso molecular de 92,15 (SULLIVAN & VAN ERT, 1992). É altamente volátil, tendo ponto de ebulição de 110,6°C. Apresenta baixa solubilidade em água (6,5 mmol/litro a 20°C), e significativa lipossolubilidade, sendo mais solúvel em acetona e miscível com etanol, éter etílico, benzeno, entre outros (LARINI, 1998). A estrutura química do tolueno é representada na Figura 2.

A exposição ocupacional ao tolueno é decorrente da sua ampla utilização em diversos ramos industriais (HAMMER, 2002; COSKUN et al., 2005). É largamente utilizado na fabricação de tintas e vernizes, borrachas e na indústria gráfica (EDELFORNS et al., 2002). É também utilizado como solvente para óleos, resinas, carvão, piche, betume e acetilcelulose. Na indústria química, o tolueno serve de matéria-prima para síntese orgânica do cloreto de benzoato, sacarina, cloramina T, trinitrotolueno, tolueno diisocianato, entre outros (OGA, 2008). Além disso, é encontrado na fumaça de cigarro, nos vapores de outros solventes orgânicos e é um importante constituinte da gasolina, sendo lançado no meio ambiente como contaminante (FUSTINONI et al., 2005).

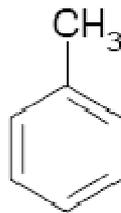


Figura 2 - Estrutura química do tolueno.

#### 2.3.1.1.1 Toxicocinética

A principal via de absorção do tolueno é o sistema respiratório. Sua absorção pulmonar, sob forma de vapor, é estimada como sendo de 40 a 60% da concentração total inalada. A retenção do tolueno nos pulmões é dependente da ventilação pulmonar, do gradiente de concentração na mucosa alveolar, do coeficiente de distribuição sanguíneo e, em pequena extensão, da circulação sanguínea alveolar (LARINI, 1998). O solvente é rapidamente absorvido nos primeiros 10-15 minutos de exposição, observando-se elevação da sua concentração sanguínea. Em seguida, a absorção torna-se mais lenta até atingir o equilíbrio, em torno de 25 minutos de exposição, e mantendo-se constante ao longo da exposição (OGA, 2008).

A segunda via potencial de exposição do tolueno é a pele e sua taxa de absorção varia de 14 a 23 mg/cm<sup>2</sup>/h (ANDREWS & SNYFER, 1991). Apesar de a absorção cutânea ser pequena, em função da volatilidade do tolueno, é bastante rápida devido à lipossolubilidade do mesmo (OGA, 2008). O tolueno é também bem absorvido pelo trato gastrointestinal, entretanto essa absorção é mais lenta que a absorção pulmonar, sendo que a concentração sanguínea do agente tóxico atinge um valor máximo 2 horas após a absorção oral (LARINI, 1998).

A solubilidade do tolueno no sangue é indicada pelo seu coeficiente de distribuição sangue/água, que varia de 11,2 a 15,6 a 37°C, indicando que o solvente não apresenta alta solubilidade no sangue (OGA, 2008).

O tolueno acumula-se rapidamente no cérebro, devido à alta perfusão sanguínea e conteúdo lipídico do órgão. Em seguida deposita-se em outros órgãos de acordo com o teor lipídico destes, sendo o tecido adiposo um dos órgãos com

maior acúmulo do solvente (KLASSEN et al., 2001). Entre os demais tecidos incluem-se a medula óssea, fígado, rins e tecidos nervosos (KING et al., 1991; SULLIVAN & VAN ERT, 1992, OGA, 2008).

O processo de biotransformação do tolueno é representado na Figura 3. Aproximadamente 80% do tolueno absorvido é metabolizado nos retículos endoplasmáticos hepáticos, através do citocromo P-450, sendo que as enzimas hepáticas estão envolvidas em diversas etapas do processo de biotransformação do tolueno. Primeiramente, o tolueno sofre oxidação do grupamento metila dando origem ao álcool benzílico, que através da enzima álcool desidrogenase é oxidado a benzaldeído e finalmente a ácido benzóico, através da ação enzimática da aldeído desidrogenase. Em conjugação com a glicina o ácido benzóico dá origem ao ácido hipúrico, o metabólito do tolueno de maior quantidade na urina (LAURENS, 2002; OGA, 2008).

Cerca de 1% do tolueno absorvido sofre hidroxilação no anel aromático, originando compostos isômeros intermediários, os epóxidos *orto*-, *meta*- e *para*-cresol, que são excretados na urina após conjugação com ácido glicurônico ou sulfatos (DILLS et al., 1997; LAURENS, 2002; OGA, 2008). Ainda, não mais de 2% do tolueno absorvido é excretado de forma inalterada ou biotransformado através da bile, sofrendo reabsorção e somente uma porção muito pequena é excretada nas fezes (LARINI, 1998).

A toxicocinética do tolueno pode ser influenciada pela exposição concomitante a outros tipos de solventes, como hexano, xileno, benzeno, metilcetona, álcool propílico, entre outros. A administração de etanol ou fenobarbital mostrou-se capaz de inibir a metabolização do tolueno, aumentando o tempo de eliminação do solvente do organismo, o que contribui para o aumento da concentração sanguínea do tolueno e aumento da sua toxicidade (OGA, 2008).

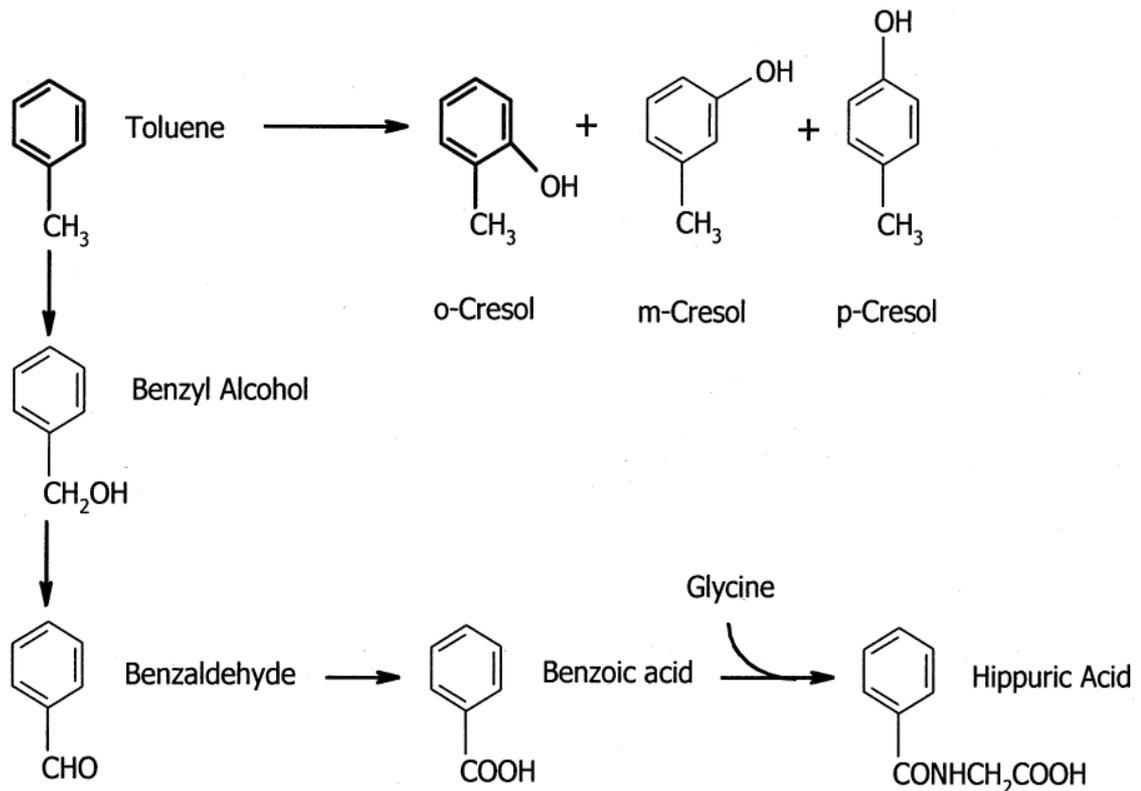


Figura 3 - Principais vias de biotransformação do tolueno no organismo (Adaptado de PIERCE et al., 2002).

### 2.3.1.1.2 Toxicodinâmica e sinais clínicos

O tolueno apresenta efeitos narcóticos e genotóxicos, atingindo principalmente o sistema nervoso central, sendo bem conhecida sua neurotoxicidade (HAMMER, 2002), representando alto risco à saúde dos trabalhadores expostos a este solvente.

No sistema nervoso central (SNC), o tolueno apresenta um sistema bifásico. Em baixas concentrações o solvente provoca estimulação acompanhada de euforia e excitação; em altas concentrações leva à depressão, com desorientação, tremores, alucinações, ataxia, convulsão e coma (COSKUN, et al., 2005; OGA, 2008). Apesar da conhecida ação do tolueno sobre o SNC, seu mecanismo de ação ainda é pouco elucidado.

Em exposições agudas com doses relativamente baixas (200 ppm), é descrito irritação dos olhos e garganta, podendo ocorrer lacrimejamento com doses maiores (400 ppm). Nessas mesmas doses, observa-se aumento do tempo de reação, sinais

de incoordenação, cefaléia, confusão mental e tonturas, quando a exposição se prolonga por mais de oito horas (FORSTERS et al., 1994). Com doses crescentes (500-800 ppm), observa-se náusea, anorexia, hilaridade, perda do autocontrole, perdas momentâneas de memória, nervosismo, fadiga muscular, parestesia e insônia (FORSTERS et al., 1994).

Em exposições crônicas, o tolueno induz a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (AMORIM & ALVAREZ LEITE, 1999; KLAASSEN et al., 2001). O dano hepático associado ao tolueno tem sido observado através do aumento das enzimas hepáticas, bem como pela incidência de hepatite em expostos ocupacionalmente (SVENSSON et al., 1992; BARBERINO et al., 2005). Além disso, segundo González-Yebra et al. (2006), a exposição ocupacional ao tolueno pode estar associada à presença de lesão renal em trabalhadores expostos.

O tolueno possui ainda intensa ação irritante sobre a pele, removendo lipídios naturais da epiderme e sendo capaz de produzir dermatites irritativas de contato. Em exposições graves, pode atuar sobre o sistema auditivo diminuindo a audição e até mesmo causando surdez (OGA, 2008).

Além disso, a biotransformação do tolueno pelo citocromo P-450 está associada à formação de intermediários reativos, como epóxidos e espécies reativas de oxigênio (EROS) (AL-GHAMDI et al., 2003), substâncias altamente nocivas ao organismo, que podem causar dano celular, lipídico e protéico (JUNQUEIRA & RAMOS, 2005).

#### 2.3.1.1.3 Monitorização biológica

No Brasil, a monitorização biológica da exposição ocupacional ao tolueno é realizada através dos níveis urinários de ácido hipúrico, indicador biológico de exposição proposto (BRASIL, 1994). No entanto, apesar do ácido hipúrico ser o principal metabólito urinário do tolueno, possui valor de referência (VR) de até 1,5 g/g de creatinina, podendo ser encontrado como constituinte normal na urina de indivíduos não expostos ao tolueno (TRUCHON et al., 1999). O índice biológico máximo permitido (IBMP) para o ácido hipúrico urinário é de 2,5 g/g creatinina (BRASIL, 1994).

A excreção do ácido hipúrico na urina pode sofrer influência da dieta, devido à presença do ácido benzóico e seus precursores em alimentos, bebidas e medicamentos. Assim, a ingestão de grandes quantidades de refrigerantes ou enlatados conservados com ácido benzóico, café, chá, ameixas, entre outros alimentos, pode elevar os níveis de ácido hipúrico na urina (TRUCHON et al., 1999; OGA, 2008). Além disso, segundo laboratórios especializados, a quantificação de ácido hipúrico pode apresentar níveis alterados em indivíduos que façam uso de certos medicamentos como antidepressivos inibidores da monoamina oxidase (IMAO), femprobamato e dietilpropiona, provocando aumento da excreção urinária deste metabólito ou diminuição, com o uso de analgésicos como acetaminofeno (OGA, 2008).

Dessa forma, quando a exposição ao tolueno é baixa, fontes não ocupacionais podem provocar aumento nos níveis urinários de ácido hipúrico, modificando significativamente a relação entre a exposição ao solvente e o indicador biológico de exposição, o que compromete o uso deste biomarcador de exposição ao tolueno (TRUCHON et al., 1999).

Atualmente, órgãos internacionais, como a ACGIH e a DFG, ambos responsáveis pelo estabelecimento dos índices biológicos de exposição nos EUA e Alemanha, respectivamente, têm recomendado quantificação do *orto*-cresol (*o*-cresol), como uma alternativa na monitorização biológica do tolueno, pelo fato de ser mais específico, uma vez que sofre menos interferência de alimentos, aditivos e medicamentos. Além disso, o *o*-cresol não se apresenta como um constituinte normal da urina de indivíduos não expostos ao tolueno, diferentemente do ácido hipúrico e do *para*-cresol. (LAURENS, 2002; OGA, 2008). De acordo com Murray & Adams (1988), o *para*-cresol pode ser formado através do metabolismo microbiano da tirosina no intestino, além de estar presente em vários alimentos (ATSDR, 1992), o que limita a sua utilização como indicador biológico de exposição ao tolueno. Entretanto, como apenas uma pequena parte do tolueno metabolizado é biotransformado em *o*-cresol, existe a possibilidade de não detecção deste metabólito em casos de exposições leves ao tolueno. Além disso, a grande desvantagem deste metabólito é que se encontra aumentado em até três vezes na urina de fumantes, decorrente da concentração de *o*-cresol presente no cigarro (DOSSING et al., 1983; OGA, 2008). Segundo a ACGIH, o limite biológico de exposição (BEL) para o *o*-cresol é de 3 mg/L.

Além dos metabólitos urinários, o tolueno inalterado na urina também tem sido proposto como biomarcador de exposição em vários estudos (IKEDA, 1999; FUSTINONI et al., 2007; DUCOS et al., 2008; KAWAI et al., 2008). Entretanto, existe uma grande variação entre os dados encontrados na literatura, o que pode ser decorrente de perdas ou contaminações externas durante a análise (ANGERER & KRAMER, 1997, DUCOS et al., 2008). Além disso, ainda faltam estudos sobre a cinética e a influência de fatores ambientais na quantificação do tolueno urinário como indicador biológico de exposição, o que compromete a credibilidade deste biomarcador de exposição ao tolueno (AYLWARD et al., 2008).

Outra alternativa recomendada pela ACGIH na monitorização biológica do tolueno é a quantificação dos níveis sanguíneos do solvente inalterado, uma vez que a concentração do tolueno sanguíneo correlaciona-se significativamente com a intensidade de exposição ambiental ao solvente (KAWAI et al., 1993). Entretanto, a utilização do tolueno sanguíneo na biomonitorização do tolueno reflete apenas a exposição mais recente, e não a exposição média ocorrida durante todo o dia, uma vez que o solvente se difunde rapidamente pelos tecidos (OGA, 2008).

#### 2.3.1.2 Xileno

Os xilenos ou dimetilbenzenos (isômeros *orto*-, *meta*- e *para*-) são líquidos incolores de elevada lipossolubilidade, facilmente solúveis em álcool, acetona, éter, clorofórmio, benzeno entre outros e praticamente insolúveis em água. O ponto de ebulição dos xilenos varia entre 139°C e 144°C, de acordo com cada isômero (OGA, 2008). Apresenta, como fórmula molecular  $C_6H_4(CH_3)_2$ , cujo peso molecular é 106,17 (WHO, 1996). A proporção dos isômeros *orto*-, *meta*- e *para*-xileno na constituição do solvente é, aproximadamente, de 10%, 70% e de 23%, respectivamente (OGA, 2008). O xileno técnico, conhecido comercialmente por xilol, é constituído de uma mistura dos isômeros *orto*-, *meta*- (60-70%), *para*-xileno e etilbenzeno, apresentando um ponto de ebulição de aproximadamente de 140°C (LARINI, 1998). As estruturas químicas dos isômeros do xileno são representadas na Figura 4.

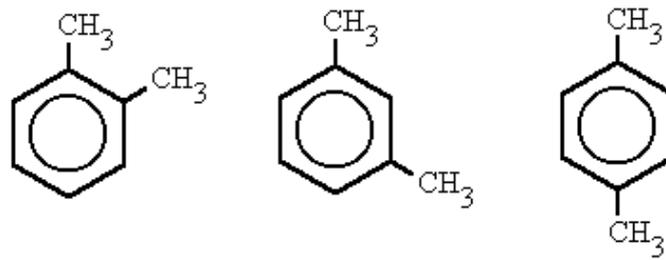


Figura 4 - Estruturas químicas dos isômeros do xileno.

O xileno é tido como um dos principais componentes da gasolina e do óleo combustível (KLASSEN et al., 2001). É largamente utilizado em diferentes ramos industriais, geralmente em combinação com o tolueno (WHO, 1996), na indústria química, principalmente na formulação de inseticidas do tipo emulsões e concentrados emulsionáveis (LARINI, 1998).

Do ponto de vista ocupacional o isômero *para*-xileno é o mais importante, possuindo pressão de vapor a 25°C igual a 8,9 mmHg, ponto de ebulição de 138°C e vapores mais densos do que o ar (OGA, 2008).

#### 2.3.1.2.1 Toxicocinética

O xileno é bem absorvido pelas vias pulmonar e oral (KLASSEN et al., 2001), sendo que sua absorção através da pele é insignificante em condições normais de exposição (LARINI, 1998; ATSDR, 1995). É distribuído pelos tecidos de acordo com o fluxo sanguíneo e o teor lipídico dos mesmos (LOF & JOHANSON, 1998). Aproximadamente 95% do xileno absorvido é biotransformado e excretado na urina (LARINI, 1998; OGA, 2008).

A biotransformação do xileno ocorre via hepática, através da oxidação dos grupamentos metila e/ou pela oxidação aromática. A principal via de metabolização é decorrente da oxidação dos grupamentos metilas dos isômeros, formando os respectivos alcoóis metilbenzila, que dão origem aos ácidos *orto*-, *meta*-, e *para*-toluicos. Os ácidos *meta*- e *para*-toluico se conjugam com a glicina originando os ácidos *meta*- e *para*-metilhipúrico, respectivamente. O ácido *orto*-toluico, na sua

maioria, é excretado sob a forma inalterada pela urina ou conjugado com ácido glicurônico ou sulfato. Os ácidos *meta*- e *para*-metilhipúrico representam 95% da fração total de xileno absorvida (LARINI, 1998; OGA, 2008).

Em menor proporção o xileno sofre uma segunda rota de biotransformação, através da oxidação do anel aromático, produzindo compostos fenólicos, denominados xilenóides, que são excretados pela urina em conjugação com sulfato ou ácido glicurônico (LARINI, 1998; OGA, 2008). A Figura 5 representa o esquema de biotransformação do *para*-xileno.

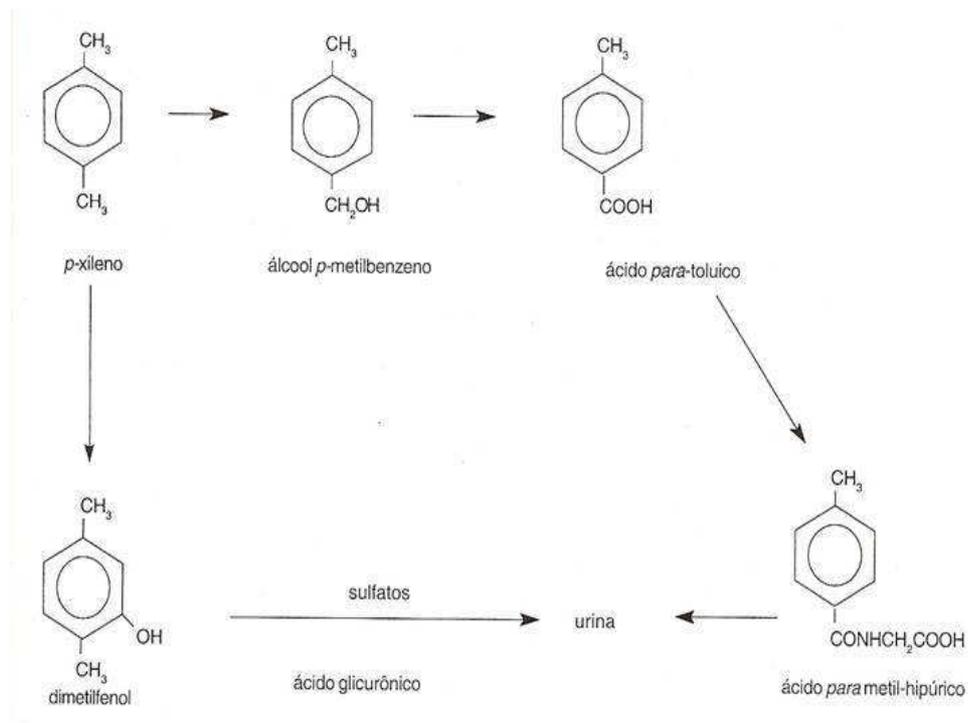


Figura 5 - Esquema de biotransformação do *para*-xileno (Adaptado de OGA, 2008).

### 2.3.1.2.2 Toxicodinâmica e sinais clínicos

A toxicidade do xileno é similar a do tolueno (CHEN et al., 1994), sendo que o principal efeito tóxico decorrente da exposição ocupacional ao xileno e seus isômeros é a ação depressora sobre o sistema nervoso central (UCHIDA et al., 1993; WHO, 1996).

Apresenta ação irritante sobre a pele e mucosas, provocando dermatite e irritação grave, respectivamente. A ação do xileno sobre o sistema pulmonar pode resultar em mecanismo deletério em vários componentes celulares, decorrente da formação do metabólito aldeído durante o processo de biotransformação (LARINI, 1998).

O xileno ou a mistura de seus isômeros são tidos como hepatotóxicos, provocando peroxidação lipídica (OGA, 2008) e aumento do tecido hepático, decorrente da proliferação dos retículos endoplasmáticos (TOFTGARD & NILSEN, 1982; KLAASSEN et al., 2001). Além disso, provocam indução das enzimas do citocromo P-450, aumentando a capacidade de biotransformação hepática (TOFTGARD & NILSEN, 1982; UNGVÁRY, 1990; KLAASSEN et al., 2001).

#### 2.3.1.2.3 Monitorização biológica

No Brasil, a monitorização biológica da exposição ao xileno é realizada através dos níveis urinários de ácido metilhipúrico, uma vez que esse metabólito não é encontrado normalmente na urina de indivíduos não expostos ao xileno (BRASIL, 1994).

Tanto a soma dos ácidos metilhipúricos, como o isômero individual do ácido na urina é aplicável para a monitorização biológica do xileno, uma vez que a exposição pode ser decorrente tanto da mistura dos três isômeros do xileno, como por um isômero individualmente (WHO, 1996).

Em exposições a concentrações estáveis, existe uma correlação linear entre a concentração de xileno no ambiente e a concentração de ácido metilhipúrico excretado durante o período de exposição total ou durante as duas últimas horas (LARINI, 1998). O IBMP para o ácido metilhipúrico urinário é de 1,5 g/g creatinina (BRASIL, 1994).

#### 2.3.1.3 Estireno

O estireno, também denominado feniletileno é um líquido viscoso incolor amarelado, moderadamente volátil. Sua fórmula molecular é  $C_8H_8$ , cujo peso molecular é 104,15, tendo como ponto de ebulição  $145,15^{\circ}C$  (WHO, 1996). Apresenta baixa solubilidade em água (0,029g/100 g de água a  $20^{\circ}C$ ), porém é solúvel em álcool, éter, acetona e bissulfeto de carbono (OGA, 2008). A estrutura química do estireno é representada na Figura 6.

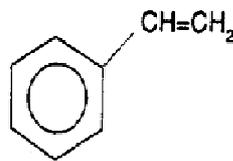


Figura 6 - Estrutura química do estireno.

As principais fontes de exposição ao estireno são decorrentes da fabricação de plásticos (poliestireno), da produção de resinas, borracha sintética, produtos de fibra de vidro e de sínteses orgânicas (WHO, 1996; OGA, 2008). O solvente também pode ser encontrado em tintas, adesivos, produtos de limpeza e vernizes (IARC, 1994), bem como na fumaça de cigarro e nas emissões de materiais de construção (KLAASSEN et al., 2001).

#### 2.3.1.3.1 Toxicocinética

As principais vias de absorção do estireno no organismo ocorrem por inalação ou pelo contato com a pele (BROOKS et al., 1980). A absorção pulmonar do estireno varia de 60% a 70% do total inalado (IARC, 1994), sendo influenciada, significativamente, pelo esforço físico desenvolvido durante a exposição (OGA, 2008). A quantidade de solvente absorvida através da pele íntegra representa apenas 2% do total absorvido via pulmonar (OGA, 2008).

Depois de absorvido, o estireno é amplamente distribuído por todo organismo, concentrando-se no fígado, cérebro, rins e tecido adiposo. A lenta eliminação do solvente pode indicar acúmulo, principalmente no tecido adiposo, em situações de exposição diariamente repetidas (OGA, 2008; RUEFF et al., 2009).

A biotransformação do estireno é representada na Figura 7. Ocorre por via hepática, através do sistema oxidase de função mista. Primeiramente, ocorre a formação do metabólito etilbenzeno 1,2-epóxido, altamente reativo, que se liga covalentemente a macromoléculas celulares, sendo responsável diretamente pela ação genotóxica do estireno (OGA, 2008; RUEFF et al., 2009). A detoxificação do epóxido ocorre através da ação das enzimas epóxido hidratase e glutathione S-transferase (KLAASSEN et al., 2001; DARÉ et al., 2004). A oxidação deste composto dá origem aos ácidos mandélico e fenilglioílico, que representam os principais metabólitos do estireno (OGA, 2008).

Aproximadamente 2,6% do estireno inalado é excretado de forma inalterada pelo ar expirado. Aproximadamente 85% da dose absorvida é excretado na forma de ácido mandélico e 10% como ácido fenilglioílico por via renal (OGA, 2008).

O metabolismo do estireno é inibido por outros solventes como tolueno e benzeno. Assim, os metabólitos urinários do estireno podem estar reduzidos quando indivíduos estiverem expostos a estes solventes orgânicos concomitantemente (ATSDR, 1992; GROMADZINSKA & WASOWICZ, 2003).

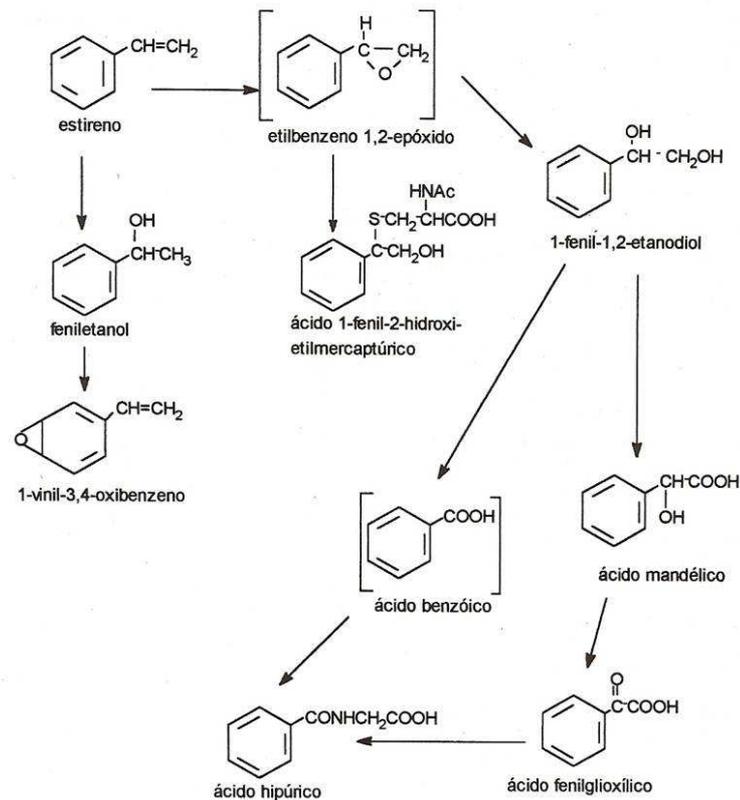


Figura 7 - Biotransformação do estireno (Adaptado OGA, 2008).

### 2.3.1.3.2 Toxicodinâmica e sinais clínicos

As propriedades narcóticas e neurotóxicas do estireno representam os principais efeitos tóxicos causados em seres humanos. Os efeitos neurotóxicos agudos decorrentes da exposição ocupacional a altos níveis de estireno, assemelham-se aos efeitos produzidos por outros solventes orgânicos (IARC, 1994).

O estireno apresenta ação irritante sobre a pele e mucosas. É tido como hepatotóxico, sendo que a ação tóxica parece estar relacionada com a depleção da glutatona reduzida. Além disso, é considerado carcinogênico, provocando efeitos mutagênicos e embriotóxicos (OGA, 2008).

Foi observada ototoxicidade em ratos (LATAYE et al., 2000), entretanto nenhum estudo em humanos comprovou tal dano relacionado ao solvente (MUIJSER et al., 1998; LAWTON et al., 2006). Além disso, vários estudos têm relatado a influência do estireno na visão, provocando alterações e deficiência na

capacidade de discriminação entre as cores (EGUCHI et al., 1995; CAMPAGNA et al., 1995; OGA, 2008).

#### 2.3.1.3.3 Monitorização biológica

A legislação brasileira propõe como biomarcadores de exposição ao estireno a determinação isolada ou conjunta dos níveis urinários do ácido mandélico e do ácido fenilgloxílico (BRASIL, 1994).

É recomendado que a avaliação da exposição crônica ao estireno seja realizada através da quantificação dos níveis urinários do ácido mandélico e do ácido fenilgloxílico em urina coletada no final da jornada de trabalho diária ou na manhã seguinte (RUEFF et al., 2009). A monitorização na manhã seguinte poderia refletir uma melhor avaliação da exposição crônica devido à alta lipossolubilidade do solvente (CSÁNADY et al., 1994; ACGIH, 2003).

Uma forte correlação é observada entre a concentração ambiental do estireno e os níveis urinários dos ácidos mandélico e fenilgloxílico (VODICKA et al., 1999). A quantificação simultânea dos ácidos utilizados como biomarcadores de exposição ao estireno representa uma correlação mais forte com a concentração do solvente inalado do que a determinação do ácido mandélico isoladamente (KIVISTO et al., 1993; PEKARI et al., 1993).

A concentração máxima aceitável dos níveis urinários de ácido mandélico e ácido fenilgloxílico são de 0,80 e 0,24 grama por grama de creatinina, respectivamente (BRASIL, 1994; OGA, 2008).

#### 2.3.1.4 Etilbenzeno

O etilbenzeno é um solvente orgânico incolor, frequentemente encontrado na gasolina e produzido comercialmente através do processo de alquilação do benzeno com o etileno (JANG et al., 2001). A estrutura química do estireno é representada na Figura 8.

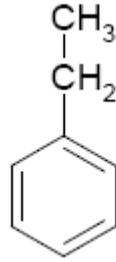


Figura 8 - Estrutura química do etilbenzeno.

O etilbenzeno é um intermediário químico de alto valor comercial, utilizado extensivamente nas indústrias química, petroquímica e farmacêutica, em diferentes aplicações, na fabricação de tintas e vernizes e como precursor de diversos outros produtos. O seu maior emprego, entretanto, é na manufatura do monômero estireno, outro importante intermediário químico usado na produção de polímeros, resinas e borrachas sintéticas. A produção mundial de etilbenzeno é estimada como 23 milhões de toneladas ao ano, com cerca de 90% sendo empregada diretamente na síntese do estireno (KIRK & OTHMER, 1984; DEGNAN-JR et al., 2001).

#### 2.3.1.4.1 Toxicocinética

A principal via de absorção do etilbenzeno é a respiratória (ENGSTRÖM et al., 1984). Na forma líquida penetra através da pele, além de ser bem absorvido pelo trato gastrointestinal. É distribuído pelos tecidos do organismo através do fluxo sanguíneo e da lipofilicidade dos mesmos; é metabolizado pelas enzimas hepáticas do citocromo P-450, e posteriormente excretado em grande quantidade na forma de metabólitos urinários (LOF & JOHANSON, 1998). O ácido mandélico e o ácido fenilglioixílico representam 90% dos metabólitos urinários do etilbenzeno (ENGSTRÖM et al., 1984).

#### 2.3.1.4.2 Toxicodinâmica e sinais clínicos

A toxicidade do etilbenzeno é semelhante a do xileno e de outros hidrocarbonetos aromáticos, atingindo principalmente o sistema nervoso central (ACGIH, 1996; KLAASSEN et al., 2001). Apresenta ação irritante sobre a pele, mucosas e olhos (ACGIH, 1996). A exposição aguda pode produzir irritação das vias aéreas superiores seguida de narcose, calafrios e parada respiratória (ACGIH, 1996).

A maioria dos alquilbenzenos não parece ter efeito genotóxico ou carcinogênico, entretanto etilbenzeno e estireno são duas exceções. Foram encontrados dano renal, carcinoma e incidência aumentada de adenoma renal em ratos masculinos expostos a 750 ppm de etilbenzeno por até 2 anos (NTP, 1997).

#### 2.3.1.4.3 Monitorização biológica

No Brasil o biomarcador de exposição recomendado para monitorização biológica de exposição ao etilbenzeno é o ácido mandélico urinário (BRASIL, 1994).

O nível de IBMP aceitável para a exposição ocupacional ao etilbenzeno é de 1,5 g/g de creatinina, em urina coletada no final da jornada semanal de trabalho (BRASIL, 1994).

#### 2.3.2 Metais pesados

Os metais pesados são altamente reativos e bioacumuláveis. Na maioria das vezes, ocorrem no organismo de forma oxidada ou combinada, apresentando forte ligação por tecidos e proteínas, principalmente aquelas que apresentam grupamentos tiólicos em sua estrutura (MANAHAM, 1992).

Os metais diferem das outras substâncias químicas pelo fato de não serem sintetizados, nem metabolizados pelo organismo humano. A forma pela qual são absorvidos varia em função de suas propriedades químicas (MANAHAM, 1992). Do ponto de vista toxicológico é de extrema importância obter informações acerca da dose absorvida e efeito sobre tecido-alvo (KLAASSEN et al., 2001).

### 2.3.2.1 Chumbo (Pb)

O chumbo é um metal tóxico que ocorre tanto no meio ambiente, como em sistemas biológicos (KLAASSEN et al., 2001). Ocorre como contaminante ambiental, em decorrência do seu amplo espectro de utilização industrial, destacando-se principalmente na indústria extrativa, petrolífera, fábrica de baterias, de tintas e corantes, indústria gráfica e bélica (LARINI, 1998).

Existem compostos de chumbo dispersos na atmosfera tanto na forma sólida, como na forma gasosa. No estado de vapor o chumbo é oxidado no ar a óxido de chumbo. O metal pode existir no organismo tanto na forma divalente, altamente oxidante; como na forma tetravalente, formando compostos. (MANAHAM, 1992; DFG, 2001).

#### 2.3.2.1.1 Toxicocinética

O chumbo (Pb) presente no ambiente pode ser absorvido pelo organismo por via respiratória, por ingestão, bem como por via cutânea através de compostos orgânicos de chumbo, sendo essa a via de maior importância nas exposições ocupacionais. A absorção pelas vias citadas acima não depende somente da concentração e do tempo de exposição ao metal, mas também das propriedades físico-químicas do composto e dos fatores individuais do sujeito exposto (LARINI, 1998).

Após ser absorvido, o chumbo é distribuído pelo sangue aos diversos órgãos e sistemas, complexando-se com macromoléculas (BRASIL, 2006). No sangue encontra-se ligado aos eritrócitos, sendo que mais de 90% do chumbo sanguíneo está contido nas células vermelhas. (LARINI, 1998; KLAASSEN et al., 2001). O chumbo distribui-se entre dois compartimentos fundamentais no organismo: o compartimento de permuta, formado pelo sangue e tecidos moles; e o compartimento de armazenamento, constituído principalmente pelos ossos. Aproximadamente 90% do chumbo presente no organismo encontra-se depositado

nos ossos, sob a forma de trifosfato (MANAHAM, 1992; LARINI, 1998; MOREIRA & MOREIRA, 2004).

O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) do chumbo no sangue e tecidos moles varia de 35 a 40 dias, já nos ossos, o tempo de meia-vida do metal pode variar de 2 a 10 anos (ALVAREZ LEITE, 2006).

A maior parte do chumbo ingerido não é absorvida pelo organismo, sendo excretada de maneira inalterada nas fezes. O chumbo absorvido é excretado principalmente através dos rins, envolvendo os processos de filtração glomerular e transporte transtubular (BURTS et al., 1998; LARINI, 1998; KLAASSEN et al., 2001).

#### 2.3.2.1.2 Toxicodinâmica e sinais clínicos

O chumbo provoca uma série de alterações bioquímicas no organismo, todas elas deletérias. Apresenta capacidade de formar ligações covalentes, principalmente com átomos de enxofre dos compostos biológicos e, também, com grupamentos amínicos, carboxílicos e imidazólicos de aminoácidos. Dessa forma, o chumbo é capaz de produzir alterações na estrutura química de moléculas bioquímicas, modificando e destruindo sua função normal (LARINI, 1998).

As principais ações tóxicas do chumbo compreendem o sistema nervoso central, o hematopoiético, o renal, o gastrointestinal, o cardiovascular, o musculoesquelético e o reprodutor (BRASIL, 2006).

Os sintomas iniciais da exposição ocupacional ao chumbo são frequentemente leves e inespecíficos, envolvem o sistema nervoso, provocando fadiga, irritabilidade, distúrbios do sono, cefaléia e dificuldades de concentração. Em relação ao sistema gastrointestinal provoca cólicas abdominais, anorexia, náusea, constipação intestinal e diarreia. Quadros de exposição crônica manifestam-se por meio de nefropatia com gota e insuficiência renal crônica, bem como, encefalopatia com alterações cognitivas e de humor, e neuropatia periférica (BRASIL, 2006).

O chumbo também manifesta importante ação tóxica sobre a biossíntese do heme, interferindo em várias etapas da formação da hemoglobina, através da inibição das enzimas:  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D), hemessintetase e coproporfirinogênio-descarboxilase (LARINI, 1998).

Além disso, pode provocar déficit auditivo principalmente quando associado à exposição ocupacional ao ruído (JACOB et al., 2002; ALVARENGA et al., 2003), bem como palpitações, vertigens, perda de memória, alucinações, incoordenação motora, ataxia, palidez cutânea, entre outros (ALBIANO, 1999; DIAS, 2001).

#### 2.3.2.1.3 Monitorização biológica

A exposição ao chumbo pode ocorrer de forma intensa, moderada ou leve; em curto, médio ou longo prazo, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição no ambiente de trabalho (LARINI, 1998).

O controle biológico da exposição ao chumbo é realizado através da utilização de biomarcadores de exposição que forneçam informações quanto ao nível de absorção (chumbo sanguíneo e chumbo urinário) e quanto às alterações bioquímicas provocadas pelo chumbo na biossíntese do heme (LARINI, 1998).

A quantificação sanguínea de chumbo é considerada a avaliação padrão em casos de exposição ao chumbo (MANAHAM, 1992). No Brasil, o IBMP para o chumbo sanguíneo é de 60 µg/dL, apresentando valores de referência de 40 µg/dL, uma vez que o chumbo também pode ser encontrado em alimentos (BRASIL, 1994).

## 2.4 Estresse oxidativo e biomarcadores do estresse oxidativo

### 2.4.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um processo desencadeado pelo desequilíbrio gerado entre as espécies oxidantes e antioxidantes do organismo, decorrente da produção excessiva de agentes oxidantes e/ou depleção de antioxidantes (SIES, 1986; McGRATH et al., 1995; DESCAMPS-LATSCHA et al., 2001; MORENA et al., 2002).

### 2.4.2 Agentes oxidantes

Os agentes oxidantes são substâncias capazes de reagir rapidamente com diversos compostos e alvos celulares, provocando danos a proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (GILLHAM et al., 1997).

Os radicais livres (RLs) são agentes oxidantes caracterizados como espécies atômicas ou moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, tornando-as espécies altamente reativas que agem como eletrófilos (GILLHAM et al., 1997).

Dentre os oxidantes mais importantes envolvidos em processos patológicos estão as espécies reativas de oxigênio (EROS) e as de nitrogênio (ERNS). As principais EROS distribuem-se em dois grupos, as radicalares: superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) peroxila ( $ROO^{\bullet}$ ) e alcoxila ( $RO^{\bullet}$ ); e as não-radicalares: oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso. Dentre as ERNS incluem-se o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), o óxido nitroso e o peroxinitrito ( $HNOO^{\bullet}$ ), dentre outros. A maioria destes compostos apresenta tempo de meia-vida muito curto (GILLHAM et al., 1997; SIES, 1997).

Os oxidantes podem ser formados no organismo através de diversos processos. Durante a fosforilação oxidativa, mecanismo usado pelas células para produzir energia química (ATP), parte dos elétrons é transferida para o oxigênio, dando origem ao radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ) (JUNQUEIRA & RAMOS, 2005). Eles ainda podem ser produzidos durante a oxidação de ácidos graxos, reações do citocromo P-450 e de células fagocíticas, entre outros. Algumas enzimas também são capazes de gerar RLs, sob condições normais ou patológicas. Fontes exógenas como tabaco, radiações, luz ultravioleta, solventes e alguns fármacos, dentre outros, também geram RLs ou espécies reativas não radicalares (BIESALSKI, 2002).

Em condições fisiológicas normais, as EROS podem desempenhar importante papel fisiológico na regulação da resposta imunológica, participando do processo fagocítico de defesa contra infecções e atuando como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose (HALLIWELL, 1994; BIESALSKI, 2002). No entanto, o aumento na sua produção e/ou a redução de antioxidantes gera um desequilíbrio, caracterizando o estresse oxidativo (BEAL, 1995; FINKEL & HOLBROOK, 2000; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000; JUNQUEIRA & RAMOS,

2005), que provoca danos em muitos constituintes celulares, como lipídios insaturados, proteínas e DNA (FINDLAY et al., 2005).

### 2.4.3 Peroxidação lipídica

O ataque de espécies reativas aos lipídios das membranas desencadeia um processo chamado peroxidação lipídica (URSO & CLARKSON, 2003), que origina vários produtos secundários. Estes produtos são principalmente aldeídos, com capacidade para aumentar o dano oxidativo (UCHIDA, 2000).

O malondialdeído (MDA) é um dos mais conhecidos produtos secundários da peroxidação lipídica, resultante da exposição de membranas biológicas a radicais livres, podendo ser utilizado como indicador da injúria de membranas celulares. A quantificação de MDA em biomateriais é amplamente utilizada como biomarcador do estresse oxidativo (ESTERBAUER et al., 1991).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas são apresentadas na Figura 9, onde L representa o lipídio.

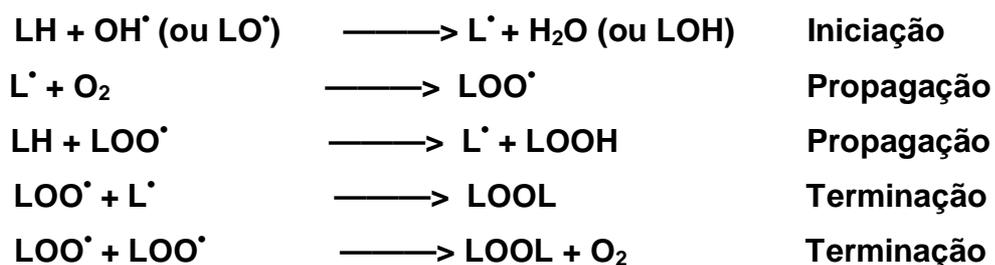


Figura 9 - Etapas do processo de peroxidação lipídica.

A reação acima se inicia com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo  $OH^\bullet$  ou pelo  $LO^\bullet$  (radical alcóxila), com conseqüente formação do  $L^\bullet$  (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o  $L^\bullet$  reage rapidamente com o  $O_2$ , resultando em  $LOO^\bullet$  (radical peróxila), que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo

poliinsaturado, formando novamente o  $L^\bullet$  na segunda equação de propagação. O término da peroxidação lipídica ocorre quando os radicais ( $L^\bullet$  e  $LOO^\bullet$ ) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até se destruírem (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O tempo de vida longo e a alta reatividade permitem a estas moléculas agirem tanto dentro, quanto fora das células, interagindo com outras biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas, frequentemente levando a danos irreversíveis sobre o delicado mecanismo de funcionamento da célula (DEL RIO, 2005). O contínuo dano oxidativo leva a destruição de membranas, ricas em ácidos graxos poliinsaturados, contribuindo para a diminuição da sua fluidez e para a injúria celular (HERSHKO, 1989). Ocorre perda da seletividade na troca iônica, inativação de enzimas e proteínas de transporte da membrana e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos. Adicionalmente, a oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo destes lipídios, com consequente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (BARREIROS, 2006).

Apesar disto, como na formação de RLs e espécies reativas, a peroxidação lipídica pode ser um processo fisiológico nem sempre prejudicial, capaz de induzir a morte célula, uma vez que participa da resposta inflamatória liberando ácido araquidônico e, subsequentemente, prostaglandinas e distintos endoperóxidos (JAMIESON, 1989). Todavia, a excessiva liberação destes produtos durante o dano oxidativo pode causar edema celular, modificações na permeabilidade vascular, quimiotaxia e danos teciduais (BLAKE et al., 1987), implicando, por exemplo, na patogênese da aterosclerose (VAGIMIGLI et al., 2003).

#### 2.4.4 Oxidação de proteínas

O alvo celular primário do estresse oxidativo pode variar dependendo do tipo celular, dos níveis absolutos de oxidantes produzidos, das espécies de EROS geradas, do sítio de geração (intra ou extracelular) e da proximidade do oxidante à estrutura celular. A extensão do dano também dependerá de múltiplos fatores.

As proteínas são um dos principais alvos celulares dos EROS e de produtos do estresse oxidativo, por constituírem importantes componentes de muitos sistemas biológicos e por combaterem de 50 a 75% de EROS como a  $\text{OH}^\bullet$  (DAVIES, 1999), sendo também modificadas por um vasto número de reações envolvendo EROS (NYSTRÖM, 2005). Algumas modificações protéicas provocadas por agentes oxidantes podem ou não provocar perda funcional e alterações estruturais em proteínas, originando oxidação reversível ou irreversível, respectivamente (LEVINE et al., 2000; DALLE-DONE et al., 2005).

#### 2.4.4.1 Inibição da $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D)

A ALA-D é uma metaloenzima ligada ao zinco, que tem atividade ligada aos grupamentos tiólicos da sua estrutura (FUKUDA et al., 1998). É uma enzima essencial em muitos organismos, como componente da rota de biossíntese do heme, catalisando a condensação de duas moléculas de ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (Figura 9). Assim, por participar na biossíntese de moléculas tetrapirrólicas, tem ação na constituição de grupos prostéticos de importantes proteínas fisiológicas como a hemoglobina e citocromos (SASSA, 1998).

A ALA-D é sugerida como um biomarcador de estresse oxidativo, uma vez que sua atividade é altamente sensível a presença de elementos pró-oxidantes, os quais podem oxidar seus grupamentos  $-\text{SH}$  (BOLZAN et al., 2002; SOARES et al., 2002), levando a uma atividade enzimática reduzida (ROCHA et al., 2004).

A inibição da ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em consequências patológicas, tais como anemia (GOERING, 1993). Além da redução na síntese do heme, a inibição desta enzima pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com consequente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA pode estar relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (PEREIRA et al., 1992; BECHARA et al., 1993), decorrentes dos efeitos pró-oxidantes desenvolvidos pelo substrato (PEREIRA et al., 1992).

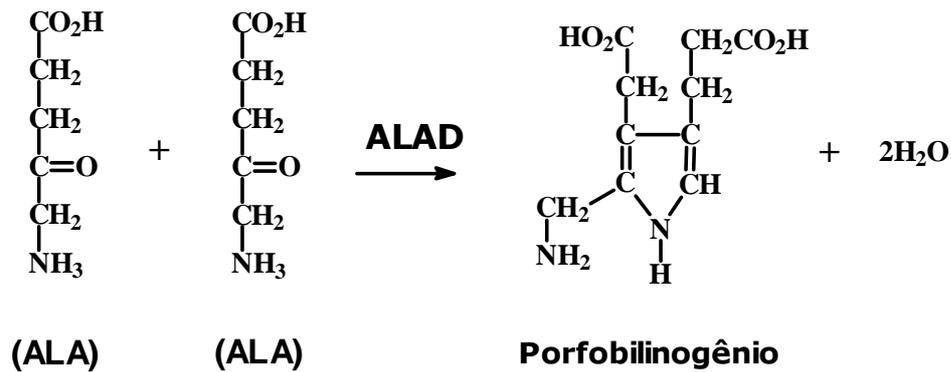


Figura 10 - Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase, formando o porfobilinogênio (PBG).

Em patologias humanas, tais como câncer (GONÇALVES et al., 2005), diabetes (FERNANDEZ-CUARTERO et al., 1999) e insuficiência renal crônica (FONTANELLAS et al., 2002) são relatadas diminuições de atividade da ALA-D, ao mesmo tempo em que ocorrem danos oxidativos.

#### 2.4.5 Antioxidantes

Para se proteger dos danos causados pelo estresse oxidativo, o organismo dispõe de um elaborado sistema de defesa antioxidante constituído por enzimas como catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase, e numerosos antioxidantes não enzimáticos endógenos como a glutatona reduzida (GSH) e ubiquinona e micronutrientes como as vitaminas A, C, E, carotenóides e flavonóides (MAYNE, 2003; URSO & CLARKSON, 2003). Tais moléculas e proteínas são responsáveis por manter a homeostase entre a formação e a degradação de EROs, restaurando o balanço redox (FINDLAY et al., 2005).

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de diminuir ou inibir a oxidação, mesmo presente em baixas concentrações em relação a seu substrato. Desta forma, estes compostos têm como função proteger os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Isto implica que, os diferentes

antioxidantes podem atuar em níveis e com modos de ação distintos (CAMPOS, 2005)

Frente à ação potencialmente lesiva das substâncias oxidantes, torna-se vital um delicado controle de sua produção e consumo dentro das células, ou seja, um fino balanceamento de sua concentração intra e extracelular. O que é possível graças à atividade dos antioxidantes que, removendo as substâncias reativas, as mantém em baixas concentrações (REILLY et al., 1991).

O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, varredura das EROS, sequestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres, aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo. Ainda conforme a ação sobre os radicais livres, o antioxidante pode ser denominado de “*scavenger*”, quando age transformando um radical livre em outro menos reativo, ou “*quencher*”, quando consegue neutralizar completamente o radical livre através da absorção de toda a energia de excitação (BELLÓ, 2002).

As espécies reativas podem ser inativadas por sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos presentes na circulação sanguínea ou no interior das células. A superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) são enzimas antioxidantes intracelulares, as vitaminas C (ácido ascórbico) e E ( $\alpha$ -tocoferol), glutathione reduzida (GSH) e albumina são antioxidantes não enzimáticos. (NAKAZAWA et al., 1996).

#### 2.4.5.1 Sistema enzimático

O sistema enzimático é a primeira linha de defesa antioxidante do organismo, evitando o acúmulo do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio. É formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (BELLÓ, 2002).

Na Figura 11, etapa A, é possível observar que a SOD age transformando ânions superóxido em peróxido de hidrogênio, a qual é uma reação normal em pH fisiológico, porém muito acelerada na presença dessa enzima. A superóxido dismutase pode ocorrer de três formas, dependendo do metal associado à mesma:

cobre (Cu) e zinco (Zn) no citoplasma dos eucariontes, manganês (Mn) na matriz mitocondrial e ferro (Fe) em bactérias (GILLHAM et al., 1997, SIES, 1997).

Outro antioxidante enzimático é a catalase, a qual possui a capacidade de transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Figura 11, etapa B). Sua localização está nos peroxissomas, tendo por isto ação diminuída em órgãos como o coração, pulmão e o cérebro que possuem poucos peroxissomas. Nestes órgãos a ação antioxidante por esta enzima ocorre quando os radicais livres atingem a corrente sanguínea, através da catalase eritrocitária (GILLHAM et al., 1997, SIES, 1997).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) também pode ser desintoxicado pela glutathiona peroxidase (GPx) (Figura 11, etapa C), localizada no citoplasma e na matriz mitocondrial. Sua ação ocorre através da redução do  $H_2O_2$  e de hidropeptídeos orgânicos através da utilização da glutathiona reduzida (GSH). A GPx ocorre em sua maioria associada ao selênio (Se), e seus principais locais de ação são fígado e eritrócitos, podendo ocorrer também no coração, pulmões e músculos (GILLHAM et al., 1997, SIES, 1997). Desta forma, o sistema antioxidante enzimático diminui a formação de radicais hidroxila e, conseqüentemente a peroxidação lipídica (Figura 11; etapa D).

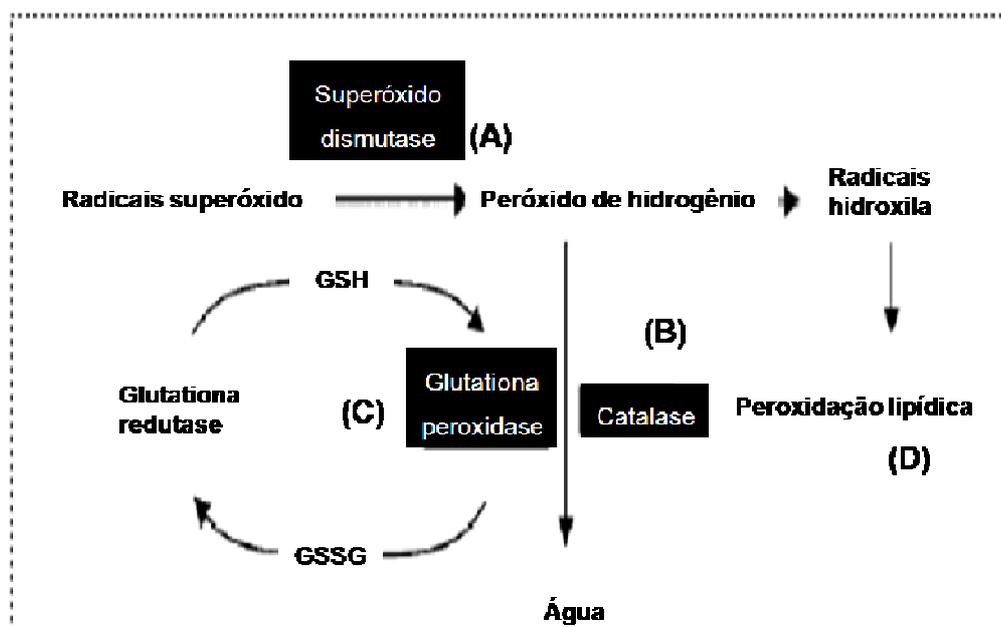


Figura 11 - Sistema antioxidante enzimático (Adaptado de SIES et al., 1972).

#### 2.4.5.2 Sistema não-enzimático

O sistema antioxidante não-enzimático é formado por antioxidantes hidrofílicos (GSH, vitamina C, indóis e catecóis) e lipofílicos (bioflavonas, vitamina E, carotenóides) (MAYNE, 2003; URSO & CLARKSON, 2003).

A glutathiona é um tripeptídeo, L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina, classificado como o principal tiol não-protéico intracelular livre, encontrado em vários tecidos biológicos, é também, o principal antioxidante endógeno (NOZAL et al., 1997), sendo considerada um antioxidante multifatorial (CECCONI et al., 1988). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente em sua molécula. Dentre outras funções fisiológicas, a GSH é seqüestradora de radicais livres (NOZAL et al., 1997), detoxificando metabólitos eletrofílicos, não somente como doador imediato de elétrons para neutralizar o  $H_2O_2$  e lipoperóxidos, mas também como um seqüestrador de RLs de oxigênio e nitrogênio (LECHTWEIS & JI, 2001).

No sangue, 99,5% da glutathiona se encontra no interior dos eritrócitos e uma pequena quantidade está associada às membranas destes (MILLS & LANG, 1996). Embora presente em várias formas: reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e ligada às proteínas (PSSG), a GSH é a forma mais abundante (NOZAL et al., 1997).

O núcleo do resíduo cistenilglicina da glutathiona está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical  $GS^{\bullet}$ , que produz, por dimerização, o GSSG (glutathiona oxidada). A redução de  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos a seus álcoois correspondentes com a conversão de GSH em GSSG é catalisada pela enzima GPx dependendo essencialmente da presença de selênio. A GSSG é, então, reduzida pela GR, regenerando a GSH, num processo à custa de NADPH (SHAN et al., 1990; JORDÃO JR et al., 1998). A Figura 12 apresenta o sistema glutathiona e a interconversão nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e o papel das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR).

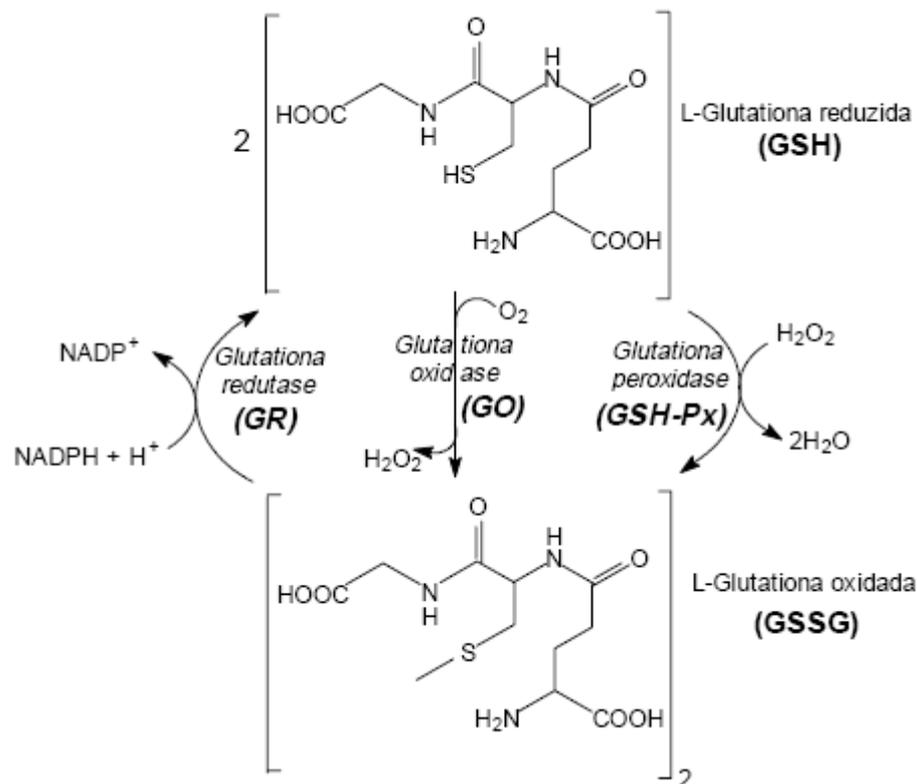


Figura 12 - Interconversão da glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) (Adaptado ROVER JR et al., 2001).

## 2.5 Relação entre a exposição ocupacional a tintas e o estresse oxidativo

Alguns constituintes das tintas, como os solventes orgânicos e metais pesados como o chumbo, vêm sendo apontados como causadores de injúria tecidual em diferentes órgãos devido ao aumento da produção de radicais livres e/ou espécies reativas (GROMADZINSKA & WASOWICZ, 2003; COSTA et al., 2005; PRASANTHI et al., 2009; RADWAN et al., 2009).

A toxicidade de vários xenobióticos parece estar associada a sua biotransformação, realizada pelo sistema enzimático citocromo P-450. A metabolização de solventes orgânicos como o tolueno, xileno, estireno e etilbenzeno, entre outros, ocorre principalmente através da ativação do CYP 2E1, produzindo epóxidos e espécies altamente reativas (PERSSON et al., 1990; GATÉ et al., 1999), substâncias sugeridas como principais responsáveis por alterações em

sistemas antioxidantes, dano lipídico, protéico e de DNA (SAWICKA & DLUGOSZ, 2008).

O tolueno, por exemplo, é biotransformado principalmente em ácido benzóico e outros metabólitos como o benzaldeído, além disso, uma pequena quantidade do solvente é metabolizada a compostos fenólicos e epóxidos intermediários altamente reativos e prejudiciais às células e tecidos do organismo (MATTIA et al., 1993; TABATABAIE & FLOYD, 1996). De acordo com Tabatabaie & Floyd (1996) o benzaldeído também está envolvido no desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, uma vez que este metabólito é responsável pela inativação da glutathione peroxidase (GPx), principal enzima envolvida na remoção do peróxido de hidrogênio.

Em estudo realizado por Coskun et al. (2005) em ratos *Wistar* expostos ao tolueno, os resultados encontrados foram aumento significativo dos níveis de MDA, e diminuição da atividade das enzimas SOD e GPx, além de um aumento na atividade da enzima catalase, evidenciando um desequilíbrio nas defesas antioxidantes do organismo.

Al-Ghamdi et al. (2003) também demonstrou aumento da peroxidação lipídica após exposição aguda aos solventes orgânicos xileno e tolueno, sugerindo que o estresse oxidativo gerado pela biotransformação dos mesmos pelo CYP2E1 foi suficiente para provocar necrose e morte em células renais.

Estudo preliminar realizado em um grupo de pintores expostos a uma complexa mistura de solventes (estireno, etileno glicol, tolueno, p-xileno) demonstrou aumento na concentração dos dois principais produtos da peroxidação lipídica: malondialdeído e 4-hidroxinonenal (MDA e 4-HNE) em comparação com valores encontrados para o grupo controle (DLUGOSZ & SAWICKA, 1998). O aumento da peroxidação lipídica também foi observado no tecido pulmonar de ratos expostos à mistura de solventes em altas concentrações (ILGAZLI et al., 2004). O mesmo estudo também evidenciou aumento nos níveis de GSH após a sexta semana de exposição, sugerido como uma tentativa de compensação dos danos teciduais causados pelos produtos da lipoperoxidação (ILGAZLI et al., 2004).

Trabalhadores expostos cronicamente a solventes orgânicos demonstraram aumento significativo nos níveis de MDA quando comparado com o grupo controle. O aumento da peroxidação lipídica foi acompanhado pelo aumento das enzimas SOD e GPx, sugerindo um mecanismo compensatório desenvolvido pelos

trabalhadores expostos (HALIFEOGLU et al., 2000). Estudos preliminares, com um grupo de 22 trabalhadores expostos ao estireno e outras misturas presentes em tintas, demonstraram concentrações significativamente elevadas de MDA em comparação com o grupo controle (DLUGOSZ et al., 2005). Em outro estudo recente, foram avaliados os níveis de MDA plasmático, SOD eritrocitária e a capacidade antioxidante total (GSH e GPx) em vinte pintores. Os resultados demonstraram níveis aumentados de MDA e SOD nos pintores, quando comparados ao grupo não exposto e diminuição da capacidade antioxidante total (BAYIL et al., 2007).

Estudo envolvendo ratos expostos à mistura de solventes orgânicos evidenciou aumento da peroxidação lipídica, acompanhada pela diminuição dos antioxidantes GSH e SOD a partir da terceira semana de inalação, sugerido como resultado da ação oxidante dos solventes sobre os mecanismos de defesa antioxidante do organismo (ULAKOGLU et al., 1998). Os mesmos achados foram relatados por DILLIOGLUGIL et al. (2005), em estudo desenvolvido em ratos expostos a altas concentrações de solventes, com objetivo de verificar alterações oxidativas em tecido pulmonar.

Martínez-Alfaro et al. (2006) também encontrou depleção nos níveis de GSH, acompanhado pelo aumento do biomarcador lipídico, MDA, e concomitante dano de DNA. Estudo *in vitro* também evidenciou dano de DNA, acompanhado por depleção dos níveis de GSH e enzimas antioxidantes; além de dano oxidativo em macromoléculas, mesmo em condições ambientais aceitáveis de exposição para vários solventes orgânicos (COSTA et al., 2005).

Da mesma forma que os solventes orgânicos, o chumbo (Pb), outro xenobiótico presente na constituição das tintas, também está intimamente envolvido no mecanismo de estresse oxidativo. Estudos têm demonstrado que esta ligação é decorrente da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) pelo metal, o que provoca redução no sistema de defesa antioxidante do organismo mediado pela glutathiona reduzida; inibe enzimas sulfidril-dependentes; interfere no mecanismo antioxidante enzimático do organismo; e modifica a suscetibilidade das células ao ataque oxidativo, através da alteração da integridade da membrana celular (GURER & ERCAL, 2000).

Vários estudos têm demonstrado o envolvimento do chumbo no processo de peroxidação lipídica e diminuição da capacidade antioxidante intrínseca em

diferentes tecidos de animais expostos (SOMASHEKARAIH et al., 1992; YIIN & LIN, 1995; SANDHIR & GIL, 1995). Adanaylo & Oteiza (1999) também evidenciaram alteração no sistema de defesa antioxidante de ratos expostos ao chumbo.

Outra forte ligação entre o chumbo e o processo de estresse oxidativo é decorrente da inibição da enzima ALA-D pelo metal. O chumbo é normalmente encontrado em ligação com moléculas e enzimas que apresentam grupamentos tiólicos na sua estrutura, como a enzima  $\delta$  aminolevulinato desidratase (ROCHA et al., 1995). A inibição dessa enzima provoca acúmulo do ácido  $\delta$  aminolevulínico, que contribui para o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (PEREIRA et al., 1992). Embora existam várias evidências sobre o envolvimento do chumbo no processo de desequilíbrio oxidativo, o mecanismo de toxicidade pelo qual o metal induz estresse oxidativo, ainda não está completamente esclarecido (GURER & ERCAL, 2000).

Desta forma, estudos que abordem exposição ocupacional ao chumbo e aos solventes orgânicos são importantes, uma vez que exposições crônicas podem resultar em danos permanentes ou muitas vezes fatais; além disso, podem proporcionar maior esclarecimento sobre os possíveis mecanismos de toxicidade destes xenobióticos. Entretanto, existem poucos relatos na literatura abordando exposições aos constituintes das tintas e os biomarcadores do estresse oxidativo, principalmente correlacionando-se com a atividade da ALA-D, importante enzima utilizada como biomarcador do estresse oxidativo. Além disso, estudos com foco voltado para casos de co-exposição, e baixos níveis de exposição à xenobióticos também são escassos na literatura.

Assim, devido aos poucos trabalhos encontrados e alguns contraditórios, estudos que contribuam para o melhor entendimento do possível envolvimento da exposição ocupacional aos xenobióticos presentes em tintas e o estresse oxidativo são importantes para um melhor esclarecimento dos efeitos toxicológicos destas substâncias químicas dentro da toxicologia ocupacional.

### **3 RESULTADOS**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, que se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados, Conclusão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. A apresentação do manuscrito está baseada na versão submetida à revista *Science of the Total Environment*.

### 3.1 Manuscrito

#### **Effects of low levels exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers**

Manuscrito submetido à Revista *Science of the Total Environment*.

## **Effects of low levels exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers**

Angela M. Moro<sup>a,b</sup>, Mariele Charão<sup>a,b</sup>, Natália Brücker<sup>b,c</sup>, Rachel Bulcão<sup>b,c</sup>, Fernando de Freitas<sup>b,c</sup>, Gilian Guerreiro<sup>b</sup>, Marília Baierle<sup>b</sup>, Sabrina Nascimento<sup>b</sup>, Fernanda Waechter<sup>b</sup>, Vânia Hirakata<sup>d</sup>, Rafael Linden<sup>e</sup>, Flávia Valladão Thiesen<sup>f</sup>, Solange Cristina Garcia<sup>\*b</sup>

<sup>a</sup>Post-graduate Program on Pharmacology, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>b</sup>Laboratory of Toxicology, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Post-graduate Program on Pharmacy Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup>Institute of Cardiology, University Cardiology Foundation, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>e</sup>Health Sciences Institute, Pharmaceutical Sciences, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

<sup>f</sup>Toxicology Institute, Pharmacy Faculty, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

\*Direct correspondence to Prof Dr Solange Cristina Garcia.

E-mail address: 00184060@ufrgs.br (S. C. Garcia).

Address: Avenida Ipiranga 2752, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brazil.

CEP.: 90610-000 Tel.: (+55) 3308-5297. Fax: (+55) 51 3308-5437

**Abstract**

Paints are composed of an extensive variety of hazardous substances like organic solvents and heavy metals. Biomonitoring is an essential tool for assessing risk to occupational health. Thus, this study analyzed biomarkers of exposure to toluene, xylene, styrene, ethylbenzene and lead and the oxidative stress biomarkers alterations in exposed workers of an industry. Lipid peroxidation biomarker (MDA),  $\delta$ -aminolevulinatase dehydratase (ALA-D), reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase and catalase were analyzed in exposed and non-exposed subjects. It was estimated which of the paints constituents play the greatest influence on changes in biomarkers of oxidative stress, in this case of co-exposure. Results demonstrated that despite all exposure biomarkers were below the biological exposure limits, MDA levels and antioxidant enzyme activities were increased, while GSH and ALA-D levels were decreased in painters when compared with non-exposed subjects. Statistical analysis revealed that toluene could be suggested as the principal responsible for the increased lipid peroxidation and inhibition of ALA-D enzyme; however more studies on the inhibition of ALA-D enzyme by toluene are necessary.

**Key-words:** paint, co-exposure, xenobiotics, occupational exposure, oxidative stress.

## 1. Introduction

The work environment usually contains a large number of chemicals, which may be inhaled and absorbed by the body. Painters are exposed to an extensive variety of hazardous substances like organic solvents, lead-containing pigments and residual plastic monomers (IARC, 1989). In fact, about 50% of the synthesized solvents are employed for the production of paints and thinners, where the specific role of the solvent is to evaporate after having solubilized and diluted the paints which, moreover, are often applied by spray (Costa et al., 2005). Xylene, toluene, styrene, ethylbenzene, acetone and methyl-ethylketone are some of the most frequently and quantitatively represented solvents in the composition of paints. Their toxicity is being studied from decades, but the interest for the toxic effects on oxidative damage is more recent (Costa et al., 2005).

Several studies have implicated oxidative stress as one of the important mechanisms of toxic effects of organic solvents and heavy metals such as lead (Costa et al., 2005; Prasanthi et al., 2009; Radwan et al., 2009). The toxicity of some xenobiotics appears to be related to their biotransformation, resulting especially in reactive oxygen species (ROS) in biological systems, inducing cell damage (Cuypers et al., 1999; Halliwell and Gutteridge, 1986; Mattia et al., 1993; Pinto et al., 2003). Under normal physiological conditions the ROS can play an important role, regulating the immune response, participating in the phagocytic process of defense against infections and inducing apoptosis (Biesalski, 2002). However, the increase in its production and / or reduction of organism antioxidants originates an imbalance, causing damage to many cellular constituents, such as unsaturated lipids, proteins and DNA (Finkel and Holbrook, 2000; Gutteridge and Halliwell, 2000). The reactive

species, such as superoxide anion, ferryl ion and the hydroxyl ion, are believed to initiate this process (Halliwell and Gutteridge, 1986).

Previous studies have shown that occupational exposure to high concentrations of solvents induces lipid peroxidation and decreases endogenous antioxidants, such as reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) (Coskun et al., 2005; Georgieva et al., 2002; Ilgazli et al., 2004). Similarly to organic solvents, Pb, another constituent of paints and an environmental pollutant, is involved in the mechanism of oxidative stress, since it is commonly found in cells attached to thiol-containing molecules and the inhibition of the sulfhydryl-containing enzyme  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) (Rocha et al., 1995). This inhibition leads to accumulation of  $\delta$ -aminolevulinic acid, which undergoes a process of autoxidation generating reactive oxygen species (Hermes-Lima et al., 1991). Also reduced glutathione concentration, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities are the most common antioxidant enzymes and molecules that have been used to evaluate lead induced oxidative damage (Pande and Flora, 2002; Solliway et al., 1996).

Biological monitoring (BM) or biomonitoring is a fundamental tool in occupational health risk assessment and occupational health practice, since it deals with the assessment of individual human exposure, effects and susceptibility to occupational risk factors (Manno et al., 2009).

It is known that the increase of oxidative stress plays an important role in the development of diseases. For this reason, studies integrating biomarkers of occupational exposure and biomarkers of oxidative stress may help in the risk assessment for occupational diseases, especially in cases of co-exposure to different xenobiotics.

Although there are numerous evidences that occupational exposure to constituents of paints is closely related to imbalance between oxidants and antioxidants, it is unclear which of these xenobiotics present in the environment of work is the most influential on the biomarkers of oxidative stress, in cases of occupational co-exposure at low concentrations, as well as the mechanisms which can be triggered by the human body.

In this line, the objective of this study was to investigate the effects of some constituents of paints on exposed workers. For this purpose, we quantified biomarkers of exposure to toluene, xylene, styrene, ethylbenzene and lead, and evaluated the oxidative damage through antioxidants and biomarkers of oxidation levels. Moreover, through the exposure biomarkers of xenobiotics constituents of paints, we tried to check, statistically, which of the xenobiotics play the greatest influence on the changes in oxidative stress biomarkers.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Ethics*

The study was approved by the committee of ethics in research of the Federal University of Santa Maria – RS. All participating volunteers were asked to provide written consent after receiving an explanation of the study. The consent forms were prepared in conformance with the Declaration of Helsinki (World Medical Association 1964) and local legislation.

## 2.2. Subjects

Forty-eight volunteer men, painters from an industry of Rio Grande do Sul, Brazil, aged 18-50 were enrolled in this study. This group of workers was exposed to a complex mixture of hydrocarbons, ketones and heavy metals. The control group consisted of thirty non-occupational exposed men, aged 19-55. All subjects completed an investigator-administered questionnaire to assess general health, lifestyle, and years of employment, smoking and alcohol drinking habits and use of medication.

## 2.3. Biological samples

Urine samples were collected in the end of shift for solvents metabolites and creatinine determination. Venous blood samples from all subjects were collected with anticoagulant EDTA for toluene, Pb, malondialdehyde (MDA) and GSH measurements; and heparin for  $\delta$ -aminolevulinatase (ALA-D), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymatic activities; and stored on ice. The first vacutainer tube containing whole blood with EDTA was used for toluene and lead quantification. After collection the tubes were immediately sealed and kept at -80°C to avoid losses, since toluene is highly volatile. Another EDTA vacutainer tube was immediately centrifuged at 1500 g for 10 min at 4°C, the plasma was used to determine MDA and the erythrocytes (RBC) were used for GSH quantification. The whole blood with heparin (1.0 ml) was stored in eppendorf tubes and kept at -20°C until antioxidant enzymes (SOD and CAT) analysis. The remainder of whole blood

with heparin was maintained in vacutainer tubes and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase enzyme analysis.

#### 2.4. Toluene, xylene, styrene and ethylbenzene metabolites levels

The urinary metabolites levels were analyzed by an Agilent® HPLC-UV, in a simultaneous determination of hippuric acid (metabolite of toluene), methylhippuric acid (metabolite of xylene), phenylglyoxylic acid and mandelic acid (metabolites of styrene and ethylbenzene), by a method optimized and validated in our laboratory (Bulcão et al., 2008).

Urinary *ortho*-cresol (*o*-C), another toluene metabolite was also quantified. To *o*-cresol determination, 1 mL urine sample was hydrolyzed with concentrated hydrochloric acid and placed in boiling water bath for 40 min. After cooling and adding 100  $\mu\text{L}$  of nitrobenzene  $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (internal standard), the sample pH was adjusted with the addition of 85  $\mu\text{L}$  of NaOH 50%. After vortexing (10 s), 0.2 g of NaCl was added, to salting-out effect. An aliquot of 1000  $\mu\text{L}$  of the resulting mixture was transferred to a 10 mL headspace vial and extracted by solid-phase microextraction (SPME). The sample was pre-incubated at  $60^{\circ}\text{C}$  for 2 min and then extracted, using a polyacrylate fiber (85  $\mu\text{m}$ ), for 5 min at the same temperature, at a mixing velocity of 500 rpm. The analytes were desorbed at  $250^{\circ}\text{C}$  for 3 min. The gas-chromatographic separation was performed in a OV-1 column (30 m, 0.32 mm, 1  $\mu\text{m}$ ), with carrier gas (Helium) flow rate of 4 mL/min. The initial oven temperature was  $70^{\circ}\text{C}$ , maintained for 3 min, and then increased at  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  until  $100^{\circ}\text{C}$ , which was maintained for 6 minutes. Total run time was 10.5 min. Detection was made by a

flame ionization detector (FID), kept at 250 °C. Retention times were 7.5 and 9.5 min for *o*-C and internal standard (IS), respectively.

### *2.5. Creatinine concentration*

It was measured by colorimetric method, according to modified Jaffé, using commercial laboratory kits Labtest®.

### *2.6. Blood toluene levels*

To a 10 mL headspace vial, 1 mL blood sample was added together with 4 mL of NaCl 25% and 100  $\mu$ L of nitrobenzene 20  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (internal standard, IS). After vortexing (10 s), 0.2 g of NaCl was added, to salting-out effect. Toluene and IS were extracted by solid-phase microextraction (SPME). The samples were extracted using a Carboxen/PDMS fiber for 10 min at 50°C, at a mixing velocity of 250 rpm. The analytes were desorbed at 250°C for 3 min. The gas-chromatographic separation was performed in a OV-1 column (30 m, 0.32 mm, 1  $\mu$ m), with carrier gas (helium) flow rate of 4 mL/min. The initial oven temperature was 100 °C, maintained for 2 min, and then increased at 15°C/min until 180°C, which was maintained for 0.7 min. Total run time was 8 min. Detection was made by a flame ionization detector (FID), kept at 250 °C. Retention times were 2 and 4.6 min for toluene and IS, respectively.

### *2.7. Blood lead levels*

To quantify blood lead, the samples were diluted 1:10 with a dilution solution containing Triton X-100 0.1% and HNO<sub>3</sub> 1% in Milli-Q water. Lead was analyzed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), using a pyrolytic graphite furnace coated with a permanent matrix modifier composed of Tungsten, Rhodium and Ammonium hydrogen phosphate. Injection volume was 20 µL of diluted sample. The temperature program is presented in Table 1.

### *2.8. Plasmatic MDA levels*

Lipid peroxidation was assessed by measuring the plasmatic MDA levels using a Knauer® HPLC/VIS. The plasma underwent alkaline hydrolysis, acid deproteinization, derivatization with TBA and *n*-butanol extraction, this method was developed in our laboratory (Grotto et al., 2007).

### *2.9. Erythrocyte reduced glutathione levels*

GSH levels were determined by spectrophotometer, as described by Elmann (1959). After hemolysis, erythrocytes underwent a deproteinization and centrifugation process. The supernatant was derivatized with 5,5'-dithio-bis(2- nitrobenzoic acid) (DTNB). The GSH content was expressed in µmol.ml<sup>-1</sup> of erythrocyte.

### *2.10. δ-Aminolevulinate dehydratase activity*

The δ-aminolevulinate dehydratase activity was assayed in the total blood by spectrophotometer as described by Sassa (1982), with minor modifications by

measuring the rate of phorphobilinogen (PBG) formation, during 1h at 37°C, in the absence of the reducing agent dithiothreitol (DTT).

### 2.11. Antioxidant enzymes

Superoxide dismutase activity was measured kinetically as described by McCord and Fridovich (1969), based on its ability to inhibit the autoxidation of adrenaline to adrenochrome at an alkaline pH. Catalase activity was determined spectrophotometrically, using hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as substrate. The principle of the assay is based on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition rate at 240 nm (Aebi, 1984).

### 2.12. Statistical analysis

The analysis of the data was performed using software SPSS 10.05 for windows. *Student's t test* was used to compare means between the groups with normal distribution. Correlation tests were performed using *Pearson's* correlation coefficient for variables that had normal distribution. Associations between all predictor continuous and categorized variables were investigated using multiple linear regression analyses. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. All results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## 3. Results

The data obtained through the questionnaire about characteristics of groups studied are presented in Table 2.

The urinary metabolites levels of organic solvents are summarized in Table 3. It should be noted that only hippuric acid (HA) was found in the urine of non-exposed subjects because benzoic acid, a food preservative, is biotransformed in to this metabolite. HA concentration was higher in the painters group; however it was still below reference values and also below the BEL (Biological Exposure Limit). No significant differences were observed between the groups. Non-exposed group did not show measurable levels of the following urinary metabolites: methylhippuric acid (mHA), mandelic acid (MA), phenylglyoxylic acid (PGA) and *o*-cresol. The levels of urinary *o*-cresol in exposed group were very low, being that 17 painters (35%) presented this toluene metabolite, and all were lower than the BEL. Concerning the exposure to the other solvents, 87.5% of exposed workers presented the metabolite from xylene (methylhippuric acid), 67% presented the metabolite from styrene and ethylbenzene (mandelic acid) and 15% presented the metabolite from styrene (phenylglyoxylic acid) exposure. All the levels found were below the allowed maximum levels, established by Brazilian legislation, which are similar to the Biological Exposure Limit (BEL).

The blood toluene level found in the exposed group was in average  $0.07 \text{ mg.L}^{-1}$ . The non-exposed group did not present measurable blood toluene levels. In painters it was found blood lead levels below the BEL (data not shown) while in the non-exposed group lead levels were below of  $2 \text{ }\mu\text{g.dL}^{-1}$ .

The oxidative stress was evaluated through MDA and GSH levels and ALA-D, SOD and CAT activities. The biomarker of lipid peroxidation was significantly

increased comparing the exposed workers with the non-exposed group, being plasma MDA levels  $9.81 \pm 0.29$  vs.  $5.40 \pm 0.21$   $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ), respectively.

Moreover, concentrations of reduced glutathione (GSH) and ALA-D activity showed significant difference between the groups (Figure 1). Painters demonstrated decreased values of GSH and ALA-D activity in relation to the non-exposed group.

The superoxide dismutase and catalase enzymatic activities were significantly increased in painters compared with the non-exposed group, being SOD activity  $1.24 \pm 0.07$  vs.  $1.00 \pm 0.04$   $\text{U.g}^{-1}$  Hb ( $p < 0.05$ ) and CAT activity  $60.80 \pm 2.47$  vs.  $47.55 \pm 3.04$   $\text{K.g}^{-1}$  Hb ( $p < 0.001$ ), respectively.

Correlations between antioxidants and oxidative damage biomarkers are presented in Table 4. It was possible to observe increase of plasma MDA levels with decrease of GSH concentrations and ALA-D activity. These correlations were accompanied by increase of CAT enzymatic activity.

Linear regression analyses also revealed highly significant correlations between oxidative stress biomarkers, urinary and blood biomarkers of exposure. A strong correlation was found between plasmatic lipid peroxidation biomarker levels and blood toluene levels ( $r = 0.682$ ;  $p < 0.001$ ) (Figure 2). Malondialdehyde levels also correlated with blood Pb levels and urinary biomarkers of exposure mHA and *ortho*-cresol (Table 5). No correlation between levels of urinary HA and plasmatic MDA levels was observed. Since lipid peroxidation showed to be associated with these independent variables, a multiple regression analysis was performed. This analysis showed that about 48% ( $R^2 = 0.480$ ) of increased MDA was associated with urinary and blood biomarkers of exposure. Among the independent variables analyzed in this model, blood toluene showed the greatest influence on increased MDA levels ( $\beta = 0.442$ ;  $p < 0.001$ ).

In relation to ALA-D, inverse correlation with blood toluene levels ( $r = -0.582$ ;  $p < 0.001$ ; Figure 3) was observed. ALA-D also correlated with blood Pb levels and urinary toluene, xylene and styrene and ethylbenzene metabolites (Table 5). According to multiple linear regression analysis, 36% ( $R^2 = 0.360$ ) of ALA-D enzymatic activity was associated with these exposure biomarkers. Among them, blood toluene levels were the most influential on the inhibition of D-ALAD enzyme ( $\beta = -0.471$ ;  $p < 0.001$ ).

Correlations were found between GSH levels and different biomarkers of exposure ( $p < 0.01$ ). It was possible to observe decrease of reduced glutathione with increase of urinary styrene and ethylbenzene biomarkers of exposure concentration (MA) and blood toluene and Pb levels. According to multiple linear regression analysis, these biomarkers of exposure were responsible by reduced GSH levels in about 18% ( $R^2 = 0.179$ ). However, when we adjust the variables by the others, no one remained within the model. The results are shown in Table 6.

The antioxidant enzyme catalase showed a positive correlation with blood toluene levels ( $r = 0.270$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 4).

#### **4. Discussion**

Biomonitoring (BM) is mainly aimed at (i) defining the existence of an occupational exposure; (ii) quantifying the dose (internal, effective or cumulated); (iii) verifying that exposure limits are respected (Manini et al., 2007). On the other hand, a more comprehensive definition can be observed by a review (Manno et al., 2009), which characterized BM as standardized protocols aiming to the periodic detection of

early, preferably reversible, biological signs which are indicative, if compared with adequate reference values, of an actual or potential condition of exposure, effect or susceptibility possibly resulting in health damage or disease. These signs are referred to as biomarkers. The periodicity of measurement is important to ensure that any early change is timely detected. In this line, the present research work evaluated effects of co-exposure such as aggravating oxidative damage.

Individuals occupationally exposed to paints are in contact with different xenobiotics. The painters analyzed in this work were exposed to a complex solvents mixture; among them are toluene, xylene, styrene, ethylbenzene, ketones and heavy metals, such as Pb and Cd at different concentrations. In the present study we only evaluated some of these xenobiotics, by their exposure biomarkers.

The results showed no significant difference between hippuric acid (HA) levels of exposed and non-exposed group. This fact can be explained by the lack of specificity of this urinary metabolite of toluene exposure. Although hippuric acid is the primary metabolite of toluene, it is also a normal urine constituent, originated from food, drinks and drugs containing benzoic acid or benzoates, which can compromise the use of this metabolite in the biomonitoring of low level toluene exposure (Truchon et al., 1999).

Currently, international agencies as American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) and Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) have recommended the determination of *ortho*-cresol as an alternative to biological monitoring of toluene, because it is more specific than hippuric acid. Thus, we also analyzed urinary *ortho*-cresol (*o*-C) levels to monitor toluene exposure. Urinary *o*-cresol levels were low, which can be explained because a small fraction of the absorbed dose of toluene is metabolized to *o*-cresol (Dossing et al., 1983).

It is well known that solvent concentration in blood also correlates significantly with the exposure intensity (Kawai et al., 1993). In our study, we found low blood toluene concentrations, probably consistent with the percentage of toluene present in paints, since we also found low levels of urinary HA and *o*-C.

Similarly to toluene biomarkers of exposure, the levels of xylene, styrene and ethylbenzene metabolites were below the Biological Exposure Limit (BEL). This fact can be suggested as an example of antagonistic activity of solvents, connected with a competitive activity on cytochrome P-450, the main responsible for the organic solvents biotransformation (Tardif et al., 1993). Previous study demonstrated that in combined exposure of toluene and xylene, the quantity of urinary metabolites decreased by 20–30% for hippuric acid and by 40% for methylhippuric acid (Tardif et al., 1993).

Blood levels of Pb were also below the reference values and the values recommended by ACGHI, confirming the low-level exposure of the workers to organic solvents and heavy metals analyzed in inks.

Although the results were in accordance with the prescribed limit value, exposed workers showed some changes in biomarkers of oxidative stress, resulting in imbalance state.

It is known that imbalance could cause a decrease in the antioxidant defense (exogenous and/or endogenous) of cells and induce the mechanism of lipid peroxidation (Georgieva et al., 2002), which persisting, a long-term, could participate in the development of diseases.

MDA is a major product of the free radical attack on polyunsaturated fatty acids and it is widely used as a biomarker of lipid peroxidation (Lasheras et al., 2002) indicating the extent of cell membrane injury (Esterbauer et al., 1991). The elevation

of MDA levels observed in painters demonstrated that lipid peroxidation was higher in these subjects when compared to the non-exposed ones. The plasma MDA levels found for the non-exposed group was in accordance with another work of our group (Roehrs et al., 2009); however the MDA plasmatic concentrations of exposed workers were very elevated, higher than the values found in chronic renal failure patients, which is considered pathology of oxidative stress model.

The biotransformation of many chemical substances is carried out by oxidation in the CYP-450 redox cycle. Exposure to organic compounds, like toluene, xylene, styrene and ethylbenzene, induces CYP 2E1 and leads to the generation of ROS and epoxides (Gaté et al., 1999; Persson et al., 1990). The high ROS formation is suggested as responsible for the process of lipid peroxidation, inducing lipid damage. Halifeoglu et al. (2000) reported that organic solvents elevate the levels of malondialdehyde in serum of people working with paint thinner. Dlugosz and Sawicka (1998) conducted a study on a group of workers occupationally exposed to styrene, ethylene glycol, toluene, p-xylene and their mixture in the paint and showed a statistically elevated concentration of the two main products of lipid peroxidation: malondialdehyde and 4-hydroxynonenale in plasma, when compared to the values found in the non-exposed group.

Moreover, we found correlations between the increased MDA levels and increased biomarkers of exposure concentrations of paints constituents. A strong positive correlation was found between MDA and blood toluene (Figure 2), after multiple linear regression analysis, it was found that some of the constituents of paints were more responsible by increased lipid peroxidation, being toluene the main xenobiotic involved in this process. These results demonstrated that toluene seems

to be involved in the mechanism of reactive species formation, which can also be associated with higher lipophilicity and good penetration of toluene into the lipid layer.

In this line, SOD and catalase activities were significantly higher in exposed workers compared with the non-exposed group. Moreover, CAT activity presented a positive correlation with blood toluene levels (Figure 4), demonstrating that toluene really may increase the ROS and the same way, increase catalase activity.

Malondialdehyde also correlated positively with urinary *o*-cresol levels, while no correlation with the urinary HA levels was observed. It could suggest that even being formed in low proportion, *o*-cresol has a more pronounced toxic effect than hippuric acid (Murata et al., 1999), the main urinary metabolite of toluene. This fact can be explained by the biotransformation route in which *o*-cresol is formed, since the aromatic ring oxidation of toluene is carried out with the formation of intermediate epoxides (Al-Ghamdi et al., 2003), which are species with high reactivity.

We also quantified erythrocyte reduced glutathione (GSH), considered the main endogenous antioxidant with multifunction protection of oxidative damage. In the present work, a decrease in GSH levels in exposed group was observed when compared with non-exposed group. Depletion of GSH, the main intracellular reducing reservoir, could indicate the consumption of cellular antioxidant defences, that act in the attempt to protect the cells from free radicals and other highly reactive molecules derived from exposure to solvent vapours (Costa et al., 2005), once GSH is involved in detoxication of many xenobiotics through conjugation of toxic metabolites in the second phase of biotransformation (Koege et al., 1994). The decrease in GSH levels on the exposed group was accompanied by increased lipid peroxidation that could be explained by the metabolic utilization during the reactions that occur to compensate lipid peroxidation. The depletion of the antioxidant GSH occurs to relieve oxidative

stress (lipid peroxidation), resulting in derangement of the oxidant–antioxidant balance and tissue destruction in any target organ (Dilliogluligil et al., 2005).

The decrease in GSH concentrations was also accompanied by increased levels of MA, and increase in blood levels of lead and toluene, demonstrating that styrene, ethylbenzene, toluene and lead could also be involved in oxidative damages. According to multiple linear regression analysis, these xenobiotics are associated in a small portion with the increase GSH levels. However, when we adjusted the variables by the others, no one remained within the model, showing that there was not a single xenobiotic that played major influence on changes in GSH levels.

With regard to the  $\delta$ -aminolevulinatase enzyme, the exposed workers presented decreased enzymatic activity compared to non-exposed group. ALA-D is a zinc metalloenzyme that requires reduced thiol groups for its activity (Fukuda et al., 1988). ALA-D has been suggested as a biomarker for oxidative stress because it is highly sensitive to –SH oxidation by pro-oxidant elements (Soares et al., 2002), leading to reduced enzyme activity (Rocha et al., 2004). ALA-D inhibition impairs heme biosynthesis and leads to the accumulation of its intermediates. One of them,  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA), has been shown to induce pro-oxidant events (Pereira et al., 1992). The reactive oxygen species produced by xenobiotics present in paints, oxidized SH groups of enzyme, reducing its activity. Furthermore, Pb is one of the paint constituents which the painters were exposed to, and it is well known that lead is a potent inhibitor of the ALA-D enzyme.

Negative correlations were observed between ALA-D activity and different exposure biomarkers of xenobiotics present in paints. We found a strong correlation between ALA-D and blood toluene levels (Figure 3), greater than the correlation

observed between ALA-D and blood Pb levels. According to multiple linear regression analysis, these xenobiotics were more responsible by ALA-D enzyme inhibition. Based in standardized coefficient beta ( $\beta$ ), toluene was the most inductor of ALA-D inhibition. Thus, for the first time, toluene can be suggested as an important inhibitor of  $\delta$ -aminolevulinatase enzyme. However, more studies are needed to elucidate which mechanism toluene acts by to cause this enzymatic defect.

On the other hand, SOD and catalase exert its antioxidant activities on reactive oxygen species. SOD acts in order to neutralize the excess superoxide anions originating from organic solvents exposure. The more reactive oxygen is produced, the more the activity of SOD is increased in order to convert it into  $H_2O_2$ . This enzyme is responsible by catalyzing dismutation of the superoxide anion ( $O_2^-$ ) into hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), which is considered the first step of the defense system against oxidative stress (Ulakoglu et al., 1998). CAT reacts efficiently with hydrogen peroxide, originating water and molecular oxygen. Furthermore, it reacts with hydrogen donors, working with peroxidase activity (Matés et al; 1999).

Increased SOD and CAT activity could be explained by a compensatory mechanism developed to balance the increase of the lipid peroxidation. On the other hand, increased CAT activity was related with ALA-D and GSH oxidation, with last purpose of reducing oxidative damages. However, the increase observed in the antioxidant enzymes seemed to be insufficient to combat the lipid peroxidation, since the MDA levels were significantly increased. These could suggest that, even with the compensatory process, there were oxidative damages occurring in cases of paints exposure.

## **5. Conclusions**

In conclusion, it was demonstrated that despite low exposure concentration and the levels of biomarkers of exposure were below the biological exposure limit, alterations in oxidative stress biomarkers were observed; suggesting that the effects of co-exposure may contribute to damage induced by oxidative stress and can result in occupational diseases. Thus, more scientific works in this line are necessary to risk assess on the health of workers exposure in this condition. Moreover, in this study, we suggested toluene as the main inducer of lipid peroxidation, hoping it would serve as an important tool in further studies like this one. We also suggested toluene as a new and important ALA-D inhibitor; however more studies are necessary to elucidate its action mechanisms and the possible impact that toluene exposure may represent to the health of the workers, even at low concentrations.

## **Acknowledgements**

This work was supported by CNPq (grant to S.C. Garcia; process numbers 477740/2007-3 and 479613/2009-5). A.M. Moro is recipient of CNPq Master Degree fellowship (process 566210/2008-8). M. Baierle and S. Nascimento are recipients of PIBIC and Fapergs fellowships. S.C. Garcia is recipient of CNPq Research Fellowship.

## References

ACGIH. TLVs and BEIs based on the documentation of the threshold limit values for chemical substances and physical agents & biological indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, 2004.

Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 1984;105:121-6.

Al-Ghamdi SS, Raftery MJ, Yaqoob MM. Acute solvent exposure induced activation of cytochrome P450E1 causes proximal tubular cell necrosis by oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 2003;17:335-41.

Biesalski HK. Free radical theory of aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5:5-10.

Bulcão R, Santa Maria L, Charão M, Moro A, Roehrs M, Garcia, SC, et al. Quantificação Simultânea de Indicadores Biológicos de Exposição a Solventes. *Quim Nova* 2008; 31:1343-8.

Coskun O, Oter S, Korkmaz A, Armutcu F, Kanter M. The Oxidative and Morphological Effects of High Concentration Chronic Toluene Exposure on Rat Sciatic Nerves. *Neurochem Res* 2005; 30:33-8.

Costa C, Pasquale R, Silvari V, Barbaro M, Catania S. In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicol in vitro* 2005; 20:324-31.

Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. The chemical behaviour of heavy metals plays a prominent role in the induction of oxidative stress. *Free Radic Res* 1999; 31:39-43.

DFG. List of MAK and BAT values. Deutsche Forschungsgemeinschaft. Weinheim, 2001.

Dillioglugil MO, Ilgazli A, Maral H, Sengul C, Ozdemir G, Ercin C. Protective effects of N-acetylcysteine on the peroxidative changes of rat lungs exposed to inhalation of thinners. *Respirology* 2005;10:615-9.

Długosz A, Sawicka E. Chemoprotective effect of coenzyme Q on lipids in the paint and lacquer industry workers. *Int J Occup Med Environ Health* 1998;11:153-63.

Dossing M, Aelum JB, Hansen SH, Lundqvist GR, Andersen NT. Urinary hippuric acid and orthocresol excretion in man during experimental exposure to toluene. *Br J Ind Med* 1983;40:470-3.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.

Fukuda H, Paredes S, Batlle AM. Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehydratase modified by diethylpyrocarbonate and protected by Zn<sup>2+</sup> ions. *Comp Biochem Physiol* 1988;9:285-91.

Gaté L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 1999;53:169-80.

Georgieva T, Michailova A, Panev T, Popov T. Possibilities to control the health risk of petrochemical workers. *Int Arch Occup Environ Health* 2002;75:21-6.

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biom Anal* 2007;43:619-24.

Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136-47.

Halifeoglu I, Canatan H, Ustundag B, Ilhan N, Inanc F. Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. *Cell Biochem Funct* 2000;18:263-7.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986;246:501-14.

Hermes-Lima M, Valle VG, Vercesi AE, Bechara EJ. Damage to rat liver mitochondria promoted by  $\delta$ -aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead poisoning. *Biochem Biophys Acta* 1991;1056:57-63.

IARC. Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposure in the paint manufacture and painting. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1989.

Ilgazli A, Sengul C, Maral H, Ozden M, Ercin C. The effects of thinner inhalation on superoxide dismutases activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs. *Clin Chim Acta* 2004;343:141-4.

Kawai T, Yasugil T, Mizunuma K, Horiguchi S, Ikeda M. Comparative evaluation of blood and urine analysis as a tool for biological monitoring of n-hexane and toluene. *Int Arch Occup Environ Health* 1993;65:123-6.

Koegh JP, Steffen B, Siegers CP. Cytotoxicity of heavy metals in human small intestinal epithelial cell line I-407: role of glutathione. *J Toxicol Environ Health* 1994;43:351-9.

Lasheras C, Huerta JM, Gonzalez S, Braña AF, Patterson AM, Fernandez S, et al. Independent and interactive association of blood antioxidants and oxidative damage in elderly people. *Free Radic Res* 2002;36:875-82.

Manini P, Palma G, Mutti A. Exposure assessment at the workplace: Implications of biological variability. *Toxicol Lett* 2007;168:210-8.

Manno M, Viau C, Cocker J, Colosio C, Lowry L, Mutti A, et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicol Lett* 2009;192:3-16.

Matés JM, Pérez-Gómez C, Castro IN. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595-603.

Mattia CJ, Adams JD, Bondy SC. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem Pharmacol* 1993;46:103-10.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.

Murata M, Tsujikawa M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by minor metabolites of toluene may lead to carcinogenesis and reproductive dysfunction. *Biochem. Biophys Res Commun* 1999;261:478-83.

Pande M, Flora SJS. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of  $\alpha$ -lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology* 2002;177:187-96.

Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJ.  $\delta$ -Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 1992;72:226-30.

Persson JO, Terelius Y, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450- dependent formation of reactive oxygen radicals: isoenzyme-specific inhibition of P450-mediated reduction of oxygen and carbon tetrachloride. *Xenobiotica* 1990;20:887-900.

Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitao MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J Phycol* 2003;39:1008-18.

Prasanthi RPJ, Devi CB, Basha DC, Reddy NS, Reddy GR. Calcium and zinc supplementation protects lead (Pb)-induced perturbations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mouse brain. *Int J Dev Neurosci* 2009 (article in press).

Radwan M A, El-Gendy KS, Gad AF. Oxidative Stress Biomarkers in the Digestive Gland of *Theba pisana* Exposed to Heavy Metals. Arch Environ Contam Toxicol 2009 (article in press).

Rocha JBT, Rocha LK, Emanuelli T, Christofari RS, Souza DO. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. Toxicology 1995;100:27-37.

Rocha JBT, Tuerlinckx SM, Schetinger MRC, Folmer V. Effects of group 13 metals on porphobilinogen synthase in vitro. Toxicol Appl Pharmacol 2004;200:169-76.

Roehrs M, Valentini J, Bulcão R, Moreira JC, Biesalski H, Limberger RP, et al. The plasma retinol levels as pro oxidant/oxidant agents in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant 2009;24:2212-8.

Sassa S.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase assay. Enzyme 1982;28:133-45.

Soares JCM, Folmer V, Rocha JBT. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. Nutrition 2002;19:627-32.

Solliway BM, Schaffer A, Pratt H, Yannai S. Effects of treatment to lead on selected biochemical and hematological variables. Pharmacol Toxicol 1996;78:18-22.

Tardif R, Laparé S, Krishnan K, Brodeur J. A descriptive and mechanistic study of the interaction between toluene and xylene in humans. *Int Arch Occup Environ Health* 1993;65:135-7.

Truchon G, Tardif R, Brodeur J. O-Cresol; A Good Indicator of Exposure to Low Levels of Toluene. *Appl Occup Environ Hyg* 1999;14:677-81.

Ulakoglu EZ, Saygi A, Gumustas MK, Zor E, Oztek I, Kokoglu E. Alterations in superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: relationship between histopathological properties. *Pharmacol Res* 1998;38:209-14.

**Tables****Table 1.** Temperature program of graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) for lead quantification.

| <b>Temperature<br/>(°C)</b> | <b>Rise Time<br/>(s)</b> | <b>Hold Time<br/>(s)</b> | <b>Argon Flow<br/>(ml.min<sup>-1</sup>)</b> |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|---|
| 130                         | 10                       | 5                        | 250   |
| 200                         | 5                        | 5                        | 250   |
| 600                         | 10                       | 20                       | 250   |
| 1700                        | 0                        | 3                        | 0   |
| 2200                        | 1                        | 4                        | 250   |

**Table 2.** Characteristics of the studied population.

| Characteristics   | Non-Exposed<br>Group (n=30) | Exposed<br>Group (n=48) |
|---|-----------------------------|-------------------------|
| Age (mean $\pm$ SEM)                                    | 28.70 $\pm$ 1.79            | 28.50 $\pm$ 1.52        |
| Duration of occupational exposure<br>(months $\pm$ SEM) | -                           | 46.15 $\pm$ 9.94        |
| Non-smokers [n (%)]                                     | 27 (90)                     | 39 (81.25)              |
| Alcohol regular drinkers [n (%)]                        | 19 (63.30)                  | 32 (66.70)              |

[n (%)]: Total number found per group and in parenthesis the percentage.

**Table 3.** Biomarkers of exposure of organic solvents found in the urine of the studied population.

| <b>Biomarkers of Exposure</b>                          | <b>Non-Exposed Group<br/>(n=30)</b> | <b>Exposed Group<br/>(n=48)</b> | <b>Reference Values<sup>a</sup></b> | <b>BEL<sup>a</sup></b> |
|--|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Hippuric Acid<br>(g.g <sup>-1</sup> creatinine)        | 0.42 ± 0.06                         | 0.58 ± 0.09                     | 1.50                                | 2.50                   |
| <i>Ortho</i> -Cresol<br>(mg.L <sup>-1</sup> )          | n.d                                 | 0.06 ± 0.01                     | -                                   | 3.00                   |
| Methylhippuric Acid<br>(g.g <sup>-1</sup> creatinine)  | n.d                                 | 0.21 ± 0.03                     | -                                   | 1.50                   |
| Mandelic Acid<br>(g.g <sup>-1</sup> creatinine)        | n.d.                                | 0.08 ± 0.01                     | -                                   | 1.50                   |
| Phenylglyoxylic Acid<br>(g.g <sup>-1</sup> creatinine) | n.d.                                | 0.02 ± 0.01                     | -                                   | 0.24                   |

The values are expressed as mean ± SEM.

<sup>a</sup> According to ACGIH, 2004.

BEL: Biological Exposure Limit; n.d.: not detected.

**Table 4.** *Pearson's* correlation coefficients between biomarker of oxidative damage and antioxidants versus MDA in the studied population (n=78).

|                                     | MDA ( $\mu\text{M}$ )      |
|-------------------------------------|----------------------------|
| ALA-D ( $\text{U.L}^{-1}$ )         | $r = -0.677$ ; $p < 0.001$ |
| GSH ( $\mu\text{mol.ml}^{-1}$ )     | $r = -0.430$ ; $p < 0.001$ |
| CAT ( $\text{K.g}^{-1} \text{Hb}$ ) | $r = 0.385$ ; $p = 0.001$  |

**Table 5.** *Pearson's* correlation coefficients between MDA and exposure biomarkers; *Pearson's* correlation coefficients between ALA-D enzyme and biomarkers of exposure in the studied population (n=78).

| Biomarkers of Exposure                      | MDA                       | ALA-D                      |
|---|---------------------------|----------------------------|
| Blood Toluene ( $\text{mg.L}^{-1}$ )        | $r = 0.682$ ; $p < 0.001$ | $r = -0.582$ ; $p < 0.001$ |
| MA ( $\text{g.g}^{-1}$ creatinine)          | $r = 0.180$ ; $p = 0.123$ | $r = -0.356$ ; $p = 0.002$ |
| Blood Pb ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ )          | $r = 0.368$ ; $p = 0.001$ | $r = -0.265$ ; $p = 0.022$ |
| mHA ( $\text{g.g}^{-1}$ creatinine)         | $r = 0.258$ ; $p = 0.025$ | $r = -0.230$ ; $p = 0.047$ |
| <i>Ortho</i> -Cresol ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) | $r = 0.235$ ; $p = 0.042$ | $r = -0.236$ ; $p = 0.042$ |

MA: Mandelic Acid; mHA: Methylhippuric Acid.

**Table 6.** *Pearson's* correlation coefficients and standardized coefficient beta between antioxidant GSH and biomarkers of exposure of constituents of paints (n=78).

| <b>Biomarkers of Exposure</b>        | <b>Correlation Coefficient (r)</b> | <b>Standardized Coefficient Beta (<math>\beta</math>)</b> |
|--------------------------------------|------------------------------------|---|
| MA (g.g <sup>-1</sup> creatinine)    | r= -0.336; p= 0.003                | $\beta$ = -0.191; p= 0.119                                |
| Blood Pb ( $\mu$ g.L <sup>-1</sup> ) | r= -0.316; p= 0.005                | $\beta$ = -0.191; p= 0.104                                |
| Blood Toluene (mg.L <sup>-1</sup> )  | r= -0.308; p= 0.006                | $\beta$ = -0.176; p= 0.136                                |

MA: Mandelic Acid.

## Figure List

**Figure 1.** GSH levels ( $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) and ALA-D activity ( $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ ) from non-exposed group (n=30) and exposed group (n=48). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, being \*p<0.001.

**Figure 2.** Correlation between lipid peroxidation biomarker (MDA) vs. blood toluene levels (r= 0.682; p= 0.000; n=78).

**Figure 3.** Correlation between  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase enzyme vs. blood toluene levels (r= -0.582; p= 0.000; n=78).

**Figure 4.** Correlation between catalase activity (CAT) and blood toluene levels (r= 0.270; p= 0.019; n=78).

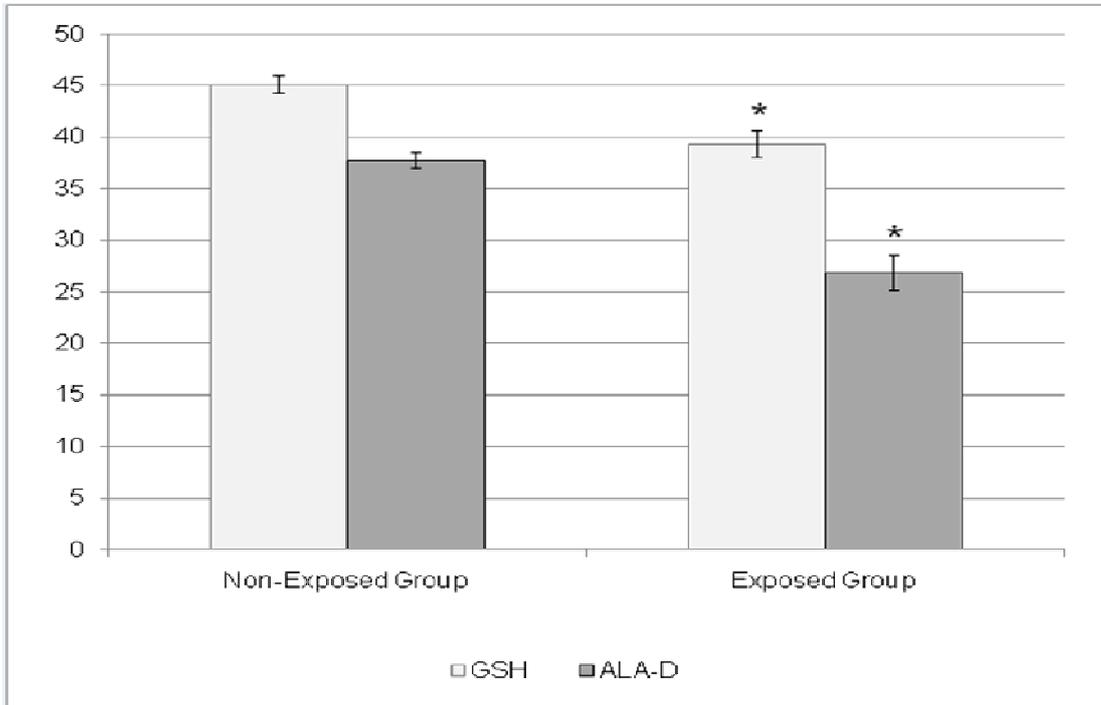
**Figure 1.**

Figure 2.

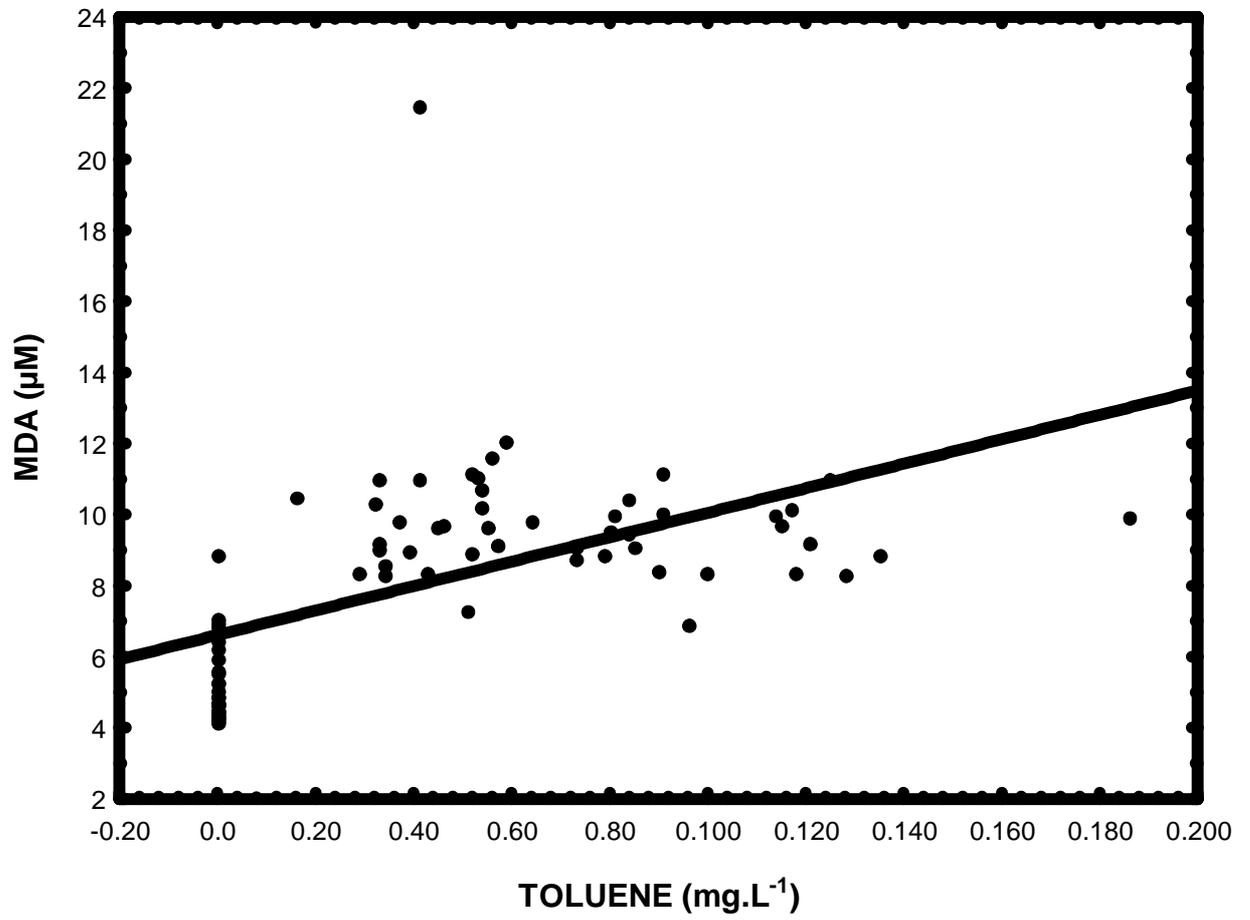


Figure 3.

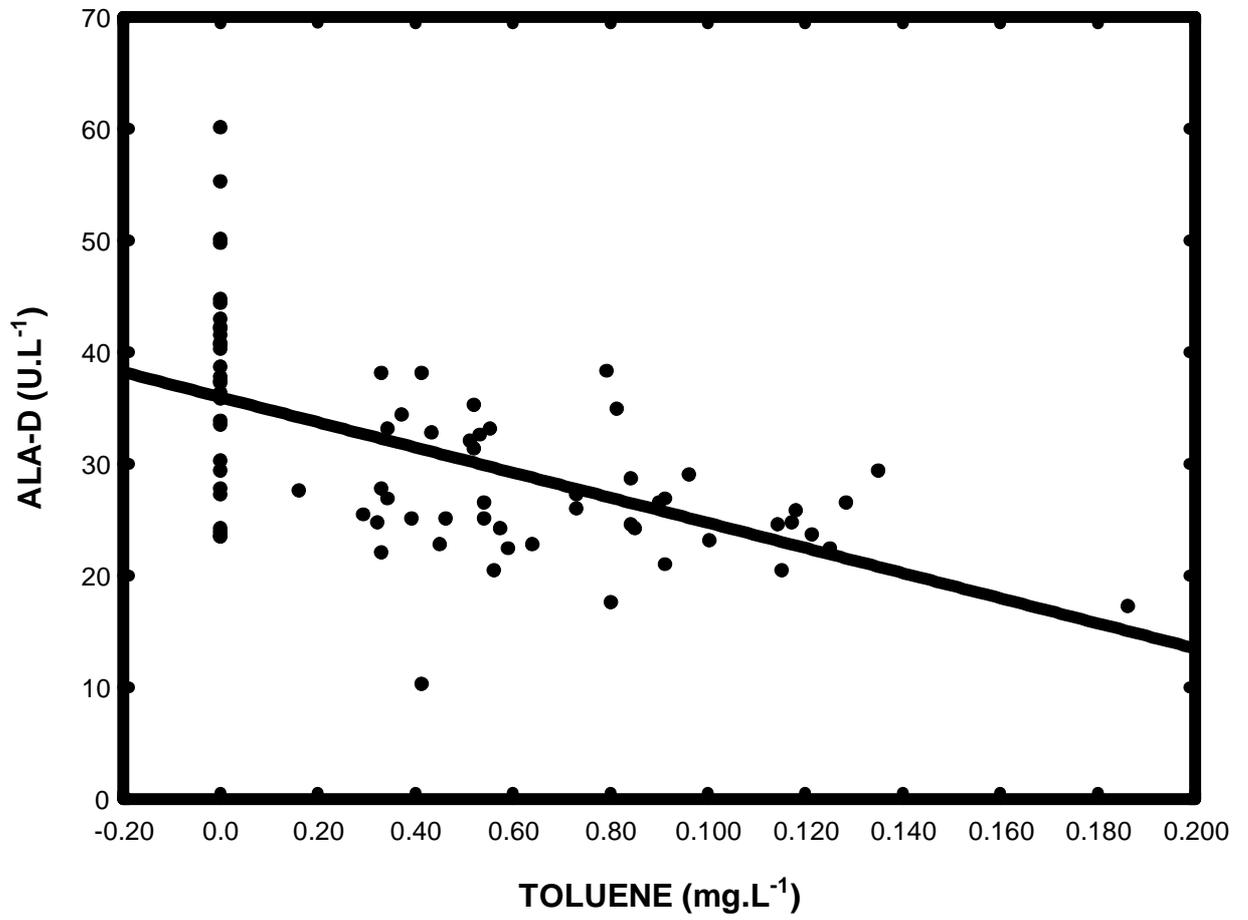
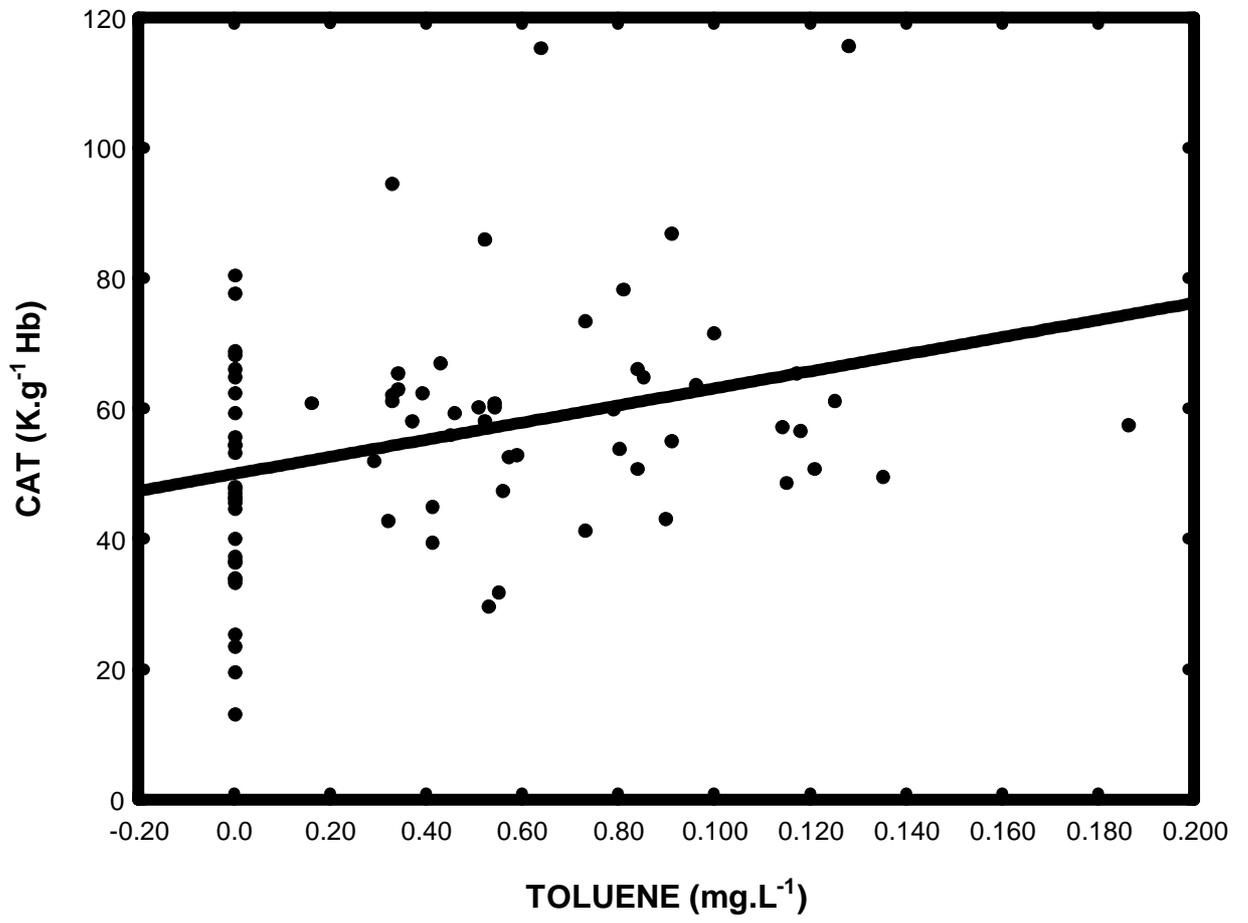


Figure 4.



## 4 DISCUSSÃO

Sabe-se que a monitorização biológica desempenha importante papel na prevenção de possíveis danos à saúde do trabalhador. Dessa forma, a detecção precoce de biomarcadores resultantes da exposição a substâncias perigosas pode diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos à saúde. As informações provenientes da monitorização biológica possibilitam a implantação de medidas de prevenção e controle apropriadas, bem como a avaliação regular dos possíveis riscos decorrentes da exposição a agentes químicos presentes no ambiente de trabalho (BERNARD & LAUWERYS, 1986).

A quantificação de xenobióticos presentes no ambiente de trabalho e/ou de seus metabólitos em material biológico, com o objetivo de avaliar o grau de exposição e o risco à saúde do trabalhador, é uma importante ferramenta no processo de monitorização biológica (DELLA ROSA et al., 2003).

Os níveis dos metabólitos urinários quantificados, estabelecidos para a monitorização biológica, são parâmetros que possuem um alto poder preditivo de riscos à saúde decorrentes da exposição a diferentes solventes (ANGERER & KRAMER, 1997; THIESEN, 2005), sendo recomendados em nível nacional, pela Norma Regulamentadora NR-7 da Secretaria de Segurança e Saúde no controle da exposição ocupacional, e internacionalmente através de órgãos como a ACGIH e DFG. Além disso, a quantificação do próprio xenobiótico em fluidos biológicos, como o sangue, também apresenta uma estreita relação linear com a intensidade da exposição no ambiente de trabalho (KAWAI et al., 1993), podendo ser considerado um biomarcador confiável de exposição.

Indivíduos expostos ocupacionalmente a tintas encontram-se em contato com uma ampla variedade de xenobióticos, uma vez que a formulação das tintas é composta por uma complexa mistura de substâncias químicas (IARC, 1989). Dentre os principais xenobióticos constituintes das tintas, pode-se destacar o solvente orgânico tolueno (WHO, 1996; MOON et al., 2001; SAMOTO et al., 2006), entretanto outros solventes orgânicos (hidrocarbonetos, cetonas entre outros) e pigmentos de metais pesados também podem ser encontrados na constituição das mesmas (IARC, 1989), caracterizando um processo de co-exposição.

Os pintores compõem o principal grupo de risco decorrente da exposição ocupacional a tintas. Tendo em vista a vasta quantidade de produtos químicos presentes na composição das tintas, pode-se concluir que os pintores encontram-se concomitantemente expostos a diferentes tipos de xenobióticos, sendo que esse processo pode provocar alterações nas etapas de biotransformação das substâncias químicas (KLAASSEN et al., 2001), bem como, nos mecanismos toxicológicos.

No Manuscrito apresentado neste trabalho, o grupo de trabalhadores expostos foi representado por pintores de uma indústria do Rio Grande do Sul, os quais estavam expostos a uma complexa mistura de xenobióticos em diferentes concentrações. Os xenobióticos avaliados no presente trabalho, através de seus biomarcadores de exposição, foram o solvente orgânico tolueno (como principal xenobiótico constituinte das tintas); xileno; estireno; etilbenzeno; e o chumbo. Segundo a NR-7, pelo fato dos trabalhadores estarem expostos a tintas, a única obrigatoriedade da monitorização biológica é para o solvente orgânico tolueno, sendo necessária a quantificação dos níveis urinários do ácido hipúrico nos trabalhadores expostos.

Assim, é estabelecido que os ácidos hipúrico, metilhipúrico, mandélico e fenilglicoxílico urinários são considerados indicadores biológicos de exposição ocupacional aos solventes, tolueno, xileno, etilbenzeno e estireno, respectivamente (BRASIL, 1994). Todos os ácidos citados acima, exceto o ácido hipúrico, são encontrados somente em urina de indivíduos expostos aos respectivos solventes. Entretanto, o ácido hipúrico possui valor de referência (VR), podendo atingir até 1,5 g/g de creatinina, podendo ser encontrado em indivíduos não expostos ao tolueno (BRASIL, 1994). A excreção do ácido hipúrico na urina pode sofrer influência da dieta, devido à presença do ácido benzóico e seus precursores (OGA, 2008). Assim, quando a exposição ao tolueno é baixa, fontes não ocupacionais podem provocar aumento nos níveis urinários de ácido hipúrico, comprometendo a utilização deste biomarcador de exposição ao tolueno (TRUCHON et al., 1999).

Em decorrência da inespecificidade do ácido hipúrico como indicador biológico de exposição ao tolueno, o *orto*-cresol vêm sendo sugerido como biomarcador alternativo para monitorização biológica de exposição ao tolueno (ACGIH, 2004; DFG, 2001). Além disso, os níveis sanguíneos do solvente inalterado, bem como os níveis sanguíneos de chumbo no sangue são recomendados tanto pela NR-7, como pela ACGIH na monitorização biológica da

exposição ocupacional ao tolueno e ao chumbo, respectivamente (BRASIL, 1994; ACGIH, 2004).

Os níveis dos biomarcadores de exposição foram avaliados no grupo de pintores e no grupo controle (indivíduos não expostos ocupacionalmente). Em relação aos indicadores biológicos de exposição ao tolueno, os níveis urinários de ácido hipúrico foram mensuráveis tanto no grupo exposto, como no grupo não-exposto, uma vez que o ácido hipúrico pode ser proveniente da dieta alimentar. Os níveis de ácido hipúrico encontrados para o grupo de pintores estavam abaixo dos valores de referência, bem como dos valores máximos permitidos para este biomarcador. Não foi observada diferença significativa entre os grupos, sugerindo, dessa forma, que a quantificação do ácido hipúrico urinário não é específica para baixos níveis de exposição ocupacional ao tolueno. Os baixos níveis de exposição ao tolueno foram corroborados pelos demais resultados encontrados para os outros dois biomarcadores de exposição ao tolueno: *orto*-cresol urinário e tolueno sanguíneo. Ambos apresentaram níveis abaixo dos limites biológicos de exposição.

Os metabólitos do xileno, estireno e etilbenzeno também apresentaram níveis abaixo dos valores máximos permitidos para exposição aos respectivos solventes e não foram detectados no grupo controle. As baixas concentrações urinárias dos biomarcadores de exposição aos solventes orgânicos também podem ser indicativas de baixos níveis de exposição, ou seja, os xenobióticos presentes na composição das tintas encontravam-se em baixas concentrações.

Os níveis sanguíneos de chumbo encontrados, tanto para o grupo exposto, quanto para o grupo não-exposto, encontraram-se abaixo dos valores de referência (25 µg/dL) (BURTS et al., 1998), demonstrando baixa exposição a este xenobiótico.

Apesar dos valores encontrados para os IBEs estarem abaixo do IBMP e dos valores preconizados pela ACGIH (BRASIL, 1994; ACGIH, 2004), os trabalhadores expostos apresentaram alterações nos biomarcadores do estresse oxidativo, sendo encontrado significativo aumento nos níveis de MDA plasmáticos, acompanhado por depleção nos níveis de GSH e inibição da atividade enzimática da ALA-D. Além disso, também foi possível evidenciar o aumento da atividade antioxidante enzimática do organismo, representada pelas enzimas SOD e catalase, sendo que todos os biomarcadores do estresse oxidativo analisados apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados.

A depleção dos níveis de GSH, principal antioxidante endógeno do organismo poderia ser um indicativo de consumo das defesas antioxidantes do organismo, na tentativa de conter os efeitos tóxicos provocados pelos altos níveis de peroxidação lipídica encontrados (DILLIOGLUGIL et al., 2005). Além disso, o aumento das enzimas antioxidantes SOD e CAT poderia indicar um mecanismo compensatório desenvolvido pelo organismo respondendo ao aumento de espécies reativas formadas frente à exposição aos xenobióticos do ambiente de trabalho.

O estresse oxidativo é frequentemente sugerido como causa principal ou secundária na patogênese de várias doenças, e cada vez mais a toxicidade de diferentes xenobióticos tem sido associada ao desequilíbrio da homeostase entre as espécies oxidantes e antioxidantes (ROGERS et al., 2003). O desequilíbrio oxidativo induzido pelos solventes orgânicos presentes na constituição das tintas tem sido associado à formação de espécies reativas de oxigênio, e epóxidos intermediários altamente reativos, proveniente da biotransformação destes pelo citocromo P-450 (AL-GHAMDI et al., 2003). A toxicidade gerada pelos metais pesados, como o chumbo também tem sido associada ao mecanismo do estresse oxidativo e geração de espécies reativas de oxigênio, entretanto ainda não se sabe quais os mecanismos tóxicos envolvidos, nem se o estresse oxidativo é causa ou consequência dos efeitos tóxicos do chumbo (GURER & ERCAL, 2000).

Tanto em relação ao MDA, biomarcador de dano lipídico, como no caso da enzima ALA-D, importante enzima representativa do dano oxidativo sobre proteínas/enzimas, o tolueno se mostrou como xenobiótico de maior efeito indutor sobre esses biomarcadores, mesmo em baixas concentrações, o que pode ser decorrente da formação de espécies reativas formadas durante a biotransformação do solvente, bem como da alta lipofilicidade e alto poder de penetração do xenobiótico.

Em concordância com achados da literatura, a depleção dos níveis de GSH pareceu estar ligada a toxicidade do estireno, mesmo em baixas concentrações, uma vez que foi observada correlação entre os níveis de GSH e o ácido mandélico, biomarcador de exposição ao solvente. Entretanto, os xenobióticos avaliados (chumbo, tolueno e estireno) apresentaram efeitos indutivos semelhantes sobre os níveis de GSH.

Dessa forma, os resultados obtidos permitem sugerir o tolueno como o principal indutor de dano lipídico, através da peroxidação lipídica, no caso da co-

exposição estudada; bem como um novo e importante inibidor da enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase. Entretanto mais estudos acerca dos mecanismos de toxicidade e interação do solvente com o organismo são necessários.

## 5 CONCLUSÕES

- Os biomarcadores de exposição analisados para os trabalhadores expostos às tintas estavam abaixo dos limites nacionais e internacionais estabelecidos;
- O tolueno sanguíneo pode ser sugerido como o biomarcador de exposição mais confiável para correlação com o dano oxidativo, especialmente frente a baixos níveis de exposição;
- Os efeitos da co-exposição podem contribuir para o desenvolvimento de dano celular e tecidual induzidos pelo estresse oxidativo, o que poderia resultar em doenças ocupacionais;
- A depleção dos níveis de GSH é sugerida como indicativo de consumo das defesas antioxidantes do organismo, na tentativa de diminuir os efeitos provocados pelo estresse oxidativo. Além disso, o aumento das enzimas antioxidantes SOD e CAT pode ser sugerido com um mecanismo compensatório desenvolvido pelo organismo, com objetivo de aumentar o sistema antioxidante para balancear o aumento das espécies oxidantes; entretanto, o aumento do MDA acompanhado pela diminuição da GSH e inibição da enzima ALA-D demonstraram dano oxidativo de proteínas e lipídios;
- Trabalhadores expostos a tintas estão suscetíveis aos danos oxidativos decorrentes do estresse oxidativo, mesmo que os biomarcadores de exposição aos xenobióticos constituintes de tintas estejam abaixo dos valores máximos permitidos;
- O tolueno é sugerido como o principal indutor de dano lipídico, bem como um novo e importante inibidor da enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANAYLO, V. N.; OTEIZA, P. I. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. **Toxicology**, v. 135, p. 77-85, 1999.

ALBIANO, N. F. **Toxicologia laboral**: critérios para la vigilancia de los trabajadores expuestos a sustancias químicas peligrosas available. Buenos Aires: 1999.

AL-GHAMDI S. S. et al. Acute solvent exposure induced activation of cytochrome P4502E1 causes proximal tubular cell necrosis by oxidative stress. **Toxicology in Vitro**, v. 17, p. 335-341, 2003.

ALVARENGA, K. F. et al. Emissões otoacústicas: produto de distorção em indivíduos expostos ao chumbo e ao ruído. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n.5, p. 681-686, 2003.

ALVAREZ LEITE, E. M. **Exposição Ocupacional ao Chumbo e seus Compostos**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH). Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati: ACGIH, 1996

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH). Threshold limit values (TLVs) for chemical substances and physical agents and biological exposure indices (BEIs). Cincinnati, OH: ACGIH, 2003.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH). TLVs and BEIs based on the documentation of the threshold limit values for chemical substances and physical agents & biological indices. Cincinnati: ACGIH, 2004.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, n.17, p.7915-7922, 1993.

AMORIM, L. C. A.; ALVAREZ LEITE, E. M. A. Comparação dos níveis de orto-cresol e ácido hipúrico na urina de trabalhadores expostos ao tolueno. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 25, p.45-57, 1999.

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

ANDREWS, L. S.; SNYDER, R. Toxic effects of solvents and vapors. In: Amdur, M.O.; Doull, J.; Klaasen, C.D. Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons. 4th ed., New York, 1991.

ANGERER, J.; KRAMER, A. Occupational chronic exposure to organic solvents. XVI. Ambient and biological monitoring of workers exposed to toluene. **International Archives of Occupational and Environment Health**, v. 69, p. 91-96, 1997.

ASTIER, A. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary metabolites of benzene, nitrobenzene, toluene, xylene and styrene. **Journal of Chromatography**, v. 573, p. 318-22, 1992.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for styrene. Atlanta, GA: U.S. **Department of Health and Human Services, Public Health Service**. 1992. Disponível em <<http://www.atsdr.cdc.gov>>

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry): Toxicological Profile for Xylenes. Atlanta, GA: **Public Health Service**. 1995. Disponível em <<http://www.atsdr.cdc.gov>>.

AYLWARD, L. L.; BARTON, H. A.; HAYS, S. M. Biomonitoring Equivalents (BE) dossier for toluene (CAS No. 108-88-3). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 51, p.27-36, 2008.

AZEVEDO A. P. M. **Efeito de produtos químicos e ruído na gênese da perda auditiva ocupacional**. Dissertação apresentada na Escola Nacional de Saúde Pública para obtenção do grau de Mestre. Rio de Janeiro, 2004.

BARBERINO, J. L. Alterações hepáticas em trabalhadores de uma refinaria de petróleo e em uma população de referência no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 17, n.1, p. 30-37, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-126, 2006.

BAYIL S. et al. Free radical and antioxidant enzyme levels at exposure of volatile organic compounds in workers. **Saudi Medical Journal**, v. 28, p. 290-291, 2007.

BEAL, M. F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annals of Neurology**, v. 38, p. 357-366, 1995.

BECHARA, E. J. H. et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyries associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Química Nova**, v. 16, p. 385-392, 1993.

BELLÓ, A. **Dano oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres**. Porto Alegre: Editora Ulbra, p. 15-19, 2002.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Assessment of human exposure to chemicals through biological monitoring. In: KOPFLER, F.C.; CRAUN, G.F. *Environmental Epidemiology*. Chelsea, 1986.

BERNARD, A. Biokinetics and stability aspects of biomarkers: recommendations for application in population studies. **Toxicology**, v. 101, p. 65-71, 1995.

BIESALSKI, H. K. Free radical theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, p. 5-10, 2002.

BLAKE, D. R.; RALLEN, R. E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems - a review oriented to inflammatory processes. **British Medical Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 371-385, 1987.

BOLZAN, R. C. et al. Delta-aminolevulinatase inhibition by phenyl selenoacetylene: effect of reaction with hydrogen peroxide. **Pharmacology & Toxicology**, v.90, n. 4, p. 214-219, 2002.

BONASSI, S.; NERI, M.; PUNTONI, R. Validation of biomarkers as early predictors of disease. **Mutation Research**, v. 480, p. 349-358, 2001.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Nr-7. In: *Segurança e Medicina do Trabalho*. 50 ed. 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. In: *Atenção à saúde dos trabalhadores expostos*

ao chumbo metálico / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas - Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRAUTBAR, N.; WILLIAMS, J. Industrial solvents and liver toxicity: Risk assessment, risk factors and mechanisms. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 205, p. 479-491, 2002.

BROOKS, S. M. et al. The effects of protective equipment on styrene exposure in workers in the reinforced plastics industry. **Archives of Environmental Health**, v. 35, p. 287-294, 1980.

BULCÃO, R. P. **Indicadores Biológicos de Exposição a Solventes Orgânicos e sua Inter-relação com o Estresse Oxidativo**. Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria para obtenção do grau de Mestre. Santa Maria, 2008.

BURTS, C.; ASHHWOOD, E.; EWARD, R. **Fundamentos de química clínica**. 4th. Rio de Janeiro, 1998.

CÂMARA, V. M.; GALVÃO, L. A. C. A patologia do trabalho numa perspectiva ambiental. In: MENDES, R ed. **Patologia do trabalho**. Rio de Janeiro, Editora Atheneu, p. 609-630, 1995.

CAMPAGNA, D. et al. Visual dysfunction among styrene exposed workers. **Scandinavian Journal of Work Environment & Health**, v. 21, p. 382-390, 1995.

CAMPOS, M. A. G. et al. Estado nutricional e fatores associados em idosos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 4, p. 214-221, 2005.

CECCONI, C. et al. The role of glutathione status in the protection against is chemic and reperfusion damage, effects of N-acetylcysteine. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 20, p. 5-13, 1988.

CHEN, Z. et al. Exposure of workers to a mixture of toluene and xylene. II Effects. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 51, p. 47-49, 1994.

COSKUN, O. et al. The Oxidative and Morphological Effects of High Concentration Chronic Toluene Exposure on Rat Sciatic Nerves. **Neurochemical Research**, v. 30, p. 33-38, 2005.

COSTA, C. et al. In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. **Toxicology in vitro**, v. 20, p. 324-331, 2005.

CSANÁDY, G. A. et al. A physiologic pharmacokinetic model for styrene and styrene-7,8-oxide in mouse, rat, and man. **Archives of Toxicology**, v. 68, n. 3. p. 143-157, 1994.

DALLE-DONNE, I. et al. Proteins as biological markers of oxidative/nitrosative stress in diseases. The contribution of redox-proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 55-99, 2005.

DARÉ E. et al. Styrene 7,8-oxide induces mitochondrial damage and oxidative stress in neurons. **Toxicology**, v. 201, p. 125-132, 2004.

DAVIES, M. J. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in study of human disease. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 27, p. 1151-1161, 1999.

DEGNAN-JR, T. F.; SMITH, C. M.; VENKAT, C. R. Alkylation of aromatics with ethylene and propylene: recent developments in commercial processes. **Applied Catalysis**, v. 221, p. 283-294, 2001.

DELLA ROSA, H. V.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; COLACIOPPO S. Monitorização ambiental e biológica. In: Oga. Fundamentos de Toxicologia. Segunda edição. Editora Atheneu. São Paulo. 2003. p. 147-161

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DESCAMPS-LATSCHA, B. et al. Establishing the relationship between complement activation and stimulation of phagocyte oxidative metabolism in hemodialyzed patients: a randomized prospective study. **Nephron**, v. 59, n. 2, p. 279-285, 1991.

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). List of MAK and BAT values. Weinheim: DFG, 2001.

DIAS, E.C. Manual de doenças relacionadas ao trabalho. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

DILLIOGLUGIL, M. O. et al. Protective effects of N-acetylcysteine on the peroxidative changes of rat lungs exposed to inhalation of thinners. **Respirology**, v. 10, p. 615-619, 2005.

DILLS, R. L.; BELLAMY, G. M.; KALMAN, D. A. Quantitation of *o*-, *m*- and *p*-cresol and deuterated analogs in human urine by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of Chromatography B**, v. 703, p. 105-113, 1997.

DLUGOSZ, A.; SAWICKA, E. Chemoprotective effect of coenzyme Q on lipids in the paint and lacquer industry workers. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 11, p. 153-163, 1998.

DLUGOSZ, A.; SAWICKA, E.; MARCHEWKA, Z. Styrene and ethylene glycol have a synergetic effect on lipid peroxidation that is better protected than repaired by CoQ<sub>10</sub>. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 5, p. 581-588, 2005.

DOSSING, M. et al. Urinary hippuric acid and orthocresol excretion in man during experimental exposure to toluene. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 40, p. 470-473, 1983.

DUCOS, P. et al. Biological monitoring of exposure to solvents using the chemical itself in urine: application to toluene. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 81, p. 273-284, 2008.

EDELFORSS, S.; HASS, U.; HOUGAARD, K.S. Changes in Markers of Oxidative Stress and Membrane Properties in Synaptosomes from Rats Exposed Prenatally to Toluene. **Pharmacology & Toxicology**, v. 90, p. 26-31, 2002.

EGUCHI, T. et al. Impaired colour discrimination among workers exposed to styrene: relevance of a urinary metabolite. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 52, p. 534-538, 1995.

ENGSTRÖM, K.; RIIHIMAKI, V.; LAINE, A. Urinary disposition of ethylbenzene and *m*-xylene in man following separate and combined exposure. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 54, p. 355-363, 1984.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, p.81-128, 1991.

FERNANDEZ-CUARTERO, B. et al. Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 479-488, 1999.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FINDLAY, V. J.; TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 374-379, 2005.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FONTANELLAS, A. et al. Erythrocyte aminolevulinate dehydratase activity as a lead marker in patients with chronic renal failure. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 40, n. 1, p. 43-50, 2002.

FORSTER, L. M. K.; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S. L. Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, p. 167-172, 1994.

FRITSCHI, L. et al. OccIDEAS: Retrospective Occupational Exposure Assessment in Community-Based Studies Made Easier. **Journal of Environmental and Public Health**, 2009.

FUKUDA, H.; PAREDES, S.; BATLLE, A. M.;. Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehydratase modified by diethylpyrocarbonate and protected by Zn<sup>2+</sup> ions. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 1, p.285-291, 1998.

FUSTINONI, S. et al. Determination of urinary ortho-cresol and meta-cresol in humans by headspace SPME gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 817, p. 309-317, 2005.

FUSTINONI, S. et al. Comparison between urinary o-cresol and toluene as biomarkers of toluene exposure. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v.4, p.1-9, 2007.

GATÉ, L. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, p. 169-180, 1999.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. **Wills : biochemical basis of medicine**. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997.

GOERING, P. L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, v. 14, p. 45-60, 1993.

GONÇALVES, T. L. et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 1071-1075, 2005.

GONZÁLEZ-YEBRA, A. L. et al. Occupational exposure to toluene and its possible causative role in renal damage development in shoe workers. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 79, p. 259-264, 2006.

GROMADZINSKA J., WASOWICZ W., Oxidative stress-inducing workplace agents, **Comments on Toxicology. Taylor & Francis health sciences**, v. 9, p. 23-37, 2003.

GURER, H.; ERCAL, N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 10, p. 927-945, 2000.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136-147, 2000.

HALIFEOGLU, I. et al. Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. **Cell Biochemistry and Function**, v. 18, p. 263-267, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HAMMER, K. D. Metabolite ratio of toluene-exposed rotogravure printing plant workers reflects individual mutagenic risk by sister chromatid exchanges. **Mutation Research**, v. 519, p. 171-177, 2002.

HENDERSON, R. F. et al. The use of biological markers in toxicology. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 20, p. 65-82, 1989.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, n. 4, p. 277-285, 1989.

IKEDA, M. Exposure to complex mixtures: implications for biological monitoring. **Toxicology Letters**, v. 77, p. 85-91, 1995.

IKEDA, M. Solvents in urine as exposure markers. **Toxicology Letters**, v. 108, p. 99-106, 1999.

ILGAZLI, A. et al. The effects of thinner inhalation on superoxide dismutases activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs. **Clinica Chimica Acta**, v. 343, p. 141-144, 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposure in the paint manufacture and painting. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon: IARC, 1989.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some industrial chemicals. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Lyon: IARC, 1994.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva; ICPS, 1993.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Glossary of Terms used in Toxicology, 2nd edition, v. 79, n. 7, p. 1153-1341, 2007.

JACOB, L. C. B.; ALVARENGA, K. F.; MORATA, T. C. Os efeitos da exposição ocupacional ao chumbo sobre o sistema auditivo: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 68, p. 564-569, 2002.

JAMIESON, D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 7, n. 1, p. 87-108, 1989.

JANG, J. Y.; DROZ, P. O.; KIM, S. Biological monitoring of workers exposed to ethylbenzene and co-exposed to xylene. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 74, p. 31-37, 2001.

JORDÃO Jr, A. A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.

JUNQUEIRA, V. B. C.; RAMOS, L. R. Estresse Oxidativo. In: RAMOS, L. R.; NETO, J. T. **Geriatrics e gerontologia**. Barueri : Manole Ltda, 2005. Cap. 24, p. 315-324.

KAWAI, T. et al. Comparative evaluation of blood and urine analysis as a tool for biological monitoring of n-hexane and toluene. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 65, p. 123-126, 1993.

KAWAI, T. et al. Evaluation of biomarkers of occupational exposure to toluene at low levels. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 81, p. 253-262, 2008.

KELADA, S. N. et al. Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. **American Journal of Epidemiology**, v. 154, p. 1-13, 2001.

KING, M. D. et al. Solvent encephalopathy. **BMJ**, v. 283, p. 663-65, 1991.

KIRK, R. E.; OTHMER, R. F. **Encyclopedia of Chemical Technology**, ed. Wiley Interscience: New York, 1984, vol. 15.

KIVISTO, H.; PEKARI, K.; AITIO, A. Analysis and stability of phenylglyoxylic and mandelic acids in the urine of styrene-exposed people. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 64, p. 399-403, 1993.

KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J. **Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons**. 6 ed. New York, McGraw Hill. 2001.

LAFFON B.; LEMA M.; MÉNDEZ J. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids as indirect evaluation of styrene exposure. **Journal of Chromatography B**, v. 753, p. 385-393, 2001.

LARINI, L. **Toxicologia**. Terceira edição, Editora Manole. São Paulo. 1997.

LATAYE, R.; CAMPO, P.; LOGGUET, G. Combined effects of noise and styrene exposure on hearing function in the rat. **Hearing Research**, v. 139, p. 86-96, 2000.

LAURENS, J. et al. Validated method for quantitation of biomarkers for benzene and its alkylated analogues in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 774, p. 173-185, 2002.

LAUWERYS, R.R. Occupational Toxicology. In: KLAASSEN, Curtis D.; AMDUR, Mary; DOULL, John. **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 5° Ed USA: McGraw-Hill Companies, cap.33, 1996, p.987-1010.

LAWTON, B.W.; HOFFMANN, J.; TRIEBIG, G. The ototoxicity of styrene: a review of occupational investigations. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 79, p. 93-102, 2006.

LEICHTWEIS, S.; JI, L. L. Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. **Acta Physiology Scandinavian**, v. 179, p. 1-10, 2001.

LEVINE, R. L.; MOSKOVITZ, J.; STADTMAN, E. R. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. **IUBMB Life**, v. 50, p. 301-307, 2000.

LITOVITZ, T. et al. Occupational and Environmental Exposures Reported to Poison Centers. **American Journal of Public Health**, v. 83, n. 5, p. 739-743, 1993.

LOF A.; JOHANSON G. Toxicokinetics of organic solvents: A review of modifying factors. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 28, p. 571-650, 1998.

MANAHAN, S. E. **Toxicology Chemistry**. Second Edith, Lewis Publishers, 1992.

MANINI, P.; PALMA, G.; MUTTI, A. Exposure assessment at the workplace: Implications of biological variability. **Toxicology Letters**, v. 168, p. 210-218, 2007.

MANNO, M. et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). **Toxicology Letters**, v. 192, p. 3-16, 2009.

MARTÍNEZ-ALFARO, M. t al. Correlation between formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg)-sensitive sites determined by a comet assay, increased MDA, and decreased glutathione during long exposure to thinner inhalation. **Toxicology Letters**, v. 163, p. 198-205, 2006.

MATTIA C. J.; ADAMS J. D.; BONDY S. C. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 46, p. 103-110, 1993.

MAYNE, S. T. Antioxidants nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 933-940, 2003.

McDIARMID, M. A.; AGNEW, J. Efeitos do trabalho sobre a reprodução. In: MENDES, R ed. **Patologia do trabalho**. Rio de Janeiro, Editora Atheneu, p.389-427, 1995.

McGRATH, L. T. et al. Oxidative stress in erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 235, p. 179-188, 1995.

MILLS, B. J.; LANG, C. A. Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 401-406, 1996.

MOON, C. S. et al. Use of solvents in industries in Korea; experience in Sinpyeong-Jangrim industrial complex. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 74, p. 148-152, 2001.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.1, p. 167-181, 2004.

MORENA, M. et al. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 17, p. 422-427, 2002.

MUIJSER, H.; HOOGENDIJK, E.; HOOISMA, J. The effects of occupational exposure to styrene on high-frequency hearing thresholds. **Toxicology**, v. 49, p. 331-340, 1998.

MURRAY, K. E.; ADAMS, R. F. Determination of simple phenols in faeces and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 431, p. 143-149, 1988.

NAKAZAWA, H.; GENKA C. H.; FUJISHIMA M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. **Japanese Journal of Physiology**, v. 46, p.15-32, 1996.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Biological markers in environmental health research. **Environmental Health Perspectives**, v. 74, p. 3-9, 1987.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ethylbenzene in F344/N Rats and B6C3F1 Mice. (Inhalation Studies). Research Triangle Park, NC: NTP, 1997.

NEVES, H. Vigilância de Exposição Ocupacional a Substâncias Tóxicas. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 1, p. 35-46, 1999.

NOZAL, M. J. et al. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). **Journal of Chromatography A**, v. 778, n. 1-2, p. 347-353, 1997.

NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO Journal**. v. 24, p. 1311-1317, 2005.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, Segunda edição, Editora Atheneu. São Paulo, 2003.

PEKARI, K. et al. Biological monitoring of exposure to styrene - assessment of different approaches. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 2, p. 115-126, 1993.

PEREIRA, B. et al. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, p. 226-230, 1992.

PERSSON, J. O.; TERELIUS, Y.; INGELMAN-SUNDBERG, M. CytochromeP450-dependent formation of reactive oxygen radicals: isoenzyme-specific inhibition of P450-mediated reduction of oxygen and carbon tetrachloride. **Xenobiotica**, v. 20, p. 887-900, 1990.

PIERCE, C. H. et al. Biological monitoring of controlled toluene exposure. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 71, p. 433-444, 1998.

PIERCE, C. H. et al. Toluene metabolites as biological indicators of exposure. **Toxicology Letters**, v. 129, p. 65-76, 2002.

PRASANTHI, R. P. J. et al. Calcium and zinc supplementation protects lead (Pb)-induced perturbations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mouse brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 2009. (*in press*).

RADAWAN, M. A.; EL-GENDY, K. S.; GAD, A. F. Oxidative stress biomarkers in the digestive gland of *Theba pisana* exposed to heavy Metals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 2009. (*in press*).

REILLY, P. M.; SCHILLER, H. J.; BULKLEY, G. B. Reactive oxygen metabolites in shock. **Scientific American Inc**, v. 8, p. 1-28, 1991.

ROCHA, J. B. T. et al. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology**, v. 100, p. 27-37, 1995.

ROCHA, J. B. T. et al. Effects of group 13 metals on porphobilinogen synthase in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 200, p. 169-176, 2004.

ROGERS, J. V.; GARRET, C. M.; McDOUGAL, J. N. Gene expression in rat skin induced by irritating chemicals. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, p. 123-137, 2003.

ROVER JR, L. et al. Sistema Antioxidante envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutathiona Associado a Métodos Eletroanalíticos na avaliação do estresse Oxidativo. **Química Nova**, v. 42, n. 1, p. 112-119, 2001.

RÜDIGER, H. W. Biomonitoring in occupational medicine. In: MARQUART, H.; SCHAFER, S.G. ; McCLELLAN, R.; WELSCH, F. **Toxicology**. San Diego: 1999.

RUEFF, J. et al. Genetic effects and biotoxicity monitoring of occupational styrene exposure. **Clinica Chimica Acta**, v. 399, p. 8-23, 2009.

SAMOTO, H. et al. Field survey on types of organic solvents used in enterprises of various sizes. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 79, p. 558-567, 2006.

SANDHIR, R.; GIL, K. D. Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. **Biological Trace Element Research**, v. 48, p. 91-97, 1995.

SASSA, S. ALA-D Porphyrin. **Seminars in Liver Disease**, v.18, p. 95-101, 1998.

SAWICKA, E.; DLUGOSZ, A. Toluene and p- xylene mixture exerts antagonistic effect on lipid peroxidation in vitro. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 21, n. 3, p. 201-209, 2008.

SCHENCK, L. et al. Risk assessment and occupational exposure limits. **Toxicology Letters/Abstracts**, v.180, p. 32-246, 2008.

SIES, H. et al. Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidative oxidation of glutathione by hydroperoxides. **FEBS Letters**, v. 27, n. 1, p. 171-175, 1972.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie**, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n.6, p. 1315-1321, 1995.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.

SOARES, J. C. M.; FOLMER, V.; ROCHA, J. B. T. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. **Nutrition**, v. 19, p. 627-632, 2002.

SOMASHEKARAIHAH, B.; PADJAMA, K.; PRASAD, A. R. K. Lead-induced lipid peroxidation and antioxidant defense components of developing chick embryos. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, p. 107-114, 1992.

SULLIVAN, J. B.; VAN ERT, M. Alkybenzene solvents and aromatic compounds. In: Sullivan, J. B.; KRIEGER, G. R. Hazardous materials toxicology clinical principles of environmental health. Baltimore, 1992.

SVENSSON, B. G. et al. Neuroendocrine effects in printing workers exposed to toluene. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 49, p. 402-408, 1992.

TABATABAIE, T.; FLOYD, R. A. Inactivation of glutathione peroxidase by benzaldehyde. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 141, n. 2, p. 389-393, 1996.

THIESEN, F. V. **Diagnóstico laboratorial do consumo de inalantes a base de tolueno: um estudo entre adolescentes de rua de Porto Alegre**, RS. Tese apresentada a Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Curso de Psicobiologia para obtenção do grau de Doutor. 2005.

TOFTGARD, R.; NILSEN, O. G. Effects of xylene and xylene isomers on cytochrome p-450 and in vitro enzymatic activities in rat liver, kidney and lung. **Toxicology**, v. 23, p. 197-212, 1982.

TRUCHON, G.; TARDIF, R.; BRODEUR, J. O-Cresol; A Good Indicator of Exposure to Low Levels of Toluene. **Applied Occupational and Environmental Hygiene**, v. 14, p. 677-681, 1999.

UCHIDA, Y. et al. Symptoms and signs in workers exposed predominantly to xylenes. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 64, p. 597-605, 1993.

UCHIDA, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 1685-1696, 2000.

ULAKOGLU, E. Z. et al. Alterations in superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: relationship between histopathological properties. **Pharmacological Research**, v. 38, p. 209-214, 1998.

UNGVÁRY, G. The effect of xylene exposure on the liver. **Acta morphologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 38, n. 1-2, p. 245-258, 1990.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54, 2003.

VAGIMIGLI, M. et al. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 40, p. 255-261, 2003.

VODICKA, P. et al. An evaluation of styrene genotoxicity using several biomarkers in a 3-year follow-up study of handlamination workers. **Mutation Research**, v. 445, p. 205-224, 1999.

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

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

YIIN, S. J.; LIN, T. H. Lead-catalyzed peroxidation of essential unsaturated fatty acid. **Biological Trace Element Research**, v. 50, p.167-172, 1995.

## **ANEXOS**

**ANEXO A** - Comprovante de submissão do manuscrito “**Effects of low levels exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers**” à Revista *Science of the Total Environment*.

Dear Dr Solange Garcia,

Your manuscript entitled "Effects of low levels exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers" has been successfully submitted and is now being reviewed for possible publication in Science of the Total Environment (STOTEN). You will be informed of the outcome of the review process as soon as we get comments back from the referees. This should normally take 6-10 weeks. Meanwhile, if you have any questions regarding your paper, please feel free to contact me. Thank you.

Sincerely,

Mark C. Livingston

Assistant Editor

Science of the Total Environment

**ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu,.....  
 data de nascimento ..../..../....., sexo ....., R.G:....., fui convidado(a) pela Profa. Dra. Solange Cristina Garcia a fazer parte de um trabalho científico intitulado **“ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DOS INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO TOLUENO E O ESTRESSE OXIDATIVO EM EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE A TINTAS”**.

Neste trabalho serão realizados exames que não costumam ser feitos nos laboratórios de análises clínicas, com o objetivo de avaliar (medir) os níveis de vitaminas (substâncias capazes de impedir a ação dos radicais livres, que podem causar doenças). Além de analisar substâncias na urina que demonstrem sua exposição ao tolueno (indicadores biológicos de exposição). Serão necessárias amostras de urina (em torno de 70 mL) e sangue (em torno de 10 mL), coletadas pós-jornada de trabalho (após 5 ou mais horas no ambiente de trabalho). Além destes exames serão realizadas entrevistas com questionários sobre o uso de medicamentos e o estado de saúde dos indivíduos. Isto será necessário para a realização de um trabalho de pesquisa de mestrado, onde será avaliado o nível de exposição ao tolueno e a relação com o estresse oxidativo, já que não existem muitos estudos na literatura. Fui esclarecido que minha participação é de livre e espontânea vontade e que caso aceite, será realizada uma coleta de sangue venoso, com o mínimo de risco já conhecido para esta técnica sem custo para o doador, além de uma amostra de urina.

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

Eu terei garantia da não identificação e do caráter confidencial dos resultados. Terei garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca de procedimentos, riscos, benefícios, contatando a professora Dra. Solange Cristina Garcia, responsável pelo projeto.

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

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

Santa Maria, novembro de 2009.

---

Assinatura do paciente ou responsável

---

Assinatura do responsável pela pesquisa