

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

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MARCADORES DE
DANO OXIDATIVO, GENOTOXICIDADE E
INFLAMAÇÃO EM TRABALHADORES EXPOSTOS A
SOLVENTES NO MUNICÍPIO DE SANTA MARIA, RS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lílian Marquezini da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MARCADORES DE
DANO OXIDATIVO, GENOTOXICIDADE E
INFLAMAÇÃO EM TRABALHADORES EXPOSTOS A
SOLVENTES NO MUNICÍPIO DE SANTA MARIA, RS.**

Lílian Marquezini da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profº. Drº. José Edson Paz da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

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

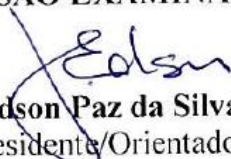
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MARCADORES DE DANO OXIDATIVO,
GENOTOXICIDADE E INFLAMAÇÃO EM TRABALHADORES
EXPOSTOS A SOLVENTES NO MUNICÍPIO DE SANTA MARIA, RS.**

elaborado por
Lilian Marquezini da Silva

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA


José Edson Paz da Silva, Dr.
(Presidente/Orientador)


Cristiane Luchese, Dr.^a. (UFPEL)


Natália Brucker, Dr.^a. (UFSM)

Santa Maria, 13 de março de 2015.

DEDICATÓRIA

Aos meus avôs,

Antônio Menezes da Silva e Dorival Marquezini,

E às minhas duas estrelas no céu, minhas avós

Nair Marques da Silva e Tereza Cavichioli Marquezini,

Obrigada pelo amor que me deram,

e pelo orgulho que sempre sentiram por mim.

Dedico a vocês esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao Universo, pela força que rege meus dias e equilibra minha vida; pelos desafios lançados e superados; pelos obstáculos propositadamente colocados, onde saberia que eu conseguiria transpô-los, com a positividade e a força incontestável das boas energias que somente ele me traz.

À minha família, meus pais Valter e Inajara, e meu irmão Patrick. Pra sempre obrigada por serem meus. O que sempre me motivou foi saber que, mesmo não me sentindo merecedora de tanto, sentem um orgulho gigante de mim. Nunca me senti tão grande assim, mas sempre busquei ser, por saber que pra vocês eu sempre fui uma cientista brilhante. Amo vocês infinitamente, com todas as células do meu corpo.

Ao meu amor, Maicom, por ter me encontrado. Pelas palavras diárias de incentivo. Pelo conforto do abraço e pelo carinho no momento em que preciso. Te amo pra sempre, pra vida inteira.

Ao professor José Edson, pela disponibilidade em me ajudar quando precisei, pelo exemplo de homem e mestre, pelo incentivo durante a graduação e pós-graduação. Sou muito grata ao senhor.

Ao professor Ricardo, pela paciência sem limite, pela amizade e pelos ensinamentos que ficarão como a maior lembrança destes dias. Meu profundo agradecimento por ter sido incansável na tarefa de me fazer crescer.

Agradeço com muita emoção, à UFSM, pelos 11 anos de construção do meu conhecimento. A esta instituição grandiosa, meu singelo obrigada pelas oportunidades a mim oferecidas, pelas experiências proporcionadas ao longo de todos esses anos, aos amigos que me trouxe e principalmente pelo aprendizado. Este é meu, e é para sempre.

Às minhas colegas de laboratório, equipe sensacional, sem a qual nada teria sido possível. Em especial, meus vagalumes, Tai, Laís, Eve e Helena, vocês são incríveis e têm um lugar mais que especial no meu coração. Obrigada por tudo, e pela companhia que fizeram destes dois anos um período muito mais feliz! Gurias, não tenho palavras para expressar toda a gratidão que tenho por vocês!

Para a minha Bizi Tai, um especial agradecimento pelo incentivo, principalmente no final deste percurso. A tua amizade foi o melhor resultado que obtive neste experimento chamado mestrado. Tua companhia teve significância de $p < 0,0001$, com toda a certeza. Forever Bizi's!

Aos meus afilhados, principalmente os pequenos tesouros que ganhei nos últimos dois anos e meio, Gregório, Ana Laura e Manuela, saibam que doeu não poder vê-los tanto como queria!

Ao PPGCF agradeço pela oportunidade oferecida e por mais uma etapa de aprendizado cumprida.

“Escrever é fácil. Você começa com uma maiúscula e termina com um ponto final. No meio, coloca idéias.”

(Pablo Neruda)

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MARCADORES DE DANO OXIDATIVO, GENOTOXICIDADE E INFLAMAÇÃO EM TRABALHADORES EXPOSTOS A SOLVENTES NO MUNICÍPIO DE SANTA MARIA, RS.

AUTORA: LÍLIAN MARQUEZINI DA SILVA
ORIENTADOR: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA.

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de março de 2015.

Os solventes orgânicos, também conhecidos como compostos orgânicos voláteis (COVs), ou hidrocarbonetos voláteis, são amplamente utilizados em uma variedade de processos industriais e produtos de consumo. Frentistas, assim como pintores, estão potencialmente expostos a estes hidrocarbonetos, tais como benzeno, tolueno e xileno. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar os achados laboratoriais em trabalhadores expostos a estes solventes. Amostras de sangue e urina foram recolhidas para verificar os indicadores biológicos da exposição a estes solventes, bem como marcadores de processo inflamatório, genotoxicidade e dano oxidativo. Os resultados demonstraram um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) no grupo de frentistas, enquanto que o grupo de pintores apresentou um aumento nos níveis de óxido nítrico (ON). Entre os marcadores de genotoxicidade, foi observado um aumento nos níveis de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) no grupo de frentistas e nos pintores, sendo que, neste último grupo, o aumento foi ainda maior. O grupo de frentistas também apresentou dano significativo ao DNA com relação ao grupo controle, que foi demonstrado pelo teste do cometa. Entre os marcadores inflamatórios, a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), os níveis mostraram-se aumentados em ambos os grupos, em comparação com o grupo controle, sendo que pintores apresentaram maiores níveis de IFN- γ em comparação aos frentistas. Os níveis de interleucina 10 (IL-10) foram reduzidos significativamente em ambos os grupos de trabalhadores expostos, quando comparados ao grupo não exposto. Além disso, foi observado um aumento significativo na atividade da alanina aminotransferase (ALT) em pintores. Os parâmetros hematológicos foram alterados nos pintores, que apresentaram uma redução na contagem de plaquetas e um aumento da hemoglobina corpuscular média (HCM). Os indicadores biológicos de exposição a estes solventes, ácido *trans, trans* mucônico (TMA) para o benzeno, ácido hipúrico (AH) para o tolueno e ácido metilhipúrico (mHA) para xileno, não apresentaram alterações significativas nos frentistas e pintores em relação aos controles. Apesar destes indicadores mantiveram-se dentro dos valores máximos admissíveis, mudanças expressivas foram observadas em outros marcadores, revelando principalmente alterações nos marcadores específicos para a inflamação e genotoxicidade.

Palavras-chave: exposição ocupacional, solventes orgânicos, benzeno, tolueno, xileno.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

EVALUATION OF DIFFERENT MARKERS OF OXIDATIVE DAMAGE, GENOTOXICITY AND INFLAMMATION IN WORKERS EXPOSED TO SOLVENTS IN SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

AUTHOR: LÍLIAN MARQUEZINI DA SILVA

ADVISOR: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

Place and Date of Defense: Santa Maria, March 13th, 2015.

The organic solvents, also known as volatile organic compounds (VOCs) or volatile hydrocarbons, are widely used in a variety of industrial processes and consumer products. Gas station attendants (G.S.A.), as well as painters, are potentially exposed to these hydrocarbons such as benzene, toluene and xylene. Thus, the main of this work was to verify laboratory findings in workers exposed to these solvents. Blood and urine samples were collected to verify the biological indicators of exposure to these solvents, as well as inflammatory, genotoxicity and oxidative damage markers. The results showed an increase in malondialdehyde (MDA) levels in the G.S.A. group, while painters group presented an increase in nitric oxide (NO) levels. Among the genotoxicity markers, an increase in 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels in G.S.A. and painters groups was observed and, in this last group, the increase was even greater. The G.S.A. group presented significant DNA damage compared to the control group, which was demonstrated by the comet assay. Among the inflammatory markers, interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ), the levels were increased in both groups compared with the control group, and painters showed higher levels of IFN- γ compared to the G.S.A. group. Interleukin-10 (IL-10) levels were significantly reduced in both groups of workers exposed, when compared to the unexposed group. Moreover, a significant increase was observed in alanine aminotransferase (ALT) activity in painters. Hematological parameters were changed in painters, since there was a reduction in platelet count and increase in mean corpuscular hemoglobin (MCH). The biological indicators of exposure to these solvents, trans, trans muconic acid (t, t mA) for benzene, hippuric acid (HA) for toluene and metilhipuric acid (mHA) for xylene, were not modified in G.S.A. and painters compared to control group. Despite these indicators remained within the maximum permissible values, significant changes were observed in other markers, revealing mainly changes in the specific markers for inflammation and genotoxicity.

Keywords: occupational exposure, organic solvents, benzene, toluene, xylene.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1- Estrutura química do benzeno.....	19
Figura 2- Estrutura química do tolueno.....	19
Figura 3- Estrutura química dos isômeros <i>orto</i> , <i>meta</i> e <i>para</i> -xileno	20
Figura 4- Biotransformação do benzeno.....	21
Figura 5- Biotransformação do tolueno.....	22
Figura 6- Biotransformação do <i>orto</i> -xileno.....	23
Figura 7- Ensaio cometa em condições alcalinas mostrando núcleos sem dano ao DNA e com diferentes níveis de dano.....	27
Figura 8- Potenciais mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da doença autoimune pela exposição a solventes (adaptado de Barragán-Martínez et al., 2012).....	31

MANUSCRITO

Figure 1- Effect of occupational exposure to organic solvents on the hematological parameters.....	63
Figure 2- Effect of occupational exposure to organic solvents on the malondialdehyde levels (MDA).....	63
Figure 3- Effect of occupational exposure to organic solvents on the nitric oxide levels (NO).....	64
Figure 4- Effect of occupational exposure to organic solvents on the 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) levels.....	64
Figure 5- DNA damage comparison between gas station attendants and painters with control.....	65
Figure 6- - Effect of occupational exposure to organic solvents on the interleukin-1 (IL-1) levels.....	65
Figure 7- Effect of occupational exposure to organic solvents on the interleukin-6 (IL-6) levels.....	65
Figure 8- Effect of occupational exposure to organic solvents on the tumor necrosis factor (TNF- α) levels.....	66
Figure 9- Effect of occupational exposure to organic solvents on the interleukin-10 (IL-10) levels.....	66
Figure 10- Effect of occupational exposure to organic solvents on the interferon gamma (INF- γ) levels.....	66

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1 - Relevants informations of study populations obtained through questionnaire individual application.....	61
Table 2 - Effect of occupational exposure to organic solvents on the AST, ALT and γ -GT activities, and on the serum uric acid and creatinine levels.....	62
Table 3 - Effect of occupational exposure to organic solvents on NPSH and AA contents and CAT and δ -ALA-D activities.....	62

LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO I - Questionário sobre uso e exposição ocupacional a solventes.....	81
ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INTRODUÇÃO

δ-ALA-D	δ-aminolevulinato desidratase
8-OHdG	8-hidroxi-guanosina
AH	Ácido hipúrico
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BM	Biomonitoramento
BTXs	Benzeno, tolueno, xileno
CAT	Catalase
CG	Cromatografia gasosa
CLAD	Cromatografia líquida de alto desempenho
COVs	Compostos orgânicos voláteis
CYP 2E1	Citocromo P450 2E1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERs	Espécies reativas
G-A	Mutações guanina-adenina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GN	Glomerulonefrite membranosa
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona S-redutase
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de oxigênio
HO•	Radicais hidroxila
HPAs	Hidrocarbonetos aromáticos
IBE	Indicador biológico de exposição

IBMP	Índice biológico máximo permitido
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LMA	Leucemia mielóide aguda
mHA	Ácido metilhipúrico
miRNA	Micro RNA
MN	Micronúcleos
NR	Norma regulamentadora
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{-•}	Ânion superóxido
PCMSO	Programa de controle médico de saúde ocupacional
pH	Potencial hidrogeniônico
Ppm	Partes por milhão
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
S-PMA	Ácido S-fenilmercaptúrico
<i>t,t</i> MA	Ácido <i>trans, trans</i> mucônico
Th	Células T auxiliares
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRK	<i>Technischer Wert der Konzentration in der Umwelt</i>
VRT	Valor de referência tecnológico
8-OHdG	8-hidroxideoxiguanosina

MANUSCRITO

AA	Ascorbic acid
ANOVA	Analysis of variance
E	Erythrocyte
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
G.S.A.	Gas station attendants

Hb	Hemoglobin
HCT	Hematocrit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMA	Ischemia-modified albumin
KH ₂ PO ₄	Monobasic potassium phosphate
KOH	Potassium hydroxide
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	Mean corpuscular volume
MDA	Malondialdehyde
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
NO	Nitric oxide
NPSH	Non protein thiol groups levels
<i>o</i> -C	Ortho cresol
PPE	Personal protective equipment
RDW	Red cell distribution width
RNOs	Reactive nitrogen species oxide
ROs	Oxygen reactive species
SEM	standard error mean
SLE	Systemic lupus erythematosus
TBARS	Thiobarbituric acid reative species
TOL-U	Urinary toluene
VOCs	Volatile organic compounds
WHO	World organization health
γ-GT	Gamma-glutamyltransferase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Toxicologia ocupacional.....	17
1.2. Solventes orgânicos.....	18
1.2.1. Aspectos Gerais.....	18
1.2.2. Principais Solventes.....	18
1.2.2.1. Benzeno.....	18
1.2.2.2. Tolueno	19
1.2.2.3. Xileno	20
1.2.3. Toxicocinética.....	20
1.2.3.1. Benzeno.....	20
1.2.3.2. Tolueno.....	21
1.2.3.3. Xileno.....	22
1.2.4. Toxicodinâmica e Principais Efeitos Tóxicos	24
1.2.4.1. Estresse Oxidativo.....	24
1.2.4.2. Genotoxicidade.....	25
1.2.4.3. Efeitos Carcinogênicos	27
1.2.2.4. Alterações em Parâmetros Inflamatórios	29
1.2.4.5. Demais Alterações Causadas pelos Solventes.....	31
1.3. Monitorização Biológica.....	32
1.3.1. Ácido trans, trans mucônico.....	33
1.3.2. Ácido hipúrico.....	34
1.3.3. Ácido metilhipúrico.....	35
1.4. Monitorização Ambiental	35
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. Objetivo Geral.....	37
2.2. Objetivos Específicos.....	37

3. MANUSCRITO.....	37
3.1.Evaluation of different markers of oxidative damage, genotoxicity and inflammation in workers exposed to solvents in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.....	38
ABSTRACT.....	39
1. Introduction.....	40
2. Material and Methods.....	41
3. Results.....	44
4. Discussion.....	46
References.....	53
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1. Toxicologia Ocupacional

A toxicologia ocupacional estuda os efeitos da exposição laboral a produtos químicos sobre a saúde do trabalhador prevenindo, assim, prejuízos em longo prazo (Lauwerys, 1996). Além disso, procura entender as relações causais entre exposição e efeito para que se possa atuar nas etapas iniciais do processo, quando os danos fisiopatológicos ainda são reversíveis. A exposição ocupacional é o período em que o ser humano se encontra suscetível à contaminação por xenobióticos que estão presentes no ambiente de trabalho. Essas substâncias podem ser absorvidas através das vias respiratória, cutânea, digestiva e placentária (Câmara, 1995). No caso dos solventes orgânicos, a absorção ocorre pela via respiratória e/ou cutânea, sendo predominantemente pela via respiratória (Bertoncello, 1999).

São muitas as atividades que envolvem risco ocupacional. Na agricultura, por exemplo, pode-se destacar o uso de pesticidas, onde trabalhadores rurais são simultaneamente expostos a uma mistura complexa de inseticidas, tais como organofosforados, piretróides, e organoclorados (Angerer et al., 2007), bem como fungicidas e herbicidas empregados na preparação e aplicação destes produtos químicos (Confederação Nacional da Agricultura, 2008). Na indústria metalúrgica, o trabalhador realiza processos de galvanização, cromação e zincagem de peças metálicas, entrando em contato com produtos químicos e vários elementos metálicos que podem causar danos ao organismo de quem os manipula. A indústria metalúrgica e metal-mecânica compõe o grupo de trabalhadores que registra o maior número de acidentes de trabalho, além de reunir riscos de diversas naturezas, que podem ser prejudiciais à saúde dos trabalhadores (Goldman, 2002; Gonçalves, 2011).

Os solventes orgânicos, também conhecidos como compostos orgânicos voláteis (COV), são amplamente utilizados em uma variedade de processos industriais e produtos de consumo (por exemplo, como constituintes de tintas, colas e combustíveis automotivos). Entre os trabalhadores expostos diariamente a estas substâncias, podemos destacar funcionários de postos de gasolina e pintores. Em níveis elevados de exposição, muitos compostos orgânicos voláteis são conhecidos por causar efeitos tóxicos graves, enquanto níveis baixos têm sido associados à inflamação das vias aéreas e alterações da função imune, com um risco subsequente para o desenvolvimento de alergias e asma (Diez et al., 2000; Lehmann et al., 2001, 2002).

1.2. Solventes orgânicos

1.2.1. Aspectos gerais

Os solventes orgânicos são o maior grupo de substâncias químicas usadas no ambiente de trabalho (Boman e Maibach, 2000; Bake, 2001). O termo COV é muito utilizado como sinônimo de solvente orgânico, sendo definido por diferentes metodologias de acordo com o país ou organização (Dewulf et al., 2002). No Brasil, os compostos orgânicos voláteis são definidos como compostos orgânicos que possuem alta pressão de vapor e que são facilmente vaporizados em condição de temperatura ambiente e pressão, possuindo pontos de ebulição na faixa de 50°C a 260°C, com exceção do metano (De Melo Lisboa et al., 2003).

Dos diversos solventes, benzeno, tolueno e xileno estão entre os amplamente utilizados em diversos processos químicos, industriais e comerciais. Cerca de 50% dos solventes sintetizados são empregados na produção de tintas e diluentes, onde o papel específico do solvente é evaporar-se depois de ter solubilizado e diluído as tintas, as quais são frequentemente aplicadas por pulverização (Costa et al., 2005). Xileno, tolueno, estireno, etilbenzeno, acetona e metiletilcetona são alguns dos mais frequentes e quantitativamente solventes representados na composição de tintas. (Costa et al., 2005). Um dos combustíveis mais comercializados é a gasolina, que consiste em uma mistura de hidrocarbonetos voláteis e inflamáveis derivados do petróleo. Sua composição depende da sua utilização, origem e dos processos de refino do petróleo. Os hidrocarbonetos aromáticos, como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno, constituem um grupo de substâncias presentes na gasolina (Coopman, 2007).

1.2.2. Principais solventes orgânicos

1.2.2.1. Benzeno

O benzeno apresenta-se na forma de líquido incolor, volátil, altamente inflamável. Quanto a sua solubilidade, mostra-se pouco solúvel em água, miscível com acetona, clorofórmio, éter e etanol; é solúvel em tetracloreto de carbono. Apresenta ponto de ebulição em 80,1 °C e ponto de fusão em 5,5 °C. Sua fórmula química é C_6H_6 , com massa molecular relativa de 78,1 g.mol⁻¹ (O'Neil, 2006; Lide, 2008) (Figura 1).

O benzeno é utilizado como um componente de tintas na indústria de impressão, como o material de partida e intermediário nas indústrias química e farmacêutica, e como um aditivo da gasolina, sendo que sua concentração nestes combustíveis é de 1-2% do volume.

(NTP, 2005; ATSDR, 2007; Williams et al., 2008). Entre as principais utilizações do benzeno atualmente, pode-se destacar a sua utilização na fabricação de produtos químicos orgânicos como: ciclohexano, utilizado na fabricação de nylon (15%); nitrobenzeno, um intermediário de anilina e de outros produtos (7%); alquilbenzeno, utilizado em detergentes (2%); clorobenzenos, utilizado em polímeros de engenharia (1%); e outros usos variados (1%) (Burridge, 2007; Kirschner, 2009).

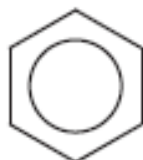


Figura 1: Estrutura química do benzeno.

1.2.2.2. Tolueno

O tolueno é um composto aromático também chamado de metilbenzeno por sua estrutura química. É um líquido incolor, volátil quando em pressão de vapor a 25°C, com propriedade significativa de lipossolubilidade e que apresenta traços de benzeno de até 25%, quando utilizado para fins comerciais (Oga, 2008). Apresenta ponto de ebulição em 110,6°C e ponto de fusão em -94,9°C (Lide, 1995). Mostra-se muito ligeiramente solúvel em água; é solúvel em acetona e miscível com dissulfureto de carbono, clorofórmio, éter dietílico, etanol e ácido acético glacial. Sua fórmula molecular é C_7H_8 , com massa molecular relativa de 92,14 (Budavari, 1996; Verschueren, 1996; Lide, 1997) (Figura 2).

É um solvente orgânico utilizado em muitos produtos, incluindo tintas industriais, adesivos, revestimentos e produtos de limpeza (Aylward; Barton; Hays, 2008). Embora o uso de tolueno nos locais de trabalho tenha diminuído, este continua sendo um dos solventes orgânicos mais utilizados na fabricação dos produtos listados acima (Samoto et al., 2006). Os níveis mais elevados de exposição ao tolueno são relacionados à pintura, impressão, indústria automotiva e fabricação de calçados (Pierce et al., 1998)

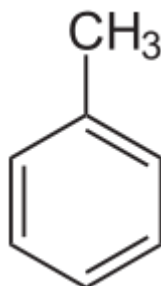


Figura 2: Estrutura química do tolueno

1.2.2.3. Xileno

É um líquido incolor (Budavari, 1996). Apresenta pontos de ebulição em 144,4°C (isômero *orto*), 139,1°C (isômero *meta*) e 138,3°C (isômero *para*) e pontos de fusão em -25,2°C (*orto*), -47,9°C (*meta*) e 13,3°C (*para*). Com relação à solubilidade, é insolúvel em água, miscível com etanol, éter dietílico e outros solventes orgânicos. Sua fórmula molecular é C₈H₁₀ e apresenta peso molecular de 106,17 g.mol⁻¹ (ACGIH, 1992) (Figura 3).

O xileno comercial é produzido a partir do petróleo ou do alcatrão de carvão e é um dos solventes mais comuns na indústria. É comumente usado como um aditivo em combustíveis da aviação, na impressão, em indústrias de couro e borracha, nas indústrias têxteis, e como constituinte de tintas, lacas, vernizes, corantes, adesivos e líquidos de limpeza (Low et al., 1995). O xileno comercial é uma mistura das três formas isoméricas, *orto* (*o*-), *meta* (*m*-) e *para* (*p*-), sendo geralmente o *m*-xileno o principal componente, correspondendo a 45-70% do total (National Occupational Health and Safety Commission, 2002).

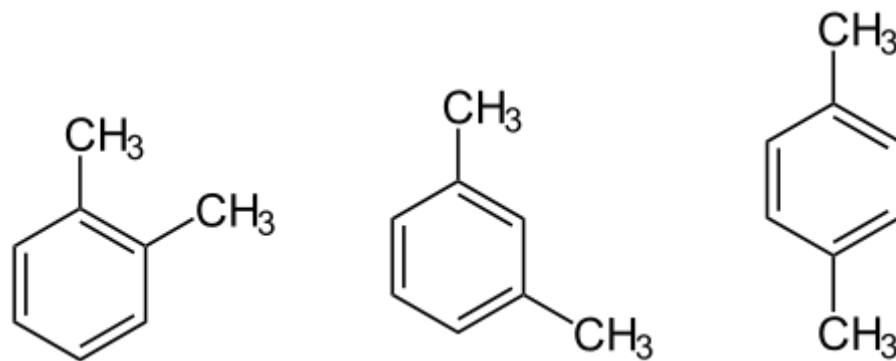


Figura 3: Estrutura química dos isômeros *orto*, *meta* e *para*-xileno.

1.2.3. Toxicocinética

1.2.3.1. Benzeno

O benzeno é rapidamente absorvido através da via oral e inalatória. A difusão passiva do benzeno inalado, através da membrana alvéolo-capilar, aumenta os níveis de benzeno no sangue. A absorção dérmica também é rápida, no entanto, quantitativamente, a absorção por esta via é muito baixa devido à evaporação rápida deste solvente. O benzeno é rapidamente distribuído no organismo e um acúmulo no tecido adiposo pode ser observado (Low et al., 1995). Outros locais de distribuição do benzeno são: medula óssea, fígado, rins, pulmões, cérebro, entre outros tecidos (Rickert et al., 1979). Com relação a biotransformação, o

benzeno é oxidado pelo citocromo P450 2E1 (CYP2E1) originando benzeno epóxido (Figura 4), que pode ser conjugado com a glutationa (GSH) e formar ácido S-fenilmercaptúrico urinário (S-PMA). O benzeno epóxido também pode ser metabolizado a ácido *trans, trans*-mucônico (*t,t*-MA) e excretado na urina (Van Sittert et al., 2000; Albertini et al., 2003; Fustinoni et al., 2004). Outros metabólitos gerados através da oxidação do benzeno epóxido são o fenol, o catecol, e a p-hidroquinona, a qual ainda pode ser metabolizada em p-benzoquinona (Low et al., 1995). Alguns destes metabólitos apresentam grande importância toxicológica, como descrito posteriormente. É importante ressaltar que algumas substâncias podem interferir no processo de biotransformação do benzeno, como por exemplo, o etanol e a anilina, as quais podem induzir a atividade do CYP2E1 (Snyder e Hedli, 1996).

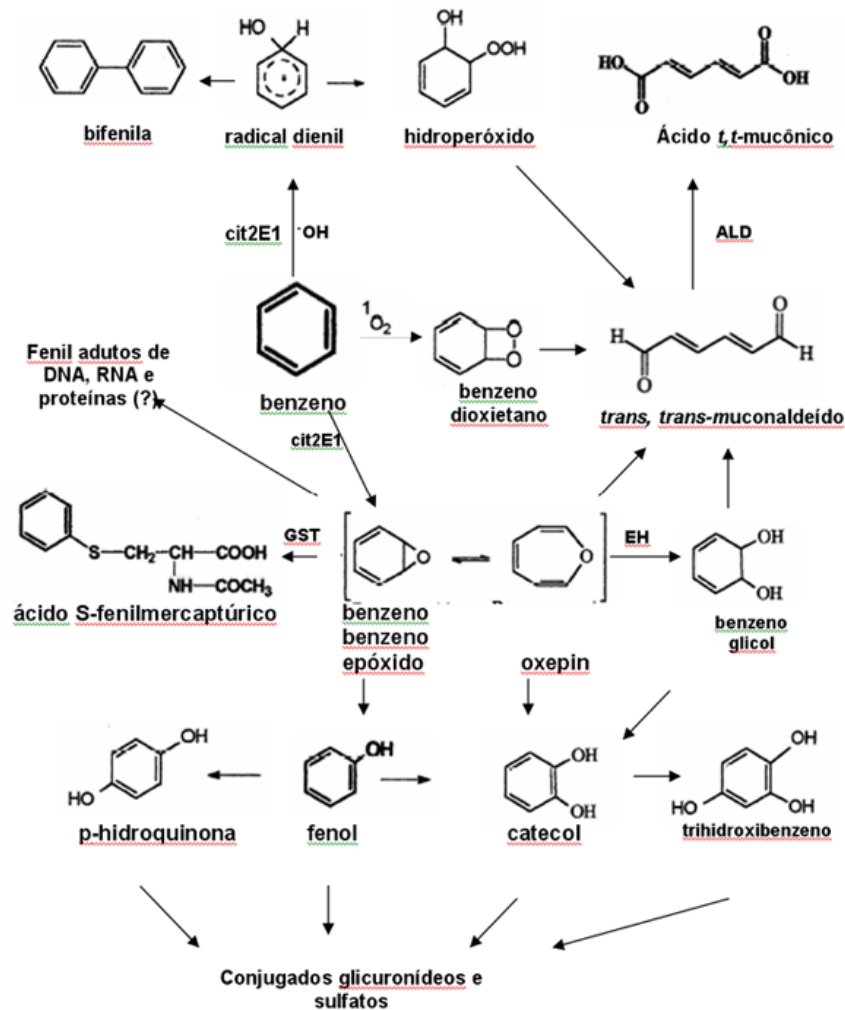


Figura 4: Biotransformação do benzeno.

1.2.3.2. Tolueno

A absorção do tolueno ocorre principalmente pela via pulmonar, sendo que cerca de 40% do tolueno inalado é absorvido pelos pulmões. Este solvente também é bem absorvido pela via oral (Baelum et al., 1993) e lentamente pela via dérmica (Dutkiewicz, Tyras, 1968). Com relação a distribuição, os principais tecidos onde o tolueno se deposita são fígado, pâncreas, coração, cérebro e tecido adiposo (Ameno et al., 1989). A principal via de biotransformação é a oxidação do grupamento metila. O primeiro passo corresponde à formação do álcool benzílico, mediado pelo citocromo P450. Segue-se a oxidação a benzaldeído, pela ação de álcool desidrogenase e finalmente a formação do ácido benzóico, etapa catalisada pela enzima aldeído desidrogenase. Este ácido se conjuga principalmente com a glicina, formando o ácido hipúrico e em menor proporção com o ácido glicurônico, produzindo benzoilglicuronatos, os quais são excretados na urina (Larini, 1998; Carvajal et al., 2004; Oga, 2008) (Figura 5).

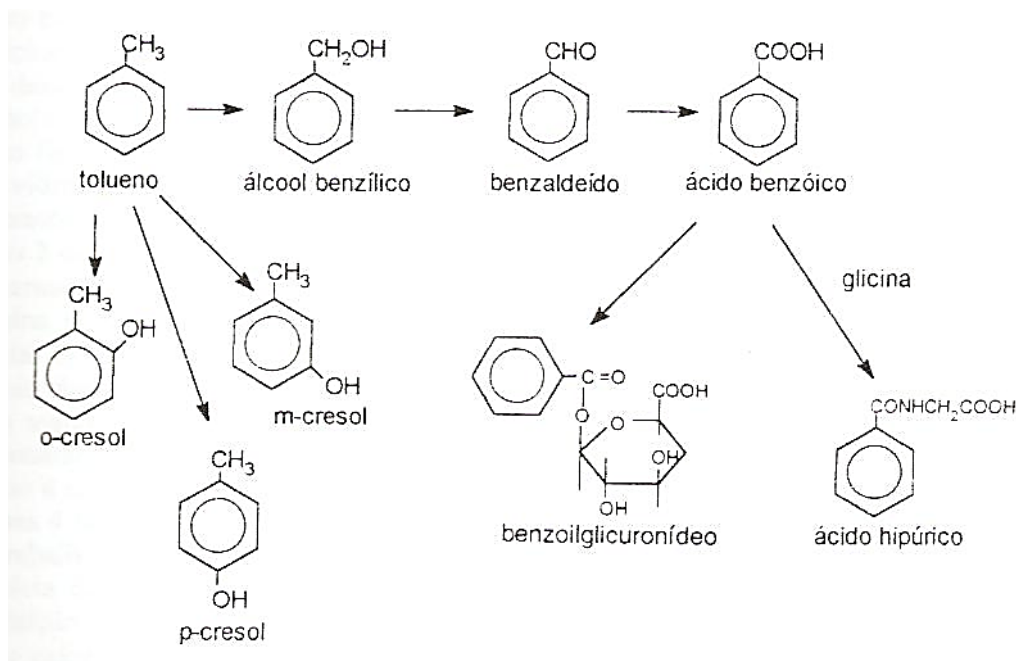


Figura 5: Biotransformação do tolueno.

1.2.3.3. Xileno

O xileno é normalmente absorvido pelas vias pulmonar e oral, sendo que sua absorção através da pele é insignificante em condições normais de exposição (ATSDR, 1995). Em indivíduos expostos à concentração de 200 a 400 mg/m³ durante 8 horas, 64% dos isômeros *orto*, *meta* e *para* xileno são absorvidos pelos pulmões. Somente uma proporção de 3 a 6% da

dose absorvida é excretada inalterada no ar expirado e a excreção urinária é desprezível. Cerca de 95% do xileno absorvido é biotransformado e excretado na urina. A distribuição deste solvente ocorre em tecidos como fígado, cérebro e tecido adiposo (Larini, 1998; Oga, 2003). A sua biotransformação (Figura 6) compreende a oxidação de um dos grupos metil com formação do ácido metilbenzóico correspondente, o qual é posteriormente excretado após conjugação com a glicina. Nesta biotransformação ocorre primeiramente uma hidroxilação nos microsomas hepáticos com formação do derivado alcoólico, que sofre uma oxidação no citosol, através da enzima álcool desidrogenase, produzindo o metilbenzaldeído, que, por interferência da aldeído desidrogenase, produz o ácido metilbenzóico (Blanchard; Morris, 1994; Larini, 1998; Oga, 2003). A excreção do ácido metilhipúrico, resultante da condensação do ácido metilbenzóico com a glicina, aumenta rapidamente durante as primeiras horas de exposição, tendendo a diminuir cessada a exposição, com uma velocidade bastante rápida nas primeiras seis horas e mais lenta nas horas subsequentes. Sua excreção urinária é reduzida nas pessoas obesas em função da retenção do xileno no tecido adiposo (Oga, 2003). O ácido metilhipúrico representa mais de 95% da fração metabolizada do xileno (Klaassen et al, 2001).

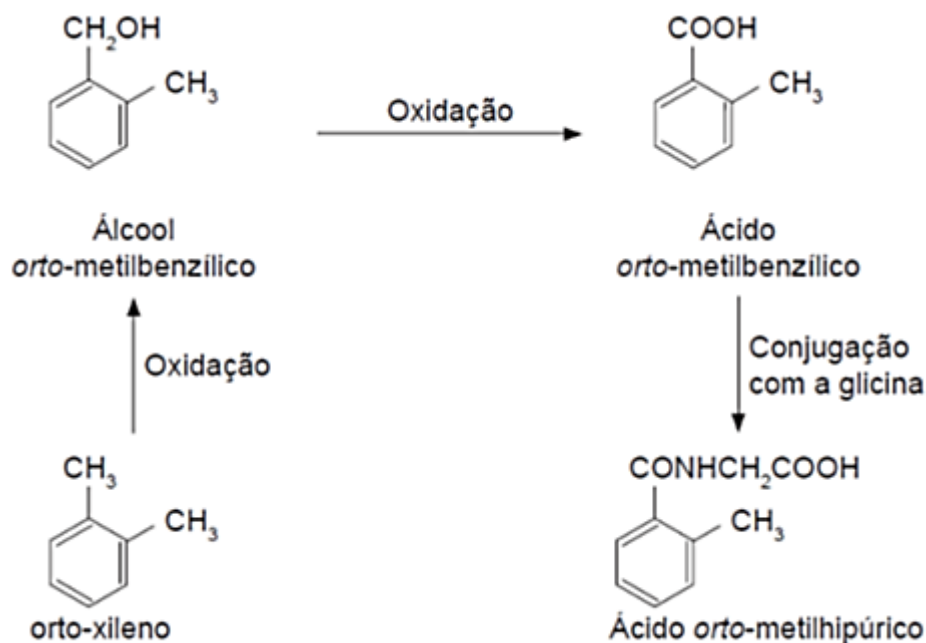


Figura 6: Biotransformação do *orto*-xileno (Fonte: U.S. EPA, 2003).

1.2.4. Toxicodinâmica e principais efeitos tóxicos

1.2.4.1. Estresse Oxidativo

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. As espécies reativas (ERs) têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, o excesso de espécies reativas causa o chamado estresse oxidativo, que resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante (Schafer and Buettner, 2001; Finkel; Holbrook, 2000), com predomínio dos oxidantes e dano conseqüente. A célula possui uma série de defesas capazes de evitar o efeito deletério destas ERs. Estas defesas são comumente chamadas de defesas antioxidantes, e podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os organismos possuem um complexo sistema de defesa antioxidante, com uma parte enzimática e uma não-enzimática, que agem de forma conjunta e dinâmica em sua defesa. Entre as principais defesas antioxidantes não-enzimáticas da célula estão o ácido ascórbico, carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e a glutatona reduzida (GSH), todos sendo estabilizadores de radicais. As defesas antioxidantes enzimáticas também são fundamentais. Entre as principais estão as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a glutatona-S-transferase (GST). A CAT age decompondo diretamente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual resulta da dismutação do ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$ em água e oxigênio (O_2) (Niki, 2004; Stocker; Keaney-Jr, 2004). A GST, considerada a principal enzima detoxificante da fase II, desempenha papel fisiológico na iniciação da detoxificação de xenobióticos através de reação de conjugação destes com a GSH, tornando os produtos da reação menos tóxicos e hidrossolúveis, facilitando a excreção (Lam et al., 1982; Lam et al. 1994; Wattenberg, 1983; Wheatley et al., 1994).

Em vários laboratórios, utilizando uma variedade de sistemas experimentais, a toxicidade induzida por solventes como o benzeno, tem sido associada à produção de EROs, incluindo $O_2^{\cdot-}$, radicais hidroperoxila, e os altamente reativos radicais hidroxila ($HO\cdot$) (Kolachana et al., 1993; Winn, 2003). Estas espécies podem agir como moléculas sinalizadoras que afetam a regulação do gene do crescimento, expressão e morte celular (Wan; Winn, 2008). Também já foi demonstrado que o metabólito reativo do benzeno, a p-benzoquinona, pode depletar os níveis celulares de GSH (Brunmark e Cadenas, 1988). O tolueno é outro solvente que está associado ao estresse oxidativo, uma vez que pode causar a

inibição das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx) (Kodavanti et al., 2011). De fato, alterações oxidativas já foram demonstradas em pintores, como o aumento na peroxidação lipídica e a inibição da atividade da δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), enzima sulfidrílica que atua na síntese do grupamento heme (Moro et al., 2010). Em outro estudo, também foi demonstrado que pintores podem apresentar um aumento nos níveis de proteína carbonila e albumina modificada pela isquemia, que são marcadores de oxidação proteica (Moro et al., 2012).

O reconhecimento dessa relação estimulou o desenvolvimento de estudos de marcadores de dano oxidativo e de substâncias antioxidantes em sistemas biológicos. Segundo Zwart e colaboradores (1999) e LaBaer (2005), os biomarcadores têm características passíveis de avaliação e mensuração, como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Como tal, refletiriam mudanças em sistemas biológicos relacionadas à exposição ou aos efeitos de xenobióticos, ou outros tipos de fatores. Eles podem ser classificados, segundo os mesmos autores, como biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade.

1.2.4.2. Genotoxicidade

A associação entre genotoxicidade e solventes já foi descrita previamente e pode envolver a geração de espécies reativas, descritas anteriormente. De fato, uma via de biotransformação do tolueno conduz à formação de epóxidos, o que pode gerar EROs, podendo causar estresse oxidativo e dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (Murata et al., 1999). Em estudo de Moro et al. (2012) foi verificada uma correlação positiva entre os níveis sanguíneos de tolueno e dano ao DNA e também houve uma correlação positiva entre os níveis urinários de ácido hipúrico e dano ao DNA. A oxidação do DNA tem potenciais consequências genotóxicas (Martínez-Alfaro et al., 2010) e implica na patogênese de várias doenças (Costa et al., 2005), incluindo câncer e doenças neurodegenerativas (Gérin et al., 1998; Marlatt et al., 2008).

Com relação ao benzeno, Angelini et al. (2011) reportaram que a genotoxicidade do benzeno e demais poluentes atmosféricos, pode estar associada com uma superprodução de EROs, e que um desequilíbrio nestas espécies poderia contribuir para a instabilidade genômica, levando a deleções, quebras no DNA, rearranjos, alterações cromossômicas (estruturais e numéricas) e dano oxidativo ao DNA. De fato, o benzeno pode causar quebras de cadeia simples, quebras em cadeias duplas, que podem ser expressas através de aberrações

cromossômicas e formação de micronúcleos (MN) (Zhang et al, 1993; Kim et al, 2004). Além disso, sabe-se que os metabólitos reativos do benzeno, como o benzeno epóxido e a p-benzoquinona, podem formar adutos covalentes com o DNA, o que pode ocorrer mesmo após exposição a baixas concentrações de benzeno no ambiente. Estas ligações covalentes ao DNA foram demonstradas primeiramente por Lutz e Schlatter (1977). Os metabólitos do benzeno também podem interferir no processo de mitose, uma vez que interferem na utilização de guanosina trifosfato (GTP), que é importante para este processo (Pfeifer e Irons, 1983). Uma outra explicação para a genotoxicidade induzida pelo benzeno é que alguns metabólitos deste solvente podem inibir a atividade da topoisomerase II, a qual é uma enzima importante para a manutenção da estrutura do DNA (Frantz et al., 1996). De fato, vários estudos têm demonstrado que a exposição *in vivo* ao benzeno e a exposição *in vitro* aos seus metabólitos, p-hidroquinona e p-benzoquinona, podem causar a inibição da enzima topoisomerase II, levando a um aumento na clivagem do DNA (Lindsey et al., 2004; Whysner et al., 2004). Alterações na molécula de ácido ribonucleico (RNA) também foram reportadas em relação ao benzeno. Bai et al. (2014) verificaram que a expressão de micro RNA (miRNA), que são pequenas moléculas de RNA que regulam a expressão de genes e desempenham um papel importante na hematopoese e diferenciação celular, foram alteradas após exposição crônica a este solvente.

Existem alguns protocolos que são bastante úteis na detecção de alterações no material genético. As EROs, incluindo HO• e H₂O₂, reagem com os resíduos de guanina no DNA e produzem a 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG). A guanosina oxidada é mal interpretada como uma adenina na replicação do DNA, e é elaborado um reparo para evitar o acúmulo de mutações G-A. Esta guanina oxidada (8-OHdG) é também um marcador para a suscetibilidade ao câncer (Erhola et al., 1997; Halliwell et al., 2000), diabetes mellitus (Leinonen et al., 1997) e de doenças neurodegenerativas, incluindo Doença de Alzheimer (Mecocci et al., 1998) e doença de Parkinson (Sato et al., 2005; Chen et al., 2009). Uma vantagem de se dosar o 8-OHdG é que este marcador pode estar alterado mesmo quando há exposição a baixos níveis de benzeno no ambiente (Liu et al., 1996; Lagorio et al., 1994). Além disto, uma relação dose-resposta foi observada entre os níveis de 8-OHdG e exposição ao benzeno (Popp et al., 1991)

Outro marcador bastante utilizado nas avaliações de genotoxicidade é o ensaio do cometa, o qual é um método simples que pode ser aplicado tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo utilizado como um biomarcador sensível, que revela dano ao DNA causado diretamente por agentes oxidantes, ou indiretamente por substâncias que podem gerar radicais livres (Fairbairn

et al., 1995; Fracasso et al., 2002). A figura 7 descreve os diferentes níveis de dano ao DNA, que podem ser verificados microscopicamente através deste ensaio. Singh e colaboradores (1988) modificaram o protocolo originalmente desenvolvido por Östling e Johanson (1984), e incluíram condições alcalinas para o desenrolamento do DNA ($\text{pH} > 13$). Neste pH, o aumento da migração de DNA está associado com o aumento dos níveis de quebras de cadeia simples, associados a reparo de sítios de excisão incompletos, e locais alcalino-lábeis (Singh et al., 1988). Como quase todos os agentes genotóxicos induzem quebras de cadeia simples e/ou locais alcalino lábeis em maior número do que quebras de cadeias duplas, esta versão do ensaio oferece uma sensibilidade muito maior para identificar agentes genotóxicos. Este ensaio tem ganhado ampla utilização em várias áreas, incluindo a biomonitorização humana, genotoxicologia, monitoramento ecológico e como uma ferramenta para a investigação de danos ao DNA ou reparação em diferentes tipos de células em resposta a uma gama de agentes prejudiciais ao DNA (Collins, 2004).

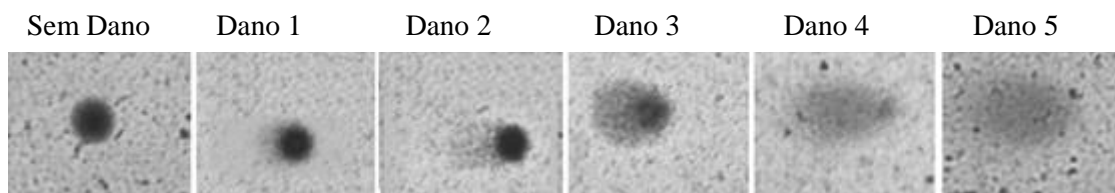


Figura 7: Ensaio cometa em condições alcalinas, mostrando núcleos sem dano ao DNA e com diferentes níveis de dano (Fonte: Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus UFSM, Santa Maria, RS, Brasil).

1.2.4.3. Efeitos carcinogênicos

O aumento da utilização de produtos petrolíferos em automóveis e na indústria levou a uma deterioração da qualidade do ar, trazendo riscos para a saúde humana. Estes produtos contêm um grande número de agentes tóxicos que são considerados carcinogênicos para os seres humanos (EPA, 2002). A exposição a estes hidrocarbonetos aromáticos não-oxigenados é de grande preocupação devido à sua toxicidade e carcinogenicidade, mesmo em baixas concentrações (Greer, 1984; Kozel et al., 1995; Spiller e Krenzelok, 1997).

O benzeno, em especial, é conhecido por ser cancerígeno para os seres humanos. Entre outros compostos, o benzeno epóxido, que é formado durante seu metabolismo, é sugerido como um dos compostos carcinogênicos finais do benzeno (IARC, 1988). A indução de

leucemia e vários tipos de linfomas foi confirmada a partir de vários estudos epidemiológicos em populações expostas ao benzeno (Whysner et al., 2004; Lamm et al., 2005; Smith et al., 2007). Além disso, um estudo entre trabalhadores expostos ao benzeno em Xangai, China, observou risco aumentado de envenenamento por benzeno, que foi associado com leucemia não-linfocítica aguda e relacionado com síndromes mielodisplásicas (Rothman et al., 1997).

A explicação para o efeito tóxico do benzeno sobre a medula óssea consiste, basicamente, no efeito mielotóxico de alguns de seus metabólitos. Já foi demonstrado que metabólitos como o fenol, catecol e p-hidroquinona, gerados através de metabolização hepática, podem ser transportados para a medula óssea (Low et al., 1995). Uma outra hipótese está relacionada com a produção destes metabólitos tóxicos através de biotransformação na própria medula óssea (Subrahmanyam et al., 1990). De fato, uma peça chave na indução de leucemia pelo benzeno parece ser a conversão de p-hidroquinona em p-benzoquinona na medula óssea, através de reação catalisada pela mieloperoxidase (Smith, 1996). O fato é que estes metabólitos, especialmente o benzeno epóxido e a p-benzoquinona, são eletrofilicos e podem reagir com proteínas e DNA presentes no tecido medular (Gaskell et al., 2005; Henderson et al., 2005). Existem alguns estudos que demonstram que a leucemia mielóide aguda, induzida pelo benzeno, tem relação com a inibição da enzima topoisomerase II (Mistry et al., 2005; Pedersen-Bjergaard et al., 2008). Segundo alguns autores, existem outros mecanismos que podem estar envolvidos na indução de leucemia pelo benzeno, tais como a geração de estresse oxidativo, disfunções no sistema imunológico, inibição das junções Gap, entre outros (Rivedal e Witz, 2005; Li et al., 2009). Já com relação ao linfoma, existem dois mecanismos principais relacionados com a exposição ao benzeno: a indução de rearranjos cromossômicos e a imunossupressão (Zhang et al., 1999; 2007).

Vários solventes orgânicos têm sido associados também a tumores mamários em roedores. Uma abrangente compilação de dados de estudos com animais, incluindo as avaliações realizadas pela Agência Internacional de Pesquisas Sobre o Câncer (IARC) e pelo Programa Nacional de Toxicologia dos EUA, listou trinta solventes orgânicos que causaram tumor maligno na glândula mamária (Rudel et al., 2007). Porém, entre estes produtos químicos, somente o benzeno foi classificado pela IARC como carcinogênio em humanos (Grupo 1), e esta classificação baseou-se nas ligações estabelecidas com a leucemia mielóide aguda (LMA) e não com câncer de mama.

Existem poucas investigações sobre a associação de solventes com o risco de câncer de fígado, com exceção de tricloroetileno e tetracloroetileno (Weiss, 1996). Os dados sobre a carcinogenicidade no fígado para outros tipos de solventes são limitados. (IARC, 1999). Um

estudo italiano mais recente, no entanto, sugeriu que a exposição prolongada ao tolueno e xileno pode representar um fator de risco para câncer no fígado (Porru et al., 2001).

Com relação a câncer renal e pulmonar, os dados são contraditórios. Em estudo de Pesch et al. (2000) foi observada uma relação entre exposição ao benzeno e risco de câncer renal. Entretanto, o estudo de Gérin et al. (1998) demonstrou poucas evidências de uma associação entre câncer nos rins e a exposição ao benzeno. Com relação ao câncer pulmonar, da mesma forma, alguns estudos demonstram haver correlação com o benzeno (Hayes et al., 1996; Collins et al., 2003), enquanto outros não observaram este efeito (Gérin et al., 1998).

1.2.4.4. Alterações em parâmetros inflamatórios

As alterações nos marcadores inflamatórios e a maneira como a exposição ocupacional é determinada, ainda são questões em aberto (Collins et al., 1997; Bogadi-Sâre et al., 2000; Tanigawa et al., 2001; Rhodes et al., 2003). Os efeitos sobre a resposta imune inata podem ser avaliados usando diferentes parâmetros, entre os quais destacam-se a produção de citocinas, que incluem as interleucinas-1 (IL-1), 6 (IL-6) e 10 (IL-10), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) e são um conjunto de componentes solúveis que formam uma parte importante do arsenal contra vírus, bactérias e/ou material externo nocivo (Hernandez, 2001).

As citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e γ -INF) são produzidas por muitas populações de células, mas os produtores predominantes são as células T auxiliares (Th) e os macrófagos (Xie et al., 2006). O TNF- α é um mediador chave de ambas as reações inflamatórias agudas e crônicas sistêmicas e estimula a produção de outras citocinas inflamatórias e quimiocinas (Chu, 2013). O IFN- γ é reconhecido como um mediador na imunidade inata, assim como na imunidade adaptativa (Ramana et al., 2002). Entre as atividades biológicas do IFN- γ , a ativação dos macrófagos é de importância fundamental. Deste modo, regula positivamente a produção de uma variedade de parâmetros pró-inflamatórios como as interleucinas (Yoshida et al., 1994; Doherty et al., 1996), TNF- α (Hayes et al., 1995) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Xie et al., 1993). Interleucinas tais como IL-1 e IL-6 são conhecidas por participar da regulação da síntese de prostaglandinas endometriais em muitas espécies, na qualidade de citocinas pró-inflamatórias (Franczak et al., 2012), enquanto que a IL-10 é um mediador importante das respostas imunes anti-inflamatórias (Mosmann e Coffman, 1989).

No sistema imune e inflamação, o óxido nítrico (ON) endógeno parece ter efeitos pró e anti-inflamatórios (Nathan, 1992). Os efeitos pró-inflamatórios não são evidentes em condições fisiológicas agudas e o ON pode, nestes casos, mediar as funções anti-inflamatórias

tais como a inibição da adesão de neutrófilos, inibição da atividade da ciclo-oxigenase, bem como redução na formação de citocinas (Schmidt; Walter, 1994). Estas atividades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias relacionadas ao ON dependem de alguns fatores, como o sub-tipo enzimático que atua na sua síntese, o local onde ele é produzido e quanto dele é produzido. Pequenas quantidades de ON, derivadas da ação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), parecem ser benéficas, uma vez que inibem a adesão e migração de células inflamatórias (Laroux et al., 2001). No entanto, quantidades relativamente elevadas de ON, produzidas pela iNOS, podem contribuir para o processo inflamatório, uma vez que há aumento na infiltração de leucócitos, por exemplo (Nagy et al., 2007).

Existem poucos artigos na literatura que relacionam a exposição a solventes e inflamação, no entanto, é de nosso conhecimento que os solventes orgânicos e seus metabólitos podem causar a ativação de células B e T. A figura 8 mostra uma esquematização dos prováveis mecanismos envolvidos na resposta inflamatória a esta exposição. A ativação das células B pode promover a liberação de anticorpos, o que se relaciona com a inflamação e doença autoimune. A ativação de células T promove a ativação dos macrófagos, com o aumento da produção de ON e citocinas. O processo de inibição da apoptose induzida por solventes também pode ativar as células T. Além disso, o estresse oxidativo e a formação de proteínas cloroacetiladas após a exposição a solventes, podem aumentar a suscetibilidade a ativação de células T e B, o que contribui para um processo inflamatório. De fato, as proteínas, que são modificadas pelos solventes podem tornar-se imunogênicas, sendo reconhecidas como moléculas estranhas, e, em seguida, iniciam uma resposta inflamatória ao tecido lesionado (Povey 2001; Wang et al., 2007; Cai et al., 2008). No entanto, autores têm descrito que o benzeno, devido a sua hematotoxicidade, poderia afetar os níveis de macrófagos e, desta forma, reduzir os níveis de IL-1, que são produzidos por este tipo celular (Cox, 1991). De fato, pacientes com anemia aplástica apresentam redução nos níveis de IL-1 (Renz e Kalf, 1991). Além disso, os metabólitos do benzeno podem inibir a conversão de pré-IL-1 α e pré-IL-1 β em suas respectivas formas ativas (Renz e Kalf, 1991; Niculescu et al., 1996).

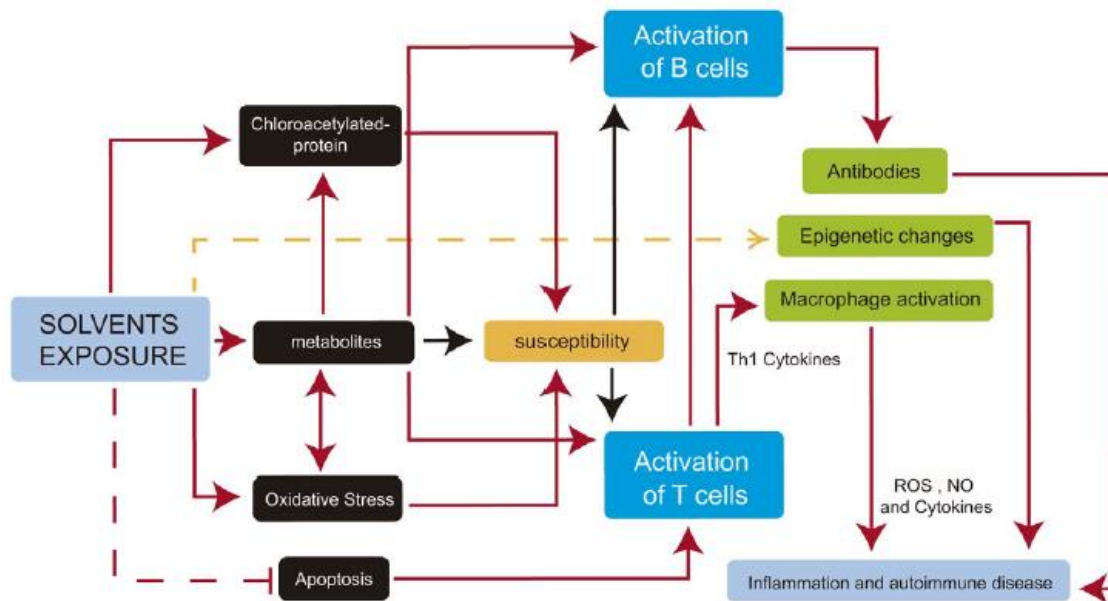


Figura 8: Potenciais mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da doença auto-imune induzida pela exposição a solventes. As setas vermelhas sólidas representam caminhos conhecidos. A seta tracejada amarela representa mecanismos hipotéticos, e a linha vermelha tracejada representa um processo inibido. Em indivíduos suscetíveis, os caminhos de ativação são mais fortes (setas pretas) (Fonte: adaptado de Barragán-Martínez et al., 2012).

1.2.4.5. Demais alterações causadas pelos solventes

A exposição a diferentes solventes orgânicos tais como gasolina, benzeno, tolueno, xileno, inseticidas e pesticidas, entre outros, tem sido associada com problemas de saúde agudos e crônicos (Eglíte, 2000; Dick, 2006). Durante as últimas duas décadas, as pesquisas epidemiológicas declararam uma conexão entre uma exposição ocupacional duradoura a solventes orgânicos e sintomas não específicos, principalmente sobre o sistema nervoso central (SNC), tais como dor de cabeça, fadiga, tonturas, irritabilidade, distúrbios de memória, habilidades intelectuais reduzidas, dificuldades de concentração, instabilidade emocional, depressão e distúrbios do sono. O mecanismo exato de ação dos solventes sobre o SNC é desconhecido, mas as teorias comuns são: desaceleração generalizada do transporte no canal iônico axonal e potenciação da hiperpolarização de receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), o que pode ser uma explicação para os efeitos depressores destes solventes (Lorenc, 2003). Foram também relacionados a esta exposição, a tolerância reduzida ao álcool, irritação nos olhos, alterações dérmicas, queixa respiratória e alterações nos processos naturais de envelhecimento, entre outros (Xiao e Levin, 2000; Nilson et al., 2002; D'Ambros, 2009).

A inalação destes solventes pode trazer, além dos sintomas de neurotoxicidade acima citados (normalmente atribuídos ao tolueno), efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos (geralmente

associados com a exposição ao tolueno e xileno). Em estudo de Bell e Howse (2005), foi demonstrado que indivíduos expostos a esses produtos químicos têm uma maior incidência de glomerulonefrite membranosa (GN), um rápido aumento da creatinina sérica após o diagnóstico da GN, e uma incidência mais elevada de marcadores precoces de doenças renais, tais como enzimúria tubular. Barberino et al. (2005) e Carvalho et al. (2006), observaram alterações nas enzimas hepáticas frente a exposição ocupacional em trabalhadores do refino de petróleo. Da mesma forma, foram observados aumentos na atividade das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), as quais funcionam como marcadores de dano hepático, em pintores (Moro et al., 2012).

Devido a supressão da medula óssea, efeito este mais frequentemente relacionado à ação mielotóxica do benzeno, pode ocorrer também leucopenia, anemia, trombocitopenia e hemólise (Broussard, 2000; Graciani; Ferreira; Salviano, 2008). Estes componentes tóxicos, sobretudo o benzeno, têm sido relacionados com mudanças químicas no sangue e indução de anemia, por causar hipoplasia da medula óssea em estudos com animais experimentais (Yakubu; Akanji; Oladiji, 2007). O xileno também está associado a efeitos hematotóxicos como leucopenia e trombocitopenia (Jacobson; McLean, 2003; Costa et al., 2005; Keretsetse et al., 2008, Castro et al., 2010).

1.3. Monitorização biológica

A monitorização biológica complementa o controle ambiental e a vigilância à saúde, considerando-se que determina a exposição global diretamente do indivíduo e detecta efeitos precoces e reversíveis, proporcionando uma melhor estimativa de risco. Esta monitorização dá-se através da quantificação dos indicadores biológicos de efeito e de exposição (IBEs). Os indicadores biológicos de exposição podem ser os próprios xenobióticos e/ou seus metabólitos dosados em amostras biológicas do trabalhador. Já os indicadores de efeito estão relacionados com alguma alteração biológica causada pelo xenobiótico. Desta forma, verificam-se se os níveis encontrados permanecem dentro dos índices biológicos máximos permitidos (IBMP) que são determinados por meio de estudos epidemiológicos, experimentais e casos clínicos (Amorim, 2003).

Segundo a Norma Regulamentadora N.º 7, de 29 de dezembro de 1994, o IBMP é o valor máximo do indicador biológico para o qual se supõe que a maioria das pessoas ocupacionalmente expostas não corre risco de dano à saúde. A ultrapassagem deste valor

significa exposição excessiva. O material biológico preconizado para determinação dos IBEs do tolueno e xileno é a urina, e o método determinado pela legislação deve ser cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD) ou cromatografia em fase gasosa (CG). Para determinação do IBMP em trabalhadores expostos ao tolueno e xileno, a coleta de amostra de urina deve ser realizada ao final do último dia de jornada de trabalho. O benzeno, por tratar-se de um agente carcinogênico e por não existirem níveis seguros para sua exposição, não faz parte do texto da Norma Regulamentadora N° 7 (NR 7), que dispõe sobre o Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO). Existem portarias e normativas criadas exclusivamente para tratar da exposição ao benzeno, que serão descritas posteriormente.

O monitoramento biológico ou biomonitoramento (BM) é uma ferramenta fundamental na avaliação de risco de saúde ocupacional e saúde no trabalho, porque lida com a avaliação da exposição do indivíduo, estudando efeitos e suscetibilidade a fatores de riscos ocupacionais (Manno et al., 2009). O BM é voltado principalmente para: definir a existência de uma exposição ocupacional; quantificar a dose e verificar se os limites de exposição são respeitados (Manini et al., 2007). No entanto, uma definição mais abrangente pode ser observada em uma avaliação de Manno et al., (2009) que caracterizaram como BM, protocolos padronizados, visando à detecção periódica, preferencialmente de forma precoce, de sinais biológicos reversíveis que são indicativos, se comparados com valores de referência adequados, de uma condição real ou potencial de exposição, efeito ou suscetibilidade, possivelmente resultando em danos à saúde ou doença. Estes sinais são referidos como biomarcadores. A periodicidade de medição é importante para assegurar que qualquer alteração precoce seja apropriadamente detectada. Os biomarcadores mais indicados para avaliar exposição ao benzeno, tolueno e xileno são o ácido trans, trans mucônico, o ácido hipúrico e o ácido metilhipúrico, respectivamente.

1.3.1. Ácido trans, trans mucônico

Para o benzeno, foi criada a Portaria N.º 34, de 20 de Dezembro de 2001, que determina o “Protocolo para a utilização de indicador biológico da exposição ocupacional ao benzeno”, por tratar-se de uma substância reconhecidamente carcinogênica. A legislação brasileira baseou-se no conceito adotado pela Alemanha, onde se utiliza o valor técnico de concentração ambiental (TRK) para substâncias carcinogênicas, não sendo estabelecidos, portanto, valores limite para IBEs de substâncias carcinogênicas ou mutagênicas. São

apresentadas, no entanto, listas de concentrações dos IBEs em fluidos biológicos equivalentes a diferentes valores de concentração ambiental, para que sirvam de guia na investigação da exposição do trabalhador a esses agentes. No Brasil, a adoção do VRT (Valor de Referência Tecnológico) traz a necessidade de reavaliar o conceito de IBMP para o IBE ao benzeno. O VRT é baseado principalmente na exequibilidade tecnológica e foram estabelecidos valores distintos para diferentes ramos industriais. O cumprimento do VRT é obrigatório, mas não exclui risco à saúde. Por isso, para o benzeno não faz sentido o estabelecimento de IBMP. A monitorização biológica da exposição ao benzeno pode ser realizada através de diferentes indicadores, que vão desde aqueles com meia vida biológica curta como o benzeno no ar exalado ou seus metabólitos urinários, até os adutores formados a partir de proteínas do sangue e moléculas de DNA que podem persistir por meses no organismo humano. O desenvolvimento de metodologias analíticas vem oferecendo a possibilidade de avaliar uma série de indicadores biológicos de exposição. Dentre os mais estudados, podemos destacar os ácidos trans,trans-mucônico e fenil mercaptúrico urinários, o benzeno inalterado no ar exalado, na urina e no sangue (MTE, 2001).

O *t,t* MA urinário é um indicador sensível, mas de especificidade média. A sua concentração é influenciada pelo hábito de fumar, quando ocorre exposição simultânea ao tolueno ou pela ingestão de ácido sórbico e seus sais presentes na alimentação (Ducos et al., 1990; Inoue et al., 1989; Ruppert et al., 1997; Maestri et al., 1996; Ong et al., 1994). Há suspeitas que hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) também interferem nesta avaliação (Kivistö et al., 1997). Em trabalhadores não ocupacionalmente expostos ao benzeno, a concentração do *t,t* MA está abaixo de 0,5 mg/g creatinina. Esta concentração em não expostos é atribuída geralmente a ampla poluição ambiental pelo benzeno que surge de fontes tais como hábito de fumar e outros processos de combustão, poluição urbana pelos automóveis e provavelmente contaminação de alimentos pelo ácido sórbico, que é também convertido ao *t,t* MA, embora em quantidades de traços. Assim, o VRT faz uma relação entre a concentração do benzeno no ar, em partes por milhão (ppm) ou mg/m³, e os níveis de *t,t* MA na urina em mg/l ou g/g de creatinina. Desta forma, para uma pessoa exposta a uma concentração de benzeno no ar de 1 ppm, o nível de *t,t* MA urinário deve ser de 1,6 g/g de creatinina (MTE, 2001).

1.3.2. Ácido hipúrico

De acordo com a legislação brasileira, para o ácido hipúrico, indicador biológico de exposição ao tolueno, o IBMP é de 2,5 g/g de creatinina. Na monitorização da exposição ao

tolueno pela quantificação do ácido hipúrico urinário é aconselhável a coleta de duas amostras de urina: uma no início da jornada semanal de trabalho, como tentativa para indicar os valores de pré-exposição, e outra ao final do turno de trabalho, de preferência após alguns dias de exposição uniforme (Xiao, 2000). O valor de referência para este metabólito é de até 1,5g/g de creatinina na população não exposta ocupacionalmente ao tolueno. A excreção do ácido hipúrico na urina poder sofrer influência da dieta, devido à presença do ácido benzóico e seus precursores. Assim, a ingestão de grandes quantidades de refrigerantes ou enlatados conservados com ácido benzóico, café, chá, ameixas, pode elevar os níveis de ácido hipúrico na urina (Oga, 2003; Thiesen, 2005). A excreção urinária de ácido hipúrico é praticamente completa no período de 18 horas depois do final da exposição ao tolueno (Lauwerys et al., 1996; Larini, 1998; Oga, 2003).

1.3.3. Ácido metilhipúrico

Para o ácido metilhipúrico, indicador biológico de exposição para o xileno, o IBMP é de 1,5g/g de creatinina, conforme determina a legislação brasileira. Este metabólito não está normalmente presente na urina, por isso não existe um valor de referência determinado para a população não exposta, e sua quantificação pode ser usada como indicador biológico para avaliação da exposição ao xileno. Nas 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. Para uma concentração de 200 mg de xileno por metro cúbico de ar, com 8 horas de exposição, a variação de ácido metilhipúrico urinário oscila de 0,381 a 0,708 mol/mol de creatinina, isto é, de 0,65 a 1,21 g/g de creatinina (Larini, 1998). Para a avaliação da exposição ao xileno pela quantificação do ácido metilhipúrico, a amostra de urina deve ser coletada no período correspondente às últimas quatro horas da jornada diária de trabalho.

1.4. Monitorização ambiental

Poluentes atmosféricos urbanos são problemas emergentes de saúde ambiental em muitas cidades do mundo, não só para a população geral, mas também para os trabalhadores urbanos profissionalmente expostos a baixas doses de poluentes do ar (Maître et al, 2002; Muttamara et al., 2004; Manini et al., 2006). Os escapamentos dos motores de veículos e a perda por evaporação durante o manuseio, distribuição e armazenamento de gasolina, são as maiores fontes de hidrocarbonetos aromáticos, tais como benzeno, tolueno e isômeros do

xileno (BTXs) no ar urbano. BTXs são poluentes ubíquos que também estão presentes em ambientes internos (Kotzias et al, 2009; Sarigiannis et al, 2011). No Brasil, o ambiente de trabalho é regulamentado pela NR 15 do Ministério do Trabalho e Emprego, de 8 de junho de 1978, onde são estabelecidos, entre outros, os limites de tolerância para agentes químicos, bem como a definição de atividade insalubre e divisão por categorias quanto ao grau de insalubridade de cada atividade. O "Limite de Tolerância" é definido na NR 15 como a concentração ou intensidade máxima ou mínima, relacionada com a natureza e o tempo de exposição ao agente, que não causará dano à saúde do trabalhador, durante a sua vida laboral. De acordo com esta norma, o tolueno é considerado um agente químico com grau de insalubridade médio, e apresenta absorção também pela pele. A concentração ambiental máxima permitida para uma jornada de trabalho de até 48 horas semanais é de 78 ppm ou 290 mg/m³ de ar. O xileno é também considerado um agente químico com grau de insalubridade médio, mas não apresenta absorção dérmica; a concentração máxima permitida para trabalhadores que desenvolvem carga horária semanal de até 48 horas é de 78 ppm ou 340 mg/m³ de ar.

O benzeno foi excluído desta classificação, na NR 15, pela Portaria n.º 03, de 10 de março de 1994, onde constava como “agente químico insalubre”, passando a ser classificado como substância cancerígena. No anexo criado por esta portaria, que trata exclusivamente do benzeno, o texto diz o seguinte: “1. O presente anexo tem como objetivo regulamentar ações, atribuições e procedimentos de prevenção da exposição ocupacional ao benzeno, visando à proteção da saúde do trabalhador, visto tratar-se de um produto comprovadamente cancerígeno. 2. O presente anexo se aplica a todas as empresas que produzem, transportam, armazenam, utilizam ou manipulam benzeno e suas misturas líquidas contendo 1% (um por cento) ou mais de volume e aquelas por elas contratadas, no que couber. 2.1. O presente anexo não se aplica às atividades de armazenamento, transporte, distribuição, venda e uso de combustíveis derivados de petróleo. 3. Fica proibida a utilização do benzeno, a partir de 01 de janeiro de 1997, para qualquer emprego, exceto nas indústrias e laboratórios que: a) o produzem; b) o utilizem em processos de síntese química; c) o empreguem em combustíveis derivados de petróleo; d) o empreguem em trabalhos de análise ou investigação realizados em laboratório, quando não for possível sua substituição; e) o empreguem como azeótropo na produção de álcool anidro, até a data a ser definida para a sua substituição.”

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar diferentes parâmetros de toxicidade em trabalhadores de postos de combustíveis e pintores expostos a solventes orgânicos no município de Santa Maria-RS.

2.2. Objetivos específicos

Tendo em vista os aspectos acima mencionados, este trabalho tem como objetivos específicos:

- Avaliar o dano ao DNA através da utilização de marcadores de genotoxicidade causado pelos solventes nos trabalhadores envolvidos no estudo.
- Avaliar o dano oxidativo causado pelos solventes em pintores e funcionários de postos de gasolina.
- Avaliar a alteração em parâmetros inflamatórios causada pela exposição aos solventes em pintores e funcionários de postos de gasolina.
- Avaliar a toxicidade destes solventes orgânicos em pintores e funcionários de postos de gasolina, através de parâmetros bioquímicos e hematológicos.
- Avaliar os níveis dos indicadores biológicos de exposição (ácido *trans*, *trans*-mucônico para o benzeno, ácido hipúrico para o tolueno e ácido metilhipúrico para o xileno) em pintores e frentistas no município de Santa Maria, RS.
- Comparar os diversos parâmetros analisados entre os pintores e funcionários de postos de gasolina, visando verificar a diferença na exposição aos solventes, bem como na gravidade dos efeitos tóxicos, em ambas as categorias.

3 MANUSCRITO

Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados, e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está disposto da mesma forma em que será submetido para avaliação do periódico “Chemosphere”.

3.1. Manuscrito

***EVALUATION OF DIFFERENT MARKERS OF OXIDATIVE DAMAGE,
GENOTOXICITY AND INFLAMMATION IN WORKERS EXPOSED TO SOLVENTS IN
SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL***

***Silva, L.M.¹; Teixeira, T.P.¹; Brum, E.¹; Moreira, L.R.¹; Kober, H.¹; Lavall, M.¹;
Silva, J.E.P.¹; Piana, M.²; Athayde, M.L.²; Lenz, L.S.³; Cruz, I.³; Duarte, T.³; Duarte,
M.M.M.F.⁴; Brandão, R.^{5*}***

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

²Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

³Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

⁴Centro de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brasil

⁵Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brasil

*Correspondence should be sent to:

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, UFPE, Recife, CEP
50740-521, PE, Brasil

Phone: 55-81-2126-8511

FAX: 55-81-2126-8510

Ricardo Brandão

E-mail: ricardo_br79@yahoo.com.br

ABSTRACT

Gas stations attendants (G.S.A.), as well as painters, are potentially exposed to volatile hydrocarbons such as benzene, toluene and xylene. Thus, the aim of this work was to verify laboratory findings in workers exposed to these solvents. Samples of blood and urine were collected in order to verify the biological indicators of exposure to these solvents, as well as markers of inflammatory process, genotoxicity and oxidative damage. The results demonstrated increase in malondialdehyde (MDA) levels in G.S.A., whereas painters present an increase in nitric oxide (NO) levels. Between the markers of genotoxicity, was observed an increase in 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) in G.S.A. and painters, and in this last group the increase was even greater. G.S.A. presented also alterations in DNA, demonstrated by comet assay. Among the inflammatory markers, interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ) levels were increased in both groups, being that painters presented higher levels of IFN- γ in comparison to G.S.A. The IL-10 levels were reduced in both groups of workers. In addition, a significant increase in alanine aminotransferase (ALT) activity was observed in painters. Hematological parameters were altered in painters, that presented a reduction in platelet count and an increase in the mean corpuscular hemoglobin (MCH). The biological indicators of exposure to solvents, trans, trans muconic acid (*t,t* MA), hippuric acid (HA) and methylhippuric acid (mHA) were not altered. Despite these indicators have remained within the maximum permissible values, changes were observed in the other markers, revealing mainly changes in specific markers for inflammation and genotoxicity.

Keywords: occupational exposure, organic solvents, painters, gas station attendants, benzene, toluene, xylene.

1. Introduction

Occupational toxicology is the area of toxicology that deals with the study of toxic effects, on the human body, caused by chemicals used or produced in industrial processes. The knowledge of the probability of the substance to determine an adverse effect in humans is crucial for the establishment of a rational policy of protection of society (Schwartzman, 2001). In practice, this implies knowing the production processes, the agents present in the workplace, its toxicity, its effects on health, the form of worker exposure to the agent and the definition of exposure levels allowed in the workplace. These levels can be expressed as allowed atmospheric concentrations or biological levels allowed for the agent or its metabolites (Lacaz, 2002).

Organic solvents are the largest group of chemicals used in the workplace (Boman ; Maibach, 2000; Bake, 2001). Occupational risks related to organic solvents are associated with acute and chronic health problems (Eglite, 2000; Dick, 2006). Aromatic hydrocarbons such as benzene, toluene and xylene are present in the ink and fuel composition, making workers exposed to these compounds greatly susceptible to its toxic effects. These solvents can cause chronic toxicity even in small concentrations and may lead to central nervous system lesions (Brito, 2005; Gouveia and Nardocci, 2007; Silva et al., 2009).

Biological monitoring complements the environmental control and health surveillance, considering that determines the overall exposure of the individual directly and detects early and reversible effects, providing better estimates of risk. This monitoring takes place through quantification of biological indicators of effect and exposure (IBEs), which can be xenobiotics own and/or its metabolites measured in workers biological samples (Amorim, 2003). The IBEs best for benzene, toluene and xylene, under Brazilian law are the *trans, trans* muconic (*t,t* MA) acid, hippuric (HA) acid and metilhippuric acid (mHA), respectively (Brasil, 1994; Brasil, 2001). There are some studies reporting oxidative stress (Murata et al., 1999; Martínez-Alfaro, 2010) and mutagenic effects (Moro et al., 2012; Erdem et al., 2012) in painters and gas station attendants, however immunological alterations have been rarely observed (Povey, 2001; Cai et al., 2008). Therefore, the objective of the study was to assess these changes in workers at gas stations and painters in the city of Santa Maria, and assess potential exposure difference between these two classes of workers.

2. Materials and Methods

2.1. Study population

The study included 53 adults of both sexes. The volunteers were divided into 2 groups, named control group (19 people not exposed to solvents) and exposed group, consisting of 12 painters and 22 attendants of gas station who work daily with solvents. The collection of blood samples of exposed volunteers was performed on three gas stations and two private companies of painting, in Santa Maria. The blood samples collection of the control group, composed of students, faculty and staff of UFSM, was performed in our research laboratory. Urine samples were also obtained. The volunteers also completed a questionnaire about the occupational exposure to organic solvents, and all participants signed an informed consent term. This research protocol was approved by the Research Ethics Committee of UFSM and registered with the number 22447113.3.0000.5346.

The inclusion criteria for the group exposed to the solvents were: adults, regularly exposed to solvents and without any chronic disease. Exclusion criteria for both groups were: patients out of the appropriate age group (18 to 60 years), with chronic disease (such as hepatic or renal impairment) and which frequently consume alcohol, since this compound alters the metabolism of the solvents.

2.2. Collection and preparation of samples

Venous blood samples were collected (10 mL of the patients by standard venipuncture technique recommended by the Brazilian Association of Clinical Pathology/Laboratory Medicine, and these samples were transferred into tubes without anticoagulant and other with anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or heparin. The samples without anticoagulant were centrifuged at 3000 rpm (1800Xg) for 15 minutes to separate the serum, and part of the samples collected in tubes with heparin was centrifuged to obtain the plasma. Samples of urine (around 50 mL) were also obtained. The collection of urine was performed at the last day of the working week. These urine samples were stored at -80°C until the time of analysis.

2.3. Determination of serum biochemical parameters

Part of the serum samples was used to determine the activity of the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyltransferase (γ -GT) and levels of uric acid and creatinine. These parameters were measured using commercial kits WIENER-LAB, Argentina; Biotech industry and trade Ltd., Minas Gerais, Brazil and LABTEST Diagnostics SA, Minas Gerais, Brazil.

2.4. Evaluation of the hemogram

The evaluation of hemogram was performed in total blood collected with EDTA, using an automated hematology analyzer equipment KX-21N, SYSMEX of the Center for Health Sciences, UFSM, with the following parameters evaluated: erythrocyte count (E), hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), leukocyte count and platelets. Blood smears were also performed for confirmation of possible haematological disorders.

2.5. Analysis in High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Analysis in HPLC were realized with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 at reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1. The mobile phases and all solutions and samples were filtered through a membrane filter (Millipore, Bedford, USA), 0.45 μ m, and then degassed by an ultrasonic bath before use. The quantification of the metabolites was carried out by integration of the peaks using the external standard method. The chromatographic peaks were confirmed by comparing their retention time and Diode-Array-UV spectra with those of the reference standards.

2.5.1. Sample preparation

Urine samples were diluted 1:10 with 22.5 mM KH_2PO_4 in 1% acetic acid:acetonitrile (90:10, v/v) and were centrifuged at 3000 g for 5 min. Then, the supernatant was filtered through a membrane of 0.22 microns and cellulose acetate. After, 20 μ L were injected into the chromatograph (HPLC-UV). For standardization of the analytical method, in performing curves with standard addition, we used a urine pool of volunteers healthy, academics and

officials from the Federal University of Santa Maria, without exposure to solvents evaluated in this study.

2.5.2. Determination of biological indicators of exposure

The analysis of *t,t* MA, HA and mHA were performed using the method described by Bulcão et al. (2008). For quantification, reverse phase chromatographic analyses was carried out in isocratic conditions using Agilent C-18 column (4.6 mm x 150 mm) packed with 5 µm diameter particles. The mobile phase consisted of a mix of buffer KH₂PO₄ 22,5 mM in acetic acid 1% - acetonitrile (90:10, v/v), adjusted to pH 3.5 with KOH 2 M. The *t,t* MA, HA and mHA were quantified at 263, 232 and 234 nm, respectively; injection volume was 20µl and the flow rate was 1 mL/min.

2.6. Evaluation of oxidative damage markers

The following biomarkers of oxidative damage were evaluated: catalase activity (CAT), according to the method described by Aebi (1984); activity of δ-aminolevulinate dehydratase (δ-ALA-D), as determined by method described by Berlin (1974); non protein thiol groups levels (NPSH), determined according to the technique described by Ellman (1959); levels of thiobarbituric acid (TBARS), determined in accordance with the technique described by Ohkawa et al (1979); determination of nitric oxide (NO) levels were performed as previously described by Miranda et al (2001), with some modifications, and ascorbic acid (AA) levels, determined according to the technique described by McCormick and Greene (1994), with some modifications. The CAT and ALA-D-δ activities and TBARS levels were determined from whole blood heparinized. AA and NPSH levels were determined in plasma samples of blood with heparin. NO levels were determined from serum samples.

2.7. Evaluation of DNA damage markers

2.7.1 Levels of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)

To determine the levels of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) was used commercial kit Enzo Life Sciences Lab, Plymouth, USA, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). For these measurements were used whole blood samples with EDTA.

2.7.2. DNA comet assay

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. (1995) in accordance with the general guidelines for use of the comet assay (Tice et al., 2000; Hartmann et al., 2003; Nadin et al., 2001). One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analysed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analysed under blind conditions by at least two different individuals. For these measurements were used whole blood samples with EDTA.

2.8. Determination of inflammatory parameters

For evaluation of inflammatory markers, were measured levels of the tumor necrosis factor (TNF- α), interferon gamma (INF- γ), and interleukins 1, 6 and 10 (IL-1, IL-6 and IL-10) in serum samples, using commercial kits Bioscience, San Diego, USA, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative sandwich.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis between experimental groups were performed by analysis of variance of the one-way (ANOVA) followed by post-hoc Tukey's test and the results were expressed as mean \pm SEM. P values less than 0.05 ($p < 0.05$) were be considered as indicative of significance.

3. Results

3.1. Questionnaire data

The most relevant data obtained from the questionnaire are shown in table 1. Most of painters and gas station attendants (G.S.A.) presents a occupational exposure time greater than 5 years (around 83% to painters and 57% to G.S.A. 6-8 hours of exposure by day, for the most of painters (around 58%) and G.S.A (around 91%), were reported by workers. The use of personal protective equipment (PPE) was reported by 86.4% of G.S.A. and 100% of painters; the equipments most cited in the questionnaire were gloves and eyeglasses. In relation to consume of alcohol, 41% of G.S.A. and 50% of painters reported not drinking alcohol, while that 36.3% of G.S.A. and 33.33% of the painters drinking alcohol once a week.

3.2. Biochemical parameters

We verified that only the ALT activity was increased in painters, when compared to control ($p < 0.05$) and G.S.A ($p < 0.05$) groups (Table 2). The other biochemical markers were not modified in both groups of workers.

3.3. Hematological parameters

The results showed a reduction in platelet count in painters group, when compared to the control ($p < 0.05$) and G.S.A. ($p < 0.05$) groups. In addition, painters presented an increase in MCH concentration in comparison to unexposed group ($p < 0.05$) (Figure 1). The evaluation of blood smears did not show changes in all groups.

3.4. Biological indicators of exposure (IBE)

The results obtained, expressed as mean \pm SEM, were: *t,t* MA – 0.003403 g/g creatinine for G.S.A. group, 0.002469 g/g creatinine for painters group and 0.003058 g/g creatinine for control group; HA – 0.046519 g/g creatinine for G.S.A. group, 0.040403 g/g creatinine for painters group and 0.050250 g/g creatinine in the control group. The *t,t* MA and HA were found in workers of both groups, but no significant differences were observed when compared to control group. The mHA presented undetectable levels in all samples.

3.4. Oxidative stress markers

Our results showed that NPSH and AA levels, as well as CAT and δ -ALA-D activities presented no significant differences between groups exposed and control (Table 3). In relation to MDA levels, there was an increase in G.S.A. group compared to the control group ($p < 0.005$) (Figure 2). The evaluation of nitric oxide levels (NO) revealed a significant increase in painters in comparison to the unexposed ($p < 0.0005$) and G.S.A. ($p < 0.0005$) groups (Figure 3).

3.5. Genotoxicity markers

The results showed significant increase in 8-OHdG levels in both groups of workers, painters and G.S.A., when compared to the control group ($p < 0.0005$). Moreover, painters presented a significant increase in this marker, when compared to the G.S.A. group ($p < 0.05$) (Figure 4). In addition, the comet assay indicates significant increase in DNA damage in G.S.A. group in comparison to control group ($p < 0.05$). The comet assay did not show alterations in painters group (Figure 5).

3.6. Inflammatory parameters

IL-1 (Figure 6), IL-6 (Figure 7) and TNF- α (Figure 8) levels were elevated in both exposed groups, when compared to the non-exposed group ($p < 0.0005$), but there was no significant differences between groups of workers. In relation to IL-10, there was a reduction in this marker in painters and G.S.A., when compared to the unexposed group ($p < 0.0005$). The IL-10 levels were not modified when we compare painters and G.S.A. (Figure 9). In addition, INF- γ levels were increased in painters ($p < 0.0005$) and G.S.A. ($p < 0.0005$), when compared to control group. We observed also an increase in INF- γ levels ($p < 0.05$) in painters when compared to G.S.A. group (Figure 10).

4. Discussion

The work environment usually contains a large number of chemicals, which may be inhaled and absorbed by the body (IARC, 1989). Biological monitoring (BM) or biomonitoring is a fundamental tool in occupational health risk assessment and occupational health practice, because it deals with the assessment of individual human exposure, effects, and susceptibility to occupational risk factors (Manno et al., 2009). Among the various solvents, benzene, toluene and xylene are more widely used in chemical, industrial and commercial processes (WHO, 1993). These monocyclic hydrocarbons are also generated through the process of combustion and evaporation of gasoline and are components of many commercial products such as cleaning fluids, paints and adhesives (Arlie-Suborg, 1992; Indulski et al., 1996).

The results of our study demonstrated that G.S.A. presented significant alterations in both genotoxicity markers (measurement of 8-OHdG levels and comet assay), while that painters presented an increase in 8-OHdG levels only. The alkaline comet assay has been used as a sensitive biomarker that reveals DNA damage caused either directly by reactive oxidant agents, or indirectly by substances that can generate free radicals (Fairbairn et al., 1995; Fracasso et al., 2002). The DNA adduct 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) has been used as a marker of oxidative DNA damage in humans exposed to mutagenic agents (Kim et al., 2004). DNA oxidation has potential genotoxic consequences (Martínez-Alfaro et al., 2010) and is implicated in the pathogenesis of several diseases (Costa et al., 2005), including cancer and neurodegenerative disorders (Gérin et al., 1998). Based on the results above, we can suggest that a genotoxicity assay could be performed as a tool for biomonitoring workers exposed to chemical agents.

Organic solvents are generally metabolized by CYP2E1 enzyme during phase I reaction (Valentine, 1996). CYP2E1 binds to organic solvents macromolecules and forms electrophilic intermediates that can induce DNA damage (Kim et al., 2004; Musak et al., 2008). In fact, benzene is primary oxidized to phenols, hydroquinones and then re-oxidized to benzoquinones, which are the most potent genotoxic metabolites produced by organic solvents (Pandey et al., 2008). In addition, Angelini et al. (2011) reported that the generation of reactive oxygen species (ROS) can be involved in mutagenic effects of benzene, as well as one pathway of toluene biotransformation leads to the formation of toluene epoxides, which may generate reactive ROS and can cause oxidative stress and DNA damage (Murata et al., 1999). In this way, we observed an increase in TBARS levels in G.S.A., demonstrating an increase in lipid peroxidation in this group. The oxidative stress, resulting in a state of imbalance, can cause a decrease in the antioxidant defense cells and induce lipid peroxidation mechanism (Georgieva et al., 2002), which persist for a long term, can lead to the development diseases. Malondialdehyde (MDA) is a major product of the free radical attack on polyunsaturated fatty acids and is widely used as a biomarker of lipid peroxidation, indicating the extent of cell membrane injury. However, in painters was not observed an increase in MDA levels, but we verify an increase in NO levels in this group. Despite the NO have an important role in the control of many infections, with antibacterial, antiparasitic and antiviral activities (Flora Filho and Zilberstein, 2002), the uncontrolled NO synthesis is implicated in the pathogenesis of cardiovascular disease, autoimmunity, transplant rejection, sepsis (Nathan, 1992), degenerative brain diseases (Christopherson and Bredt, 1997; Halliwell, 2001), cancer (Schmidt; Walter, 1994), inflammation (Flora Filho and Zilberstein, 2002) and genotoxicity, by inhibiting DNA replication (Wink et al., 1998). Thus, we can suggest that the increase in MDA levels and/or NO content may be related to genotoxic effects demonstrated in our study.

Interestingly, our results showed no significant changes in other markers of oxidative stress evaluated (CAT, δ -ALA-D, NPSH and ascorbic acid), although other researchers have found alterations, in some of these same parameters, in workers exposed to solvents. In fact, an increase in CAT activity, as well as a reduction in NPSH levels and inhibition in δ -ALA-D activity were observed in painters (Moro et al., 2012). The same study observed also an increase in protein carbonyl levels, an indicative of protein oxidation, and in the levels of ischemia-modified albumin (IMA), since elevated production of ROS during solvent biotransformation could transiently modify the N-terminal region of albumin and result in increased IMA levels (Roy et al., 2006). However, Erdem et al. (2012) verified that workers

exposed to jet oil presented no alterations in some oxidative parameters, such as CAT, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), although an increase in TBARS levels has been demonstrated, which is in agreement with our findings.

Cytokines (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α and INF- γ) are produced by many cell populations, but the predominant producers are helper T cells (Th) and macrophages (Xie et al., 2006). TNF is a key mediator of both acute and chronic systematic inflammatory reactions and stimulates the production of other inflammatory cytokines and chemokines (Chu, 2013). INF- γ is recognized as chief mediator of innate as well as adaptive immunity (Ramana et al., 2002). Among the biological activities of INF- γ , activation of macrophages is of key importance. Accordingly, INF- γ upregulates a variety of pro-inflammatory parameters such as interleukins (Yoshida et al., 1994; Doherty et al., 1996), TNF- α (Hayes et al., 1995) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Xie et al., 1993). Interleukins (ILs) are secreted by numerous immune cells, acting mostly in an auto/paracrine manner. Interleukins such as IL-1 and IL-6 are known to participate in the regulation of endometrial prostaglandins synthesis in many species, acting as pro-inflammatory cytokines (Franczak et al., 2012), while that interleukin 10 (IL-10) is an important mediator of anti-inflammatory immune responses (Mosmann and Coffman, 1989). In our study, the levels of IL-10, that possess anti-inflammatory activity, were reduced in both groups of workers. In addition, all pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α and INF- γ) were increased in both class of workers. Moreover, INF- γ levels showed a greater increase in painters when compared to G.S.A. group. Painters presented also, as reported previously, an increase in NO levels. In the immune system and inflammation, endogenous NO seems to have pro and anti-inflammatory effects (Nathan, 1992). The pro-inflammatory effects of NO are not evident on acute physiological conditions and may, in these cases, to mediate anti-inflammatory functions such as inhibition of neutrophil adhesion, cyclooxygenase activity, cytokine formation and bone resorption (Schmidt and Walter, 1994).

There are few articles in the literature relating inflammation with painters and G.S.A., however is known that organic solvents and its metabolites can cause the activation of B and T cells. The activation of B cells can promote the release of antibodies and this is related with inflammation and autoimmune disease. The activation of T cells can promote the macrophage activation, with increase in the production of NO and cytokines. The inhibition of apoptosis process induced by solvents can also activates T cells. In addition, the oxidative stress and the formation of chloroacetylated-protein, after exposure to solvents, can increase the susceptibility to activation of T and B cells, contributing to inflammatory process (Barragán-

Martínez et al., 2012). In fact, the self-proteins that are modified by the solvents may become immunogenic and is thus recognized as foreign molecules, and then initiate an inflammatory response to the injured tissue (Povey 2001; Wang et al., 2007; Cai et al., 2008). Epigenetic alterations caused by organic solvents can also promotes inflammation and autoimmune disease, but is a hypothetical mechanism (Barragán-Martínez et al., 2012). In addition, long-term exposure to solvents appears to favor a massive hepatic mononuclear infiltrate, leading to autoimmune hepatitis, although it is important to note that this is the first step in the immunopathogenesis not only autoimmune hepatitis, but also the other autoimmune diseases ADs (Griffin et al, 2000). As shown by Cai et al. (2008), infiltration of lymphocytes was found in pancreas, lungs, and kidneys, besides the liver. In autoimmune thyroid disease, it is likely that the solvents may interfere with the iodine transport and induce oxidative stress, which leads to an inflammatory response in this gland (Duntas, 2008).

Our results showed also that painters presented an increase in ALT activity. In relation to AST and γ -GT activities (Table 2), there was an increase in the painters, but did not was significant when compared to control group ($p=0,071$ and $p=0,055$, respectively). In according, Guzelian et al. (1988) reported eight cases of toluene exposed workers in the paint industry with steatotic liver disease and changes in ALT and AST activities. In another example, a study of 29 solvent-exposed workers demonstrated that serum ALT and AST activities were correlated positively with cumulative solvent exposure in the past 5 years, while total bilirubin correlated with current exposure (Kaukiainen et al., 2004). Markers of hepatic damage include analysis that are routinely measured in all clinical laboratories (Cahill, 1999). Several tests including serum AST, ALT, γ -GT and alkaline phosphatase can serve as sensitive indicators of liver injury (Giannini et al., 2005). Thus, we can suggest that painters are more susceptible to liver damage than G.S.A. The liver is the major site for processing chemicals and drugs, which enter the blood stream. In this process, unstable toxic products are sometimes produced, which can attack and injure the liver. Many organic solvents could cause toxic chemical injury to the liver through this type of mechanism, in addition to direct toxicity (Brautbar and Williams, 2002; Xiao and Levin, 2000). Furthermore, the cause of liver damage may lie in a number of factors rather than in isolated exposure (Dossing and Skinjob, 1985; Chen et al., 1997). In most settings, exposures occur to mixtures of solvents. In addition, because many organic solvents might have a common mechanism of action, there can be additive effects. For instance, the solvents studied may share a common toxicity pathway that includes metabolism by cytochrome P450 2E1 (Brautbar and Williams, 2002;

Dennison et al, 2004). Therefore, even when exposure to each agent individually is at a level that would not be expected to cause adverse effects, the combination of several solvents may lead to inhibition of detoxifying enzymes or induction and increased activity of enzyme systems (Alessio, 1996).

The markers of kidney damage, uric acid and creatinine, were not modified in painters and G.S.A groups. Nevertheless, some studies have shown that individuals exposed to these chemicals may exhibit a higher incidence of membranous glomerulonephritis, increase in serum creatinine levels and increased incidence of early markers of renal disease, such as tubular enzymuria (Bell and Howse, 2005). Moreover, continued exposure to solvents has been shown to be a risk factor for progression of chronic renal disease, especially in patients with high levels of immunoglobulin A, membranous nephropathy or glomerulonephritis (Jacob et al., 2007). The mechanisms by which hydrocarbons cause kidney damage are not completely understood (Bell and Howse, 2005).

Among hematologic parameters evaluated, a significant reduction in MCH was observed in painters. In fact, solvents can interfere with the process of proliferation of red blood cells. These changes may reflect in heme synthesis and lifespan of red blood cells (Sadocova, 1990). In addition, a reduction in platelets levels was observed in the group of painters, compared to the G.S.A. and control groups. In study of Uzma and colleagues (2008), was verified also a reduction in platelet count in workers exposed to solvents. We believe that benzene is the main responsible to these hematological alterations. Is known that benzene is a solvent capable of causing acute intoxication or chronic, with especially myelotoxic effects, being leukemia the main toxic effect of this solvent (Gonçalves et al., 2005; Graciani; Ferreira; Salviano, 2008). In according, a reduction of platelets, leukocytes, lymphocytes and granulocytes (Lan et al., 2004), as well as decrease in red blood cell count and hemoglobin (Hb) (Qing et al., 2004) were verified in workers exposed to benzene.

Interestingly, although we have verified significant changes in immunological, biochemical and hematological parameters, as well as alterations in DNA, no changes were demonstrated in the biological indicators of exposure (*t,t* MA, HA and mHA) of workers in comparison to the control group. In addition, the levels of these biomarkers remained below to the maximum allowable biological indicator for each metabolite. In the case of HA, biological indicator of exposure to toluene, this index is 2.5 g HA/g creatinine. In Brazil, the Order 34/2001 of the Ministry of Labour and Employment established the following determination: for an environmental exposure to benzene of 1 ppm, the maximum concentration of *t,t* MA should be 1.6 g/g creatinine. For *t,t* MA, there is no definition of

IBMP. Since benzene is a carcinogenic agent, we adopted the concept of technological reference value (TRV), which is a relationship between the environmental concentration of benzene and the concentration of *t,t* MA in urine. In this work, the ambient concentration of benzene was not evaluated, which makes impossible to determine this relationship. However, we observed that the values obtained for *t,t* MA, in our study, are below the value of 1.6g/g creatinine. The mHA, which is a metabolite of xylene, was not detectable in any of the samples. This may be associated with a low sensitivity of the method, limitations in the methodology employed or problems in the conservation of this metabolite in urine samples. It is important to highlight that, in the work environment, the mixture of benzene with toluene and xylene is practically unavoidable (NIOSH, 2004). It is assumed that the two latter substances may interact and determine the toxicity of the benzene fraction by sharing the toxicokinetic mechanism (ATSDR, 2004; Mendoza-Cantú, 2006). Thus, despite the normal levels of biological indicators of exposure to solvents, we believe that a cumulative effect can explain the alterations observed in our study.

There are a number of problems in the use of solvents metabolites as biomarkers of exposure to these compounds. Although HA is the major metabolite of toluene, it can be found as a normal constituent of the urine, originated from food, beverages and drugs containing benzoic acid or benzoates, which may compromise the use of this metabolite in the biomonitoring of low levels of exposure to toluene (Truchon et al., 1999). In this way, other biomarkers are evaluated in attempt to found a marker more reliable to verify the exposure to toluene. Inoue et al. (2008), for example, demonstrated that the determination of toluene in blood or urine presents a better correlation with low levels of toluene in the workplaces and, thus, may be employed to estimate toluene exposure at low levels of this solvent. The same study demonstrated that the measurement of different metabolites of toluene (hippuric acid, *o*-cresol, benzyl alcohol and benzylmercapturic acid) is not appropriate to evaluated exposure to low levels of this organic compound, e.g., 2 ppm., being more applicable when the exposure is intense, e.g., 50 ppm or above. In the case of *t,t* MA measurement, according to the literature, sorbic acid intake in the diet and its salts (Ducos et al., 1990; Pezzagno et al., 1999), consumption of alcohol (Javelaud et al., 1998), the habit of smoking (Ghittori et al., 1995;. Ruppert et al., 1997) or simultaneous exposure to toluene (Greenberg; Goldstein, 1997; Inoue et al., 1989) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Coutrim et al., 2000) may be factors that interfere with the dosage of this marker. In according, studies show that the Brazilian population may present baseline values of *t,t* MA in the range 0,03 to 0,26 mg/g creatinine (Brasil, 2001).

5. Conclusion

Occupational exposure to organic solvents is a worldwide public health problem. As the procedure of biological monitoring is defined by government agencies for each country, studies like this demonstrated very relevant changes in biological parameters that, in some cases, depending on the exposure time, can result in irreversible damage to workers' health. In the present study, we verified that biological indicators of exposure to solvents, which are generally used in monitoring process, were not modified in workers, justifying the search for new markers that identify the toxic effects caused by solvents and others constituents of paints and fuel.

6. References

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105, 121-126.
- Agency for Toxic Substances & Disease Registry, ATSDR, 2004. Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX). pp 251-289.
- Alessio L., 1996. Multiple exposure to solvents in the workplace. *Int Arch Occup Environ Health*. 69(1), 1-4.
- American Conference Governmental Industrial Hygienists, ACGIH, 2013. Occupational exposure limits. BEI - Committee Update Feasibility Assessments. Committee the University of Texas Health Center at Tyler. Available from: http://www.acgih.org/tlv/05_BEI-update_AIHce06.pdf. Accessed in 15/02/2015.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH, 1992. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. 6th Ed., Cincinnati, OH. Vol. 3, 1732-1740.
- Amorim, L.C.A., 2003. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 6, 158.
- Angelini, S., Kumar, R., Bermejo, J.L., Maffei, F., Barbieri, A., Graziosi, F., Carbone, F., Cantelli-Forti, G., Violante, F.S., Hemminki, K., Hrelia, P., 2011. Exposure to low environmental levels of benzene: evaluation of micronucleus frequencies and S-phenylmercapturic acid excretion in relation to polymorphisms in genes encoding metabolic enzymes. *Mutat. Res*. 719, 7-13.
- Arlien-Suborg, P., 1992. *Solvent Neurotoxicity*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Bake, M.A., Linnika, Z., Rusakova, N., Matisane, L., Veide, A., 2001. Health risk assessment to perchlorethylene during dry cleaning. In: *Proceedings of 21th International Symposium Industrial Toxicology*, Bratislava, 30 June, 1 May. pp 45-48.
- Bell, G.M. & Howse, M.L.P., 2005. Substance misuse, organic solvents and kidney disease. C. van Ypersele (Ed.), *Oxford textbook of clinical nephrology* (3rd ed.), Oxford University Press, Oxford.
- Berlin, A., Schaller, K.H., 1974. European standardized method for the determination of δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Klinical Chemistry and Klinical Biochemistry*, pp 389-390.
- Boman, A., Maibach, H.I., 2000. Influence of evaporation and solvent mixtures on the absorption of toluene and n-butanol in human skin in vitro. *Ann. Occup. Hyg.*, 44, 125-135.
- Brasil, Ministério do Trabalho e Emprego. MTE. Portaria N° 34, de 20 de dezembro de 2001. Protocolo para a utilização de indicador biológico da exposição ocupacional ao benzeno. Disponível em: <http://portal.mte.gov.br/legislacao/portaria-n-34-de-20-12-2001-1.htm>. Acesso: fevereiro de 2015.

- Brautbar, N. & Williams, 2002. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 205, 479–491.
- Brito, F.V., 2005. Estudo da contaminação de águas subterrâneas por BTEX oriundas de postos de distribuição no Brasil. *Anais do 3º Congresso Brasileiro de P & D em petróleo e gás.* Salvador, Bahia.
- Bulcão, R., Maria, L.S., Charão, M., Moro, A., Roehrs, M., Garcia, S.C., Pereira, R. L., 2008. Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova.* 31(6), 1343-1348.
- Cahill, M., 1999. *Handbook of Diagnostic Tests.* Springhouse Corporation; Springhouse, PA.
- Cai, P., König, R., Boor, P.J., Kondraganti, S., Kaphalia, B.S., 2008. Chronic exposure to trichloroethene causes early onset of SLE-like disease in female MRL +/+ mice. *Toxicology and applied pharmacology.* 228, 68–75
- Cajas-Salazar N., Sierra-Torres, C.H., Salama, S.A., Zwischenberger, J.B., Au, W.W., 2003. Combined effect of MPO, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on chromosome aberrations and lung cancer risk, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 206, 473–483.
- Chen, J.D., Wang, J.D., Tsai, S.Y., Chao, W.I., 1997. Effects of occupational and non-occupational factors on liver function tests in workers exposed to solvent mixtures. *Arch Environ Health.* 52(4), 270–274.
- Christopherson, K.S. & Bredt, D., 1997. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *Journal Clinical Investigation.* 100(10), 2424-2429.
- Chu, Wen-Ming, 2013. Tumor necrosis factor *Cancer Letters.* 328, 222–225.
- Costa, C., Pasquale, R., Silvari, V., Barbaro, M., Catania, S., 2005. In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapors on human skin. *Toxicol. In Vitro.* 20, 324–331.
- Coutrim, M.X. Carvalho, L.R.F., Arcuri, A.S.A., 2000. Avaliação dos Métodos Analíticos para a Determinação de Metabólitos de Benzeno como Potenciais Biomarcadores de Exposição Humana ao Benzeno no Ar. *Química Nova.* 23, 653-663.
- Dennison, J.E., Bigelow, P.L., Andersen, M.E., 2004. Occupational exposure limits in the context of solvent mixtures, consumption of ethanol, and target tissue dose. *Toxicol Ind Health.* 20, 165–75.
- Department of Health and Human Services, 2004. Mixed exposures research agenda. A report by the NORA mixed exposure team. Cincinnati, OH, USA: National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH).
- Dick, F.D., 2006. Solvent neurotoxicity. *Occup. Environ. Med.* 63, 221–226.
- Doherty, T.M., Seder, R.A., Sher, A., 1996. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol.* 156, 735 – 41.

- Dossing, M., Aelum, J.B., Hansen, S.H., Lundqvist, G.R., Andersen, N.T., 1983. Urinary hippuric acid and orthocresol excretion in man during experimental exposure to toluene. *Br J Ind Med.* 40, 470–3.
- Dossing, M., Skinjob, P., 1985. Occupational liver injury. *Int Arch Occup Environ Health.* 56(1), 1–21.
- Ducos, P., Gaudin, R., Robert, A., Francin, J.M., Maire, C., 1990. Improvement in HPLC Analysis of Urinary trans,trans-Muconic Acid, a Promising Substitute for Phenol in the Assessment of Benzene Exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health.* 62, 529-534.
- Duntas, L.H., 2008. Environmental factors and autoimmune thyroiditis. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism.* 4, 454–460.
- Eglîte, M., 2000. Īmisko faktoru izraisîtâ arodpatoloģija. Professional pathology caused by chemical factors. Grâm: Darba medicĭna, pp 136.–352. (in Latvia)
- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 82, 70-77.
- Erdem, O., Sayal, A., Eken, A., Akay, C., AydĀn, A., 2012. Evaluation of genotoxic and oxidative effects in workers exposed to jet propulsion fuel. *Int Arch Occup Environ Health.* 85, 353–361.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.* 464, 229–237.
- Flora Filho, R. & Zilberstein B., 2000. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med. Bras.* 46(3), 265-271.
- Fracasso, M.E., Perbellini, L., Solda, S., Talamini, G., Franceschetti, P., 2002. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. *Mutat. Res.* 515, 159–169.
- Franczak, A., Zmijewska, B., Kurowicka, B., Wojciechowicz, B., Petroff, k., Kotwica, G., 2012. The effect of tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 1 β (IL1 β) and interleukin 6 (IL6) on endometrial PGF2 α synthesis, metabolism and release in early-pregnant pigs. *Theriogenology.* 77(1), 155–165.
- Fustinoni, S., Mercadante, R., Campo, L., Scibetta, L., Valla, C., Consonni, D., Foà, V., 2007. Comparison between urinary o-cresol and toluene as biomarkers of toluene exposure. *J Occup Environ Hyg.* 4(1), 1-9.
- Georgieva, T., Michailova, A., Panev, T., Popov, T., 2002. Possibilities to control the health risk of petrochemical workers. *Int Arch Occup Environ Health.* 75, 21–6.
- Gérin, M., Siemiatycki, J., Désy, M., Krewski, D., 1998. Associations between several sites of cancer and occupational exposure to benzene, toluene, xylene, and styrene: results of a case-control study in Montreal. *Am. J. Ind. Med.* 34, 144–156.

Ghittori, S., Maestri, L., Fiorentino, M., Imbriani, M., 1995. Evaluation of Occupational Exposure to Benzene Urinalysis. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 67:195-200.

Giannini, E.G., Testa, R., Savarino, V., 2005. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal*. 172(3), 367–379.

Goldstein, B.D., Greenberg, M.R., 1997. Toxicology and Environmental Health. The Methods of Public Health. In: Detels, R., Holland, W.W., McEwen, J., Omenn, G.S. *Oxford Textbook of Public Health*. New York: Oxford University Press. 2, 907-913.

Gonçalves, R.O., Melo, N.A., Carvalho, F.M., Góes, R.C., 2005. Efeitos genotóxicos e alterações de enzimas hepáticas em trabalhadores do refino do petróleo. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 41(5), 297-299.

Gouveia, J.L.N.; Nardocci, A.C., 2007. Acidentes em postos e sistemas retalhistas de combustíveis: subsídios para a vigilância em saúde ambiental. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. 12(3), 317-324.

Graciani, F.S., Ferreira, B.V., Salviano, D.C.M., 2008. Proteção ao meio ambiente do trabalho: considerações sobre a exposição ocupacional ao benzeno. In: *Anais do IV Fórum Ambiental da Alta Paulista*. V.4.

Griffin, J.M., Gilbert, K.M., Lamps, L.W., Pumford, N.R., 2000. CD4(+) T-cell activation and induction of autoimmune hepatitis following trichloroethylene treatment in MRL+/+ mice. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 57, 345–352.

Guzelian, P., Mills, S. and Fallon, H.J., 1988. Liver Structure and Function in Print Workers Exposed to Toluene. *Journal of Occupational Medicine*. 56(10), 791-6.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free radicals in Biology and Medicine*. 2. ed. New York: Clarendon Press.

Halliwell, B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*. 18(9), 685-716.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. Vol. 18(1), 45-51.

Hayes, M.P., Freeman, S.L., Donnelly, R.P., 1995. IFN-g priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. *Cytokine*. 7, 427 – 35.

Indulski, J.A., Sinczuk-Walczak, H., Szymczak, M., Wesolowski, W., 1996. Neurological and neurophysiological examinations of workers occupationally exposed to organic solvent mixtures used in the paint and varnish production. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*. 9, 235–244.

Inoue, O., Kawai, T., Ukai, H., Maejima, Y., Fukui, Y., Ohashi, F., Okamoto, S., Takada, S., Sakurai, H., Ikeda, M., 2008. Limited validity of o-cresol and benzylmercapturic acid

in urine as biomarkers of occupational exposure to toluene at low levels. *Ind Health.* 46(4), 318-25.

Inoue, O. Seiji, K., Nakatsuka, H., Watanabe, T., Yin, S.N., Li, G.L., Cai, S.X., Jin, C., Ikeda, M., 1989. Urinary t,t Muconic Acid as an Indicator of Exposure to Benzene. *British Journal of Industrial Medicine.* 46, 122-127.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 1989. Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposure in the paint manufacture and painting. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol47/mono47.pdf> . Acesso em: fevereiro de 2015.

Jacob, S., Héry, M., Protois, J.C., Rossert, J., Stengel, B., 2007. Effect of organic solvent exposure on chronic kidney disease progression: the GN-PROGRESS cohort study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 274-81.

Javelaud, B., Vian, L., Molle, R., Allain, P., Allemand, B., André, B., Barbier, F., Churet, A.M., Dupuis, J., Galand, M., Millet, F., Talmon, J., Touron, C., Vaissière, D., Vechambre, D., Vieules, M., Viver, D., 1998. Benzeno Exposure in Car Mechanics and Road Tanker Drivers. *International Archives of Occupational and Environmental Health.* 71, 277-283.

Kaukiainen, A., Riala, R., Martikainen, R., Akila, R., Reijula, K. and Sainio, M., 2004. Solvent-related health effects among construction painters with decreasing exposure. *American Journal of Industrial Medicine.* 46 (6), 627–636.

Kim, H.C., Nam, C.M., Jee, S.H., Suh, I., 2004. Normal serum aminotransferase concentration and risk of mortality from liver diseases: Prospective cohort study/Commentary: Liver function tests: Defining what's normal. *BMJ.* V. 328, n.7446, p. 983–985.

Korsak, Z., Sokal, J.A., Gorny, R., 1992. Toxic effects of combined exposures to toluene and m-xylene in animals. III. Subchronic inhalation study. *Pol J Occup Med Environ Health.* 5, 27-33.

Lacaz, F.A.C., 2002. Vigilância em saúde do trabalhador. II Conferência Nacional de Saúde do Trabalhador, 1994. Caderno de Textos. Brasília, DF: Ministério da Saúde do Brasil.

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

Martínez-Alfaro, M.A., Cárabez-Trejo, M.A., Gallegos-Corona, G., Pedraza-Aboytes, N.G., Hernández-Chana, G.E., Leo-Amadorb, 2010. Thinner inhalation effects on oxidative stress and DNA repair in a rat model of abuse. *J. Appl. Toxicol.* 30, 226–232.

McCormick, D.B. & Greene, H.L., 1994. Vitamins: ascorbic acid. In: Burtis, C.A. & Ashwood, E.R. (eds.). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 2. ed. Filadélfia: W.B. Saunders. p. 1311-6

- Mendoza-Cantú, A., Castorena-Torres, F., Bermudez-de Leon, M., 2006. Occupational toluene exposure induces cytochrome P450 2E1 mRNA expression in peripheral lymphocytes. *Environ Health Perspect.* v. 114, 494-499.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 5(1), 62-71.
- Moro, A. M. et al., 2010. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. *Science of the Total Environment.* 408, 4461–4467.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev of Immunol.* 7, 145–173.
- Murta, B.M.T., Machado, J.S., Zaparoli, M., Lara, V.C., Candido, E.F., 1999. The relationship of host immune cells, cytokine and nitric oxide production to tumor cells in ovarian carcinoma. *São Paulo Medical Journal. Sao Paulo Med. J.* 117(2), 87-92.
- Musak, L., Soucek, P., Vodickova, L., Naccarati, A., Halasova, E., Polakova, V., Slyskova, J., Susova, S., Buchancova, J., Smerhovsky, Z., Sedikova, J., Klimentova, G., Osina, O., Hemminki, K., Vodicka, P., 2008. Chromosomal aberrations in tire plant workers and interaction with polymorphisms of biotransformation and DNA repair genes. *Mutat. Res.* 641, 36–42.
- Nadin, S.B., Vargas-Roig, L.M., Ciocca, D.R.A., 2001. Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 49, 1183-1186.
- Nathan, C., 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal.* 6, 3051-3064.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry.* 95, 351–358.
- Pandey, A., Bajpayee, M., Parmar, D., Kumar, R., Rastogi, S., Mathur, N., Thorning, P., Matas, M., Shao, Q., Anderson, D., 2008. Multipronged evaluation of genotoxicity in Indian petrol-pump workers, *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 000–10.
- Pezzagno, G., Maestri, L., Fiorentino, M.L., 1999. Trans,trans-Muconic Acid, a Biological Indicator to Low Level of Environmental Benzene: some aspects of its specificity. *American Journal of Industrial Medicine.* 35, 511-518.
- Povey, A., Guppy, M.J., Wood, M., Knight, C., Black, C.M., 2001. Cytochrome P2 polymorphisms and susceptibility to scleroderma following exposure to organic solvents. *Arthritis and rheumatism.* 44, 662–665.
- Qing, L., Luoping, Z., Guilar, L., Rappaport, S.M., Sher, M., Alter, B.P. Wo, Y., Kopp, W., Waidyanatha, S., Rabkin, C., Guo, W., 2004. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science.* 306, 1774-1776.
- Ramana, C.V., Gil, M.P., Schreiber, R.D., Stark, G.R., 2002. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-g-dependent signaling. *Trends Immunol.* 23, 96 – 101.

- Roy, D., Quiles, J., Gaze, D.C., Collinson, P., Kaski, J.C., Baxter, G.F., 2006. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischemia modified albumin, *Heart*. 92, 113–114.
- Ruppert, T., Scherer, G., Tricker, A.R., Adlkofer, F., 1997. trans,trans-Muconic Acid as a Biomarker of non-Occupational Environmental Exposure To Benzene. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 69, 247-252.
- Sadicova, S.S., Bunqlanov, A.A., Tadzheva, Z.A., 1990. Indicators of iron metabolism and cellular immunity in healthy children and in those with iron deficiency anemia in relation to ecological conditions. *Pediatrics*. 8, 41–44.
- Schmidt, H.H.H.W. & Walter, U., 1994. NO at work. *Cell*. 78, 919- 925.
- Schwartzman, S.P., 2001. Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos. São Paulo, SP: Ilsi.
- Silva, F.L.N., Santos Jr., J.R., Neto, J.M.M., Silva, R.L.G.N.P., Flumignan, D.L., Oliveira, J.E., 2009. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí. *Revista Química Nova*. 32(1), 56-60.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. 175, 184-191.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 35(3), 206-21.
- Truchon, G., Tardif, R., Brodeur, J., 1999. *O*-Cresol; a good indicator of exposure to low levels of toluene. *Appl Occup Environ Hyg*. 14, 677–81.
- Uzma, N., Salar, B.M, Kumar, B.S., Aziz, N., David, M.A., Reddy, V.D., 2008. Impact of Organic Solvents and Environmental Pollutants on the Physiological Function in Petrol Filling Workers. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 5(3), 139-146.
- Valentine, J.L., Lee, S.S.T., Seaton, M.J., Asgharian, B., Farris, G., J.C. Corton, J.C., Gonzalez, F.J., Medinsky, M.A., 1996. Reduction of benzene metabolism and toxicity in mice that lack CYP2E1 expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 141, 205–213.
- Wang, G., Cai, P., Ansari, G.A.S., Khan, M.F., 2007. Oxidative and nitrosative stress in trichloroethene-mediated autoimmune response. *Toxicology*. 229, 186–193.
- Wink, D.A., Vodovotz, Y., Laval, J., Laval, F., Dewhirst, M.W. and Mitchell, J.B., 1998. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*. 19(5), 711-721.
- World Health Organization. WHO, 1993. Sources of human and environmental exposure. In: WHO. Benzene. Environmental Health Criteria 150. WHO, Geneva, pp. 28–31.
- Xiao, J.Q., Levin, S.M., 2000. The diagnosis and management of solvent-related disorders. *American Journal of Industrial Medicine*. 37(1), 44–61.

Xie, W.R., Deng, H., Li, H., 2006. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. *Neuroscience*. 142, 809–822.

Yoshida, A., Koide, Y., Uchijima, M., Yoshida, T.O., 1994. IFN-g induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochem Biophys Res Commun*. 198, 857-61.

TABLES

Table 1 - Relevants informations of study populations obtained through questionnaire individual application.

	G.S.A. (n = 21)	Painters (n = 12)
Variable	N (%)	N (%)
Exposure time/years		
0 – 5	9 (42,85)	2 (16,67)
5 – 10	3 (14,3)	4 (33,33)
10 – 15	2 (9,52)	4 (33,33)
> 15	7 (33,33)	2 (16,67)
Hours of exposure/day		
0 – 2	---	---
2 – 4	1 (4,5)	2 (16,6)
4 – 6	1 (4,5)	3 (25)
6 – 8	20 (91)	7 (58,4)
Use of PPE		
Yes	19 (86,4)	12 (100)
Not	3 (13,6)	---
Habits of alcohol consumption/week		
1	8 (36,3)	4 (33,3)
2	3 (13,7)	2 (16,7)
3	2 (9,0)	---
No	9 (41)	6 (50)

Questionnaire of use and occupational exposure to organic solvents for G.S.A. and painters.
G.S.A.: gas station attendants; PPE: personal protective equipment.

Table 2 - Effect of occupational exposure to organic solvents on the AST, ALT and γ -GT activities, and on the serum uric acid and creatinine levels.

	AST (U/L)	ALT (U/L)	γ-GT (U/L)	Uric acid (mg/dL)	Creatinine (mg/mL)
Control	20,0 \pm 1,13	25,0 \pm 2,41	33,0 \pm 3,18	4,73 \pm 0,30	0,92 \pm 0,04
G.S.A.	20,24 \pm 1,28	25,0 \pm 1,89	34,0 \pm 3,72	4,80 \pm 0,36	0,85 \pm 0,03
Painters	25,63 \pm 2,81	38,63 \pm 8,51* [#]	59,63 \pm 19,98	4,54 \pm 0,57	0,86 \pm 0,04

Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyltransferase (γ -GT) activities and levels of uric acid and creatinine. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM (n=8-22/group). ALT shows values *p<0.05 to painters vs. control group and [#]p<0.05 to painters vs. G.S.A. group. G.S.A.: gas station attendants.

Table 3 - Effect of occupational exposure to organic solvents on NPSH and AA contents and CAT and δ -ALA-D activities.

	NPSH (μ mol NPSH/mL plasma)	Ascorbic acid (μ g AA/mL plasma)	CAT (U CAT/mg protein)	δ-ALA-D (η mol PBG/mg protein/h)
Control	2395,28 \pm 56,63	3,16 \pm 0,39	52,51 \pm 4,39	21,15 \pm 1,04
G.S.A.	2567,08 \pm 58,42	2,76 \pm 0,20	54,46 \pm 3,05	21,05 \pm 0,92
Painters	2511,51 \pm 82,85	2,26 \pm 0,24	37,53 \pm 8,87	18,83 \pm 1,76

Non-protein thiols content (NPSH), ascorbic acid content (AA), catalase activity (CAT) and δ -aminolevulinate dehydratase activity (δ -ALA-D). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM (n=10-22/group). G.S.A.: gas station attendants.

FIGURES

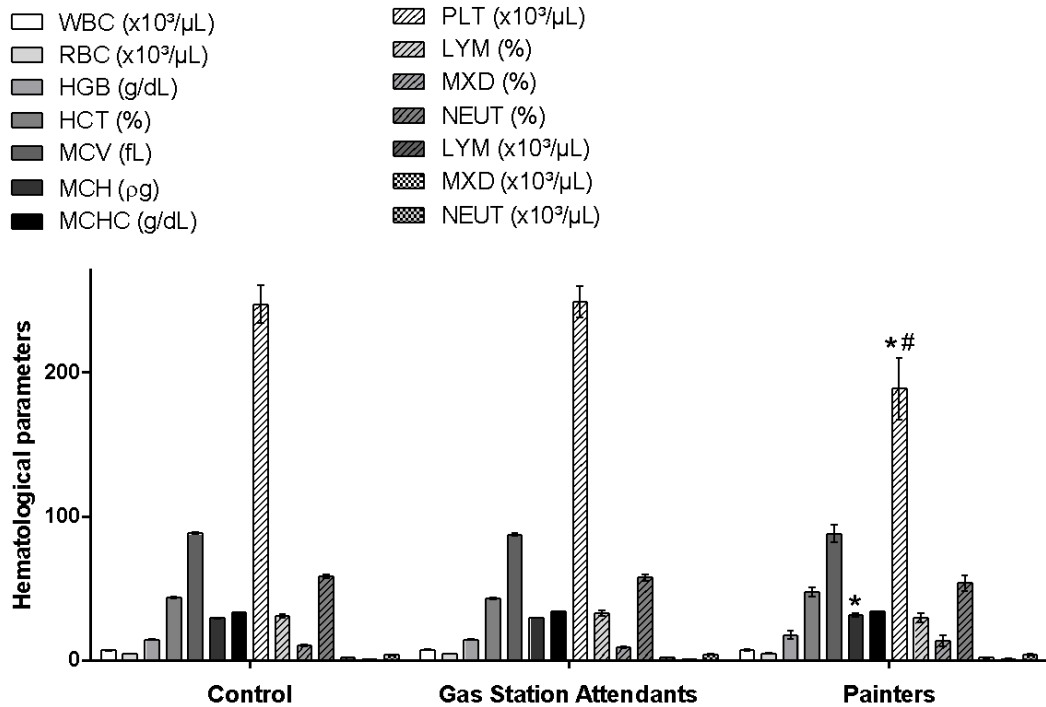


Figure 1 - Effect of occupational exposure to organic solvents on the hematological parameters. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. the control group and # $p < 0.05$ vs. the G.S.A. group (n=12-22/group).

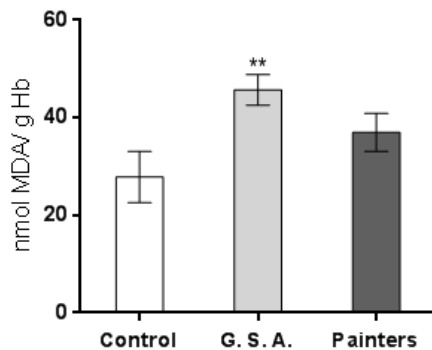


Figure 2 - Effect of occupational exposure to organic solvents on the malondialdehyde levels (MDA). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey

post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM. $^{***}p < 0.005$ vs. the respective control group (n=10-21/group). (G.S.A.: gas station attendants)

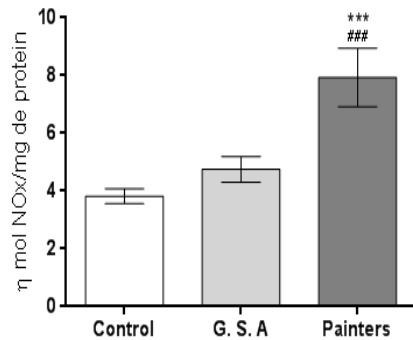


Figure 3 - Effect of occupational exposure to organic solvents on the nitric oxide levels (NO). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM. $^{***}p < 0.0005$ vs. the respective control group and $^{###}p < 0.0005$ vs. G.S.A. group (n=8-19/group). (G.S.A.: gas station attendants)

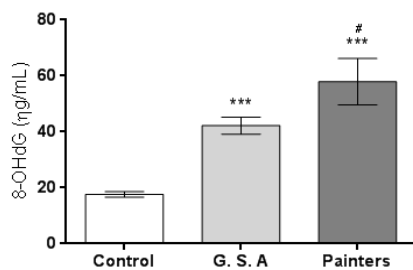


Figure 4 - Effect of occupational exposure to organic solvents on the 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) levels. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM. $^{***}p < 0.0005$ vs. the control group and $^{\#}p < 0.05$ vs. G.S.A. group (n=12-22/group). (G.S.A.: gas station attendants)

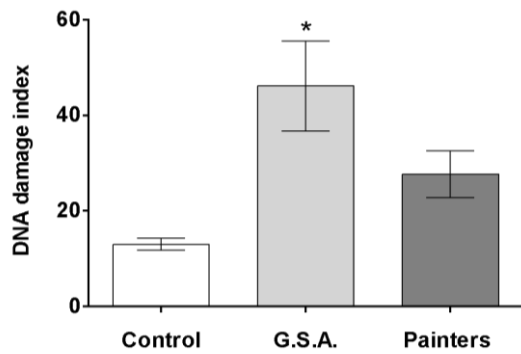


Figure 5 - DNA damage comparison between gas station attendants and painters with control. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. control group. (n=12-22/group). (G.S.A.: gas station attendants)

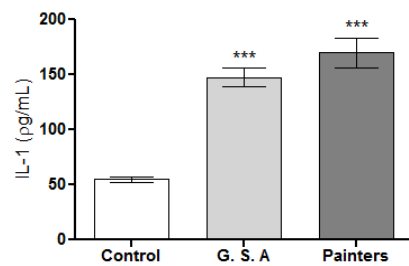


Figure 6 - Effect of occupational exposure to organic solvents on the interleukin-1 (IL-1) levels. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM. *** $p < 0.0005$ vs. the control group (n=12-22/group). (G.S.A.: gas station attendants)

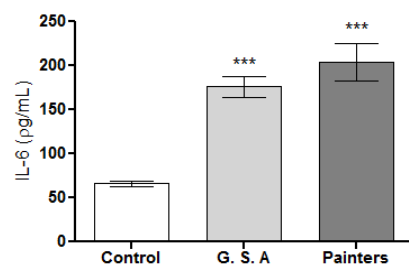


Figure 7 - Effect of occupational exposure to organic solvents on the interleukin-6 (IL-6) levels. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM. *** $p < 0.0005$ vs. the control group (n=12-22/group). (G.S.A.: gas station attendants)

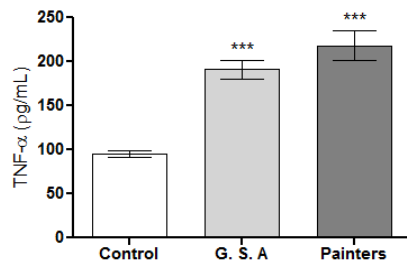


Figure 8 - Effect of occupational exposure to organic solvents on the tumor necrosis factor (TNF- α) levels. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM. *** p <0.0005 vs. the control group (n=12-22/group). (G.S.A.: gas station attendants)

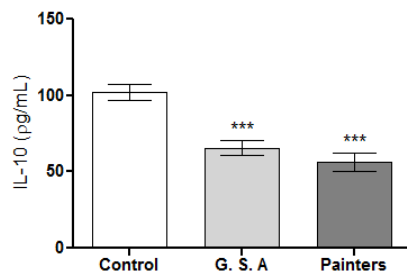


Figure 9 - Effect of occupational exposure to organic solvents on the interleukin-10 (IL-10) levels. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM. *** p <0.0005 vs. the control group (n=12-22/group). (G.S.A.: gas station attendants)

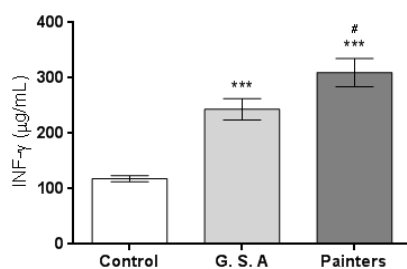


Figure 10 - Effect of occupational exposure to organic solvents on the interferon gamma (INF- γ) levels. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The results are expressed as a mean \pm SEM. *** p <0.0005 vs. the control group and # p <0.05 vs. the G.S.A. group (n=12-22/group). (G.S.A.: gas station attendants)

4 CONCLUSÕES

As medidas preventivas destinadas à segurança no manuseio das inúmeras substâncias tóxicas, as quais o homem encontra-se exposto em seus diferentes ambientes de trabalho, são conhecidas como procedimentos de monitoramento, e é de fundamental importância o conhecimento aprofundado sobre os principais agentes tóxicos e situações de exposição ao qual o trabalhador está exposto.

Com relação aos resultados obtidos neste trabalho, nós podemos concluir que:

- Foram observados efeitos genotóxicos, uma vez que os dois marcadores de genotoxicidade avaliados (8-ohdg e ensaio do cometa) mostraram-se alterados no grupo de frentistas, enquanto que nos pintores somente os níveis de 8-ohdg apresentaram alterações.

- Entre os marcadores de dano oxidativo, observamos que os níveis de MDA foram significativamente aumentados nos frentistas, demonstrando uma elevação na peroxidação lipídica entre os trabalhadores deste grupo. Entre os pintores, os níveis de ON apresentaram aumento significativo, o que pode estar relacionado com estresse oxidativo ou com alterações inflamatórias.

- Todos os parâmetros inflamatórios avaliados neste trabalho foram alterados. A IL-10, que apresenta atividade anti-inflamatória, teve seus níveis diminuídos em ambos os grupos. As citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, TNF- α e INF- γ foram aumentadas em ambos os grupos de trabalhadores, sendo que os níveis de INF- γ apresentaram-se maiores nos pintores com relação aos frentistas.

- Entre os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo, a atividade da enzima ALT foi significativamente aumentada no grupo dos pintores, e apesar de não serem observadas diferenças significativas, as atividades das enzimas AST e γ -GT também foram elevadas nos pintores em relação ao grupo controle.

- Entre os parâmetros hematológicos, observamos uma diminuição no HCM no grupo dos pintores, além de uma redução significativa na contagem de plaquetas neste grupo, tanto em relação ao grupo controle como ao grupo de frentistas.

- Os indicadores biológicos de exposição não apresentaram alterações significativas nos trabalhadores expostos com relação ao grupo controle.

- As duas classes de trabalhadores expostos a solventes orgânicos apresentaram várias alterações importantes em diferentes marcadores. É difícil afirmar que um dos grupos seja mais suscetível ao desenvolvimento de doenças em decorrência da exposição ocupacional

que o outro. Enquanto pintores parecem ter uma tendência maior a apresentar alterações nos marcadores de dano hepático e parâmetros hematológicos, os frentistas apresentaram algumas alterações em marcadores de genotoxicidade que não se alteraram nos pintores.

Nosso trabalho apresentou resultados bastante expressivos quanto à relação entre esta exposição e alterações em marcadores de dano genético e inflamatório principalmente. Estes dados nos levam a considerar a necessidade da busca e estabelecimento de marcadores mais sensíveis e específicos para estas alterações, visto que os indicadores biológicos de exposição, estabelecidos pela legislação, mantiveram-se dentro dos níveis recomendados para os solventes estudados.

REFERÊNCIAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). **US Department of Health and Human Services**; Public Health Service, 1995. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=122&tid=25>. Acesso: janeiro de 2015.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological Profile for Benzene**. Atlanta, GA, pp. 438, 2007.
- ALBERTINI, R. J. et al. Molecular epidemiological studies in 1,3-butadiene exposed Czech workers: female–male comparisons. **Chemico-Biological Interactions**, n.166, p. 63-77, 2007.
- AMENO, K. ET AL. A fatal case of oral ingestion of toluene. **Forensic. Sci. Int.** 41:255-260, 1989.
- AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS, ACGIH. **Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices**. 6th Ed., Cincinnati, OH. v. 3, 1732–1740, 1992.
- AMORIM, L. C. A., **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 158, 2003.
- ANGELINI, S. et al. Exposure to low environmental levels of benzene: evaluation of micronucleus frequencies and S-phenylmercapturic acid excretion in relation to polymorphisms in genes encoding metabolic enzymes, **Mutat. Res.** v. 719, p. 7–13, 2011.
- AYLWARD, L.L., H.A. BARTON, S.M. HAYS, Biomonitoring equivalents (BE) dossier for toluene, **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 51 S27–S36, 2008.
- BAELUM, J. et al. Hepatic metabolism of toluene after gastrointestinal uptake in humans. **Scand. J. Work Environ. Health**, v.19, p. 55-62, 1993.
- BAI, W. et al. Aberrant miRNA profiles associated with chronic benzene poisoning. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 96, p. 426–430, 2014.
- BAKE, M.A. et al. Health risk assessment to perchlorethylene during dry cleaning. **Proceedings of 21th International Symposium Industrial Toxicology 2001, Bratislava, May 30 –June 1**, p. 45–48, 2001.
- BARBERINO, J. L. et al. Alterações hepáticas em trabalhadores de uma refinaria de petróleo e em uma população de referência no estado da Bahia, Brasil. **Revista Panamericana de la Salud Publica**, v.17, n.1, p.30–7, 2005.
- BELL, G.M.; HOWSE, M.L.P. Substance misuse, organic solvents and kidney disease. In: van Ypersele C, ed. **Oxford textbook of clinical nephrology**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 2005.
- BERTONCELLO, I.; **Monografia de especialização em Audiologia Clínica, Centro de Especialização em Audiologia Clínica**: Porto Alegre, 1999.

- BLANCHARD K. T.; MORRIS J. B. Effects of m-xylene on rat nasal cytochrome P -450 mixed function oxidase activity. **Toxicology Letters**. v.70, p. 253-259, 1994.
- BOGADI-SÂRE, A., ZAVALIC, M., TROSIC, I. Study of some immunological parameters in workers occupationally exposed to benzene. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v.73, p. 397-400.
- BOMAN, A., MAIBACH, H.I. Influence of evaporation and solvent mixtures on the absorption of toluene and n-butanol in human skin *in vitro*. **Ann. Occup. Hyg.**, v. 44, p.125–135, 2000.
- BRASIL, MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO (MTE). Portaria N° 34, de 20 de dezembro de 2001. Protocolo para a utilização de indicador biológico da exposição ocupacional ao benzeno. Disponível em: <http://portal.mte.gov.br/legislacao/portaria-n-34-de-20-12-2001-1.htm>. Acesso em fevereiro de 2015.
- BROUSSARD, L. A. The role of the laboratory in detecting inhalant abuse. **Clinical Laboratory Science**, v.13, p. 205-209, 2000.
- BRUNMARK, A; CADENAS, E. Reductive addition of glutathione to p-benzoquinone, 2-hydroxy-p-benzoquinone, and p-benzoquinone epoxides. Effect of hydroxy- and glutathionyl substituents on p-benzoquinone autooxidation. **Chem. Biol. Interact.**, v.86, p.273-298, 1988.
- BUDAVARI, S. **The Merck Index**, 12th Ed., Whitehouse Station, NJ, Merck & Co., p. 1626, 1996.
- BURRIDGE, E. Chemical Profile: Benzene. **ICIS Chemical Business** (Europe/Middle East/Asia), v. 2, n.57, p. 36, 2007.
- CAI, P. et al. Chronic exposure to trichloroethene causes early onset of SLE-like disease in female MRL +/- mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 228, p. 68–75, 2008.
- CARVAJAL, G. et al. Exposición ocupacional a solventes orgânicos y alteraciones en la visión del color en trabajadores de una empresa de hidrocarburos. **Actualizaciones em Enfermeria**, Bogotá, v.7, n.2, p. 7-10, 2004.
- CARVALHO, F. C. et al. Alteração de enzimas hepáticas em trabalhadores de refinaria de petróleo. **Revista Saúde Pública**, v.40, n.1, p.92- 98, 2006.
- CASTRO, T. M. et al. Biossegurança e biosseguridade do manuseio do xilol em laboratórios de anatomia patológica. **Brasília Médica**. v.47, n.1, p.100-07, 2010.
- CHEN, C. M., et al. Increased oxidative damage in peripheral blood correlates with severity of Parkinson's disease. **Neurobiol. Dis**. v.33, p.429-35.
- CHU, WEN-MING. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**, v. 328, p. 222–225. 2013.

COLLINS, A. R. **Mol. Biotechnol.**, v. 26, p. 249–261, 2004.

COLLINS, J. J., et al. Lymphohaematopoietic cancer mortality among workers with benzene exposure. **Occup. Environ. Med.**, v.60, p. 676–679, 2003.

COLLINS, J.J., IRELAND, B.K., EASTERDAY, P.A. Evaluation of lymphopenia among workers with low-level benzene exposure and the utility of routine data collection. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v.3, p.232-237, 1997.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA. Brazilian Agricultural And Livestock Confederation, 2008.

COOPMAN, M. L. Corrección de indicadores biológicos por creatinina. **Alternativa correcta. Ciencia y Trabajo**, Santiago, n. 9, p. 76-80, 2007.

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

COX, LA. Biological basis of chemical carcinogenesis: insights from benzene. **Risk Anal**, v.11 ,p. 453-464, 1991.

D'AMBROS, D. **Os efeitos dos combustíveis na saúde dos trabalhadores de postos de abastecimento**. Dambros Tecnologia em Segurança do Trabalho, 2009. Disponível em: <<http://www.dambros.com.br/HTML/artigos5.asp>>. Acesso em 5 de fevereiro de 2015.

DE MELO LISBOA, H. et al. Amostragem e análise físico química de compostos orgânicos voláteis e odorantes. In: III Congresso Interamericano de Qualidade do ar da AIDIS. Canoas, RS, 2003. CD Rom.

DEWULF, J.; LANGENHOVE, H.V.; WITTMANN, G. Analysis of volatile organic compounds using gas chromatography. **Trends In Analytical Chemistry**: v. 21, p.637-646, 2002.

DICK, F.D. Solvent neurotoxicity. **Occup. Environ. Med.**, v.63, p.221–226, 2006.

DIEZ, U., et al. Effects of indoor painting and smoking on airway symptoms in atopy risk children in the first year of life results of the LARS-study. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. v. 203, n.1, p. 23–28, 2000.

DUCOS, P. et al. Improvement in HPLC Analysis of Urinary trans,trans-Muconic Acid, a Promising Substitute for Phenol in the Assessment of Benzene Exposure. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v.62, p. 529-534, 1990.

DUTKIEWICZ, T; TYRAS, H. Skin absorption of toluene, styrene and xylene by man. **Br. J. Ind. Med.**, v.25, p.243, 1968.

EGLĪTE, M. (2000). Īmisko faktoru izraisītā arodpatoloģija. Professional pathology caused by chemical factors. Grām: **Darba medicīna**. v.1, p.136.–352.lpp.). Rīga (in Latvia).

ERHOLA, M. et al. Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-20-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment. **FEBS Lett.** V.409, p.287-91, 1997.

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

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. **Nature** (London, U. K.), v.408, p. 239, 2000.

FRACASSO, M. E. et al. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. **Mutat. Res.** v.515, p. 159–169, 2002.

FRANCZAK, A. et al. The effect of tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 1 β (IL1 β) and interleukin 6 (IL6) on endometrial PGF2 α synthesis, metabolism and release in early-pregnant pigs. **Theriogenology.** v. 77, n. 1, p. 155–1, 2012.

FRANTZ, C. E.; CHEN, H; EASTMOND, D. A. Inhibition of human topoisomerase II in vitro by bioactive benzene metabolites. **Environ. Health Perspect.** v.104, n.6, p. 1319-1323, 1996.

FUSTINONI, S. et al. Biological monitoring in occupational exposure to low levels of 1,3-butadiene. **Toxicology Letters**, n. 149, p. 353–60, 2004.

GASKELL, M.; MCLUCKIE, K. I.; FARMER, P. B. Genotoxicity of the benzene metabolites para-benzoquinone and hydroquinone. **Chem. Biol. Interact.**, 153-154: 267–270, 2005.

GÉRIN, M. et al. Associations between several sites of cancer and occupational exposure to benzene, toluene, xylene, and styrene: results of a case-control study in Montreal. **American Journal Industrial Medicine**, n. 34, p. 144–156, 1998.

GOLDMAN, C. F. **Análise de acidentes de trabalho ocorridos na atividade da indústria metalúrgica e metal-mecânica no Estado do Rio Grande do Sul em 1996 e 1997 – breve interligação sobre o trabalhador soldador. Dissertação (mestrado):** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção, Porto Alegre, 2002.

GONÇALVES, C. G. O.; DIAS, A. Três anos de acidentes do trabalho em uma metalúrgica: caminhos para seu entendimento. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, n. 2, p. 635-646, 2011.

GONÇALVES, R. O. et al. Efeitos genotóxicos e alterações de enzimas hepáticas em trabalhadores do refino do petróleo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** v.41, n.5, p. 297-299, 2005.

GRACIANI, F. S.; FERREIRA, B. V.; SALVIANO, D. C. M. **Proteção ao meio ambiente do trabalho:** considerações sobre a exposição ocupacional ao benzeno. Anais do IV Fórum Ambiental da Alta Paulista, v.4, 2008.

GREER, J. E. Adolescent abuse of typewriter correction fluid. **South. Med. J.**, v.77, p.297–298, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4th edn, Clarendon Press, Oxford, p.79-113, 2007.

HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? **Free Radic. Res.**, v.33, p.819-30, 2000.

HAYES, M. P.; FREEMAN, S. L.; DONNELLY, R. P. IFN-g priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. **Cytokine**, v.7,p.427 – 35, 1995.

HAYES, R. B.; YIN, S. N.; DOSEMECI, M. Mortality among benzene-exposed workers in China. **Environ Health Perspect**, v.104, p. 61349–1352, 1996.

HENDERSON, A. P.; BLEASDALE, C.; DELANEY, K. Evidence for the formation of Michael adducts from reactions of (E,E)-muconaldehyde with glutathione and other thiols. **Bioorg Chem**, v. 33, p. 363–373, 2005.

HERNANDEZ-URZUA, M. A.; ALVARADO-NAVARRO, A. Interleucinas e imunidade innata. **Rev. Biomed.**, v. 12, p. 272-280, 2001.

INOUE, O. et al. Urinary t,t Muconic Acid as an Indicator of Exposure to Benzene. **British Journal of Industrial Medicine**, v.46, p. 122-127, 1989.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Carcinogenicity of benzene, toluene and xylene: epidemiological and experimental evidence. **Sci. Publ.** v. 85, p. 3–18, 1988.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.**, v. 71, p. 1–1589, 1999.

JACOBSON, G. A.; McLEAN, S. Biological monitoring of low level occupational xylene exposure and the role of recent exposure. **The Annals of Occupational Hygiene**, v. 47, n. 4, p. 331-336, 2003.

KERETETSE, G. S. et al. DNA damage and repair detected by the comet assay in lymphocytes of African petrol attendants: a pilot study. **The Annals of Occupational Hygiene**, v. 52, n. 7, p. 653-62, 2008.

KIM, S. Y. et al. Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. **Pharmacogenetics**, v. 14, p. 453–463, 2004.

KIRSCHNER, M. **Chemical Profile: Benzene**. ICIS Chemical Business, 2009. Disponível em: <http://www.icis.com/Articles/2009/02/16/9192064/Chemical-profileBenzene.html>. Acesso em fevereiro de 2015.

KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J. **Occupational Toxicology. Casarett and Doull's Toxicology**, 6th ed., New York: United States, 2001.

KODAVANTI, P. R. S. et al. Toluene Effects on Gene Expression in the Hippocampus of Young Adult, Middle-Age, and Senescent Brown Norway Rats. **Toxicol. Sci.**, v.126, n.1, p. 193-212, 2011.

KOLACHANA, P.; SUBRAHMANYAM, V. V.; MEYER, K. B.; ZHANG, L.; SMITH, M. T. Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells in vitro and in the bone marrow in vivo. **Cancer Research**, v. 53, n. 5, p.1023–1026, 1993.

KOTZIAS, D. Exposure to multiple air contaminants in public buildings, schools and kindergartens – the European indoor air monitoring and exposure assessment (AIRMEX) study. **Fresen. Environ. Bull.**, v.18, p. 670–681, 2009.

KOZEL, N.; SLOBODA, Z.; DE LA ROSA, M. **Epidemiology of Inhalant Abuse: An International Perspective**. US Department of Health and Human Services, Washington, DC. **NIDA Res. Mon.**, p. 14, 1995.

LA BAER, J. J. **Proteome Res.**, v. 4, p. 1053, 2005.

LAM, L. K. T. et al. Inhibition of chemically induced carcinogenesis by 2-n-heptylfuran and 2-n-butylthiophene from roast beef aroma In: Mussinan, C. J.; KEELAN, M. E, (Eds). **Sulfur Comp. in Food**. Washington, DC: ACS Symposium Series, p. 278-291, 1994.

LAM, L. K. T.; SPARNINS, V.L.; WATTENBERG, L. W. Isolation and identification of kahweolpalmitate and cafestolpalmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione s-transferase activity in the mouse. **Cancer Research**, v. 42, p. 1193-1198, 1982.

LAMM, S. H.; ENGEL, A.; BYRD, D. M. Non-Hodgkin lymphoma and benzene exposure: a systematic literature review. **Chem. Biol. Interact.**, v. 30, p. 231–7, 2005.

LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo, SP: Manole, 1997.

LAROUX, F. S. et al. Role of nitric oxide in inflammation. **Acta Physiol. Scand.** v.173,n. 1,p.113–118, 2001.

LAUWERYS, R. R. Occupational Toxicology. In: Klaassen, C. D., Amdur, M. O., Doull, J., editors. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1996. p.987-1009.

LEHMANN, I. et al. Enhanced in vivo IgE production and T cell polarization toward the type 2 phenotype in association with indoor exposure to VOC: results of the LARS study. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 204, p. 211–221, 2001.

LEHMANN, I. et al. T cell reactivity in neonates from an East and a West German city – results of the LISA study. **Allergy**, v. 57, n. 129–136, 2002.

LEINONEN, J. et al. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. **FEBS Lett**, v. 417, p. 150-2, 1997.

- LI, B.; LI, Y.Q.; YANG, L.J. et al. Decreased T-cell receptor excision DNA circles in peripheral blood mononuclear cells among benzene-exposed workers. **Int. J. Immunogenet.**, v. 36, p. 107–111, 2009.
- LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**, 89th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 3–32, 2008.
- LIDE, D.R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**, 76th Ed., Boca Raton, FL, CRC Press, p. 3-55, 1995.
- LIDE, D.R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**, 78th Ed., Boca Raton, FL, CRC Press, p. 3-39, 1997.
- LINDSEY, R. H. et al. 1,4-Benzoquinone is a topoisomerase II poison. **Biochemistry**, v. 43, p. 7563–7574, 2004.
- LIU, L. et al. The study of DNA oxidative damage in benzene exposed workers, **Mutat. Res.**, v. 370, p. 145–150, 1996.
- LORENC, J. D. Inhalation abuse in the pediatric population: a persistent challenge. **Current Opinions in Pediatrics**, v. 15, p 204 -209, 2003.
- LOW, L. K.; LAMBERT, C. D.; MEEKS, J. R. Tissue-specific metabolism of benzene in Zymbal gland and other solid tumor target tissues in rats. **J Am Coll Toxicol**, v. 14, p. 40-60, 1995.
- LUTZ, W.K.; SCHLATTER, C.H. A closed inhalation chamber for quantitative metabolism studies of volatile compounds with small laboratory animals. **Toxicol. Lett**, v. 1, p. 83-87, 1977.
- MAESTRI, L. et al. 1996, **G. Toxicol. Lett.**, v. 88, n. 1, p. 43, 1996.
- MAÎTRE, A. et al. Exposure to carcinogenic air pollutants among policemen working close to traffic in an urban area. **Scand. J. Work Environ. Health**, v. 28, p. 402–410, 2000.
- MANINI, P. et al. Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi drivers. **Toxicol. Lett.**, v. 167, p. 142–151, 2006.
- MANINI, P.; PALMA, G., MUTTI, A. Exposure assessment at the workplace: implications of biological variability. **Toxicol Lett.**, v.168, p.210–8, 2007.
- MANNO, M. et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). **Toxicol Lett.**, v. 192, p.3-16, 2009.
- MARLATT, M. et al. Alzheimer's disease: cerebrovascular dysfunction, oxidative stress, and advanced clinical therapies. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 15, n. 199–210, 2008.
- MARTÍNEZ-ALFARO, M. et al. Thinner inhalation effects on oxidative stress and DNA repair in a rat model of abuse. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 226–232, 2010.

MISTRY, A. R.; FELIX, C. A.; WHITMARSH, R. J. DNA topoisomerase II in therapy-related acute promyelocytic leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, p. 1529–1538, 2005.

MORO, A. M. et al. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. *Science of the Total Environment*, v.408, p.4461–4467, 2010.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. of Immunol.**, v. 7, p.145–173, 1989.

MURATA, M.; TSUJIKAWA, M.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage by minor metabolites of toluene may lead to carcinogenesis and reproductive dysfunction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 261, p. 478–483, 1999.

MUTTAMARA, S.; LEONG, S. T.; ARAYASIRI, M. Benzene and lead exposure assessment among occupational bus drivers in Bangkok traffic. **J. Environ. Sci. (China)**, v. 16, p. 61–66, 2004.

NAGY, G. et al. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity, **Immunol. Lett.** v.111, n. 1, p. 1–5, 2007.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB Journal**, v.6, p.3051-3064, 1992.

NATIONAL OCCUPATIONAL HEALTH AND SAFETY COMMISSION. Exposure standards—xylene (o-, m-, p- isomers). Canberra: National Occupational Health and Safety Commission. p. 4, 2002.

NICULESCU, R.; RENZ, R. F.; KALF, G. F. **Benzene-induced bone marrow cell depression caused by inhibition of the conversion of pre-interleukins-1 α and -1 β to active cytokines by hydroquinone, a biological reactive metabolite of benzene.** In: **Biological reactive intermediates** V. Snyder, R, ed. New York: Plenum Press, 1996.

NIKI, E. Antioxidants and atherosclerosis. **Biochem. Soc. Trans**, v. 32, p.156-159, 2004.

NILSON, L.N. et al. Influence of solvent exposure and aging on cognitive functioning: An 18 year follow up of formerly exposed floor layers and their controls. **Occup. Environ. Med.**, v. 59, p. 49–55, 2002.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, p. 1287-312, 2001.

NTP. Benzene NTP 11th Report on Carcinogens. **Rep Carcinog**, v. 11, p. 1–32, 2005.

O'NEIL, M. J. **The Merck Index, 14th ed.** Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., p. 177, 2006.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia.** 2nd ed. São Paulo: Atheneu; p. 205, 2003.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3th ed. Ateneu: São Paulo, p. 241-324, 2008.

ONG, C. et al. Biomarkers of exposure to low concentrations of benzene: a field assessment. **Occup. Environ. Med.**, v. 53, p. 328-333, 1996.

OSTLING, O. et al. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 123, p. 291-8, 1984 .

PEDERSEN-BJERGAARD, J. et al. Genetics of therapyrelated myelodysplasia and acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 22, p. 240–248, 2008.

PESCH, B.; HAERTING, J.; RANFT, U. Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter urothelial and renal câncer study. **Int J Epidemiol**, v. 29, p.1014–1024, 2000.

PFEIFER, R. W.; IRONS, R. D. Alteration of lymphocyte function by quinones through sulfhydryl-dependent disruption of microtubule assembly. **Int J Immunopharmacol**, v.5, p.463-470, 1983.

PIERCE, C.H. et al. Biological monitoring of controlled toluene exposure. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v.71, p.433–444, 1998.

PORRU, S. et al. Primary liver cancer and occupation in men: a casecontrol study in a high-incidence area in Northern Italy. **Int J Cancer**, v. 94, p. 878–83, 2001.

POVEY, A. et al. Cytochrome P2 polymorphisms and susceptibility to scleroderma following exposure to organic solvents. **Arthritis and rheumatism**, v. 44, p. 662–665, 2001.

RAMANA, C. V. et al. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-g-dependent signaling. **Trends Immunol.**, v. 23, p. 96 – 101, 2002.

RENZ, J. F.; KALF, G. F. Role for interleukin-1 (IL-1) in benzene-induced hematotoxicity: inhibition of conversion of pre-IL-1alpha to mature cytokine in murine macrophages by hydroquinone and prevention of benzene-induced hematotoxicity in mice by IL-1alpha. **Blood**, v. 78, p. 938-944, 1991.

RHODES, A. G.; LEMASTERS, G. K.; LOCKEY, J. E. The effects of jet fuel on immune cells of fuel system maintenance workers. **J. Occup. Environ. Med.**, v. 45, p.79-86, 2003.

RICKERT, D. E.; BAKER, T. S.; BUS, J. S. Benzene disposition in the rat after exposure by inhalation. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.49, p. 417-423, 1979.

Rivedal, E. & Witz, G. Metabolites of benzene are potent inhibitors of gap-junction intercellular communication. **Arch. Toxicol.**, v. 79, p. 303–311, 2005.

ROTHMAN, N.; SMITH, M. T.; HAYES, R. B. Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C/T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. **Cancer Res.**, v. 57(14), p. 2839–2842, 1997.

RUDEL, R. A.; ATTFIELD, K. R.; SCHIFANO, J. N. Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. **Cancer**, v. 109, p. 2635-66, 2007.

RUPPERT, T. et al Trans, trans-Muconic Acid as a Biomarker of non-Occupational Environmental Exposure To Benzene. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 69, p.247-252, 1997.

SAMOTO, H. et al. Field survey on types of organic solvents used in enterprises of various sizes. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 79, p. 558–567, 2006.

SARIGIANNIS, D. A. et al. Exposure to major volatile organic compounds and carbonyls in European indoor environments and associated health risk. **Environ. Int.**, v. 37, pp. 743–765, 2011.

SATO, S.; MIZUNO, Y.; HATTORI, N. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels as a biomarker for progression of Parkinson disease. **Neurology**, v. 64, p. 1081-3, 2005

SCHAFFER, F. Q.; Buettner, G. R. **Free Radical Biol. Med.**, v. 30, p. 1191, 2001.

SCHMIDT, H. H. H. W.; WALTER, U. NO at work. **Cell**, v.78, p.919- 925, 1994.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SMITH, M. T. The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. **Environ Health Perspect**, v. 104, p. 61219–1225, 1996.

SMITH, M. T.; JONES, R. M.; SMITH, A. H. Benzene exposure and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, p. 385–91, 2007.

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

SPILLER, H.A.; KRENZELOK, E.P. Epidemiology of inhalant abuse reported to two regional poison centers. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.** V. 35, p. 167–173, 1997.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. JR. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev.**, v. 84(4), p.1381-478, 2004.

SUBRAHMANYAM, V. V.; DOANE-SETZER, P.; STEINMETZ, K. Phenol-induced stimulation of hydroquinone bioactivation in mouse bone marrow in vivo: possible implications in benzene myelotoxicity. **Toxicology**, v. 62, p. 107- 116, 1990.

TANIGAWA, T.; ARAKI, S.; NAKATA, A. Decreases of natural killer cells and T-lymphocyte subpopulations and increase of B lymphocytes following a 5-day

occupational exposure to mixed organic solvents. **Arch Environ Health**, v. 56, p. 443-448, 2001.

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.

TICE, R. R. et al. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 35, p. 206–221, 2000.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) **Toxicological review of benzene** (non-cancer effects). Washington, DC; October 2002.

VAN SITBERT, N. J. et al. Biomarkers of exposure to 1,3-butadiene as a basis for cancer risk assessment. **Toxicological Sciences**, n. 56, p. 189–202, 2000.

VERSCHUEREN, K. **Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals**, 3rd Ed., New York, Van Nostrand Reinhold, p. 1721–1729, 1996.

WAN, J.; WINN, L. M.; In utero exposure to benzene increases embryonic c-Myb and Pim-1 protein levels in CD-1 mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V.228, n.3, p. 326–333, 2008.

WANG, G. et al. Oxidative and nitrosative stress in trichloroethene-mediated autoimmune response. **Toxicology**, v. 229, p. 186–193, 2007.

WATTENBERG, L.M. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. **Cancer Research**, v. 43, p. 2448-2453, 1983.

WEISS, N. S. Cancer in relation to occupational exposure to trichloroethylene. **Occup Environ Med**, v.53, p.1–5, 1996.

WHEATLEY, J. B. et al. Examination of glutathione S-transferase isoenzyme profiles in human liver using high-performance affinity chromatography. **J Chromatogr**, v. 663, p. 53-63, 1994.

WHYSNER, J.; REDDY, M. V.; ROSS, P. M. Genotoxicity of benzene and its metabolites. **Mutat Res**, v. 566, p. 99–130, 2004.

WILLIAMS, P. R. D.; PANKO, J. M.; UNICE, K. Occupational exposures associated with petroleum-derived products containing trace levels of benzene. **J Occup Environ Hyg**, v. 5, p. 565–574, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Sources of human and environmental exposure. In: WHO. Benzene. **Environmental Health Criteria**, Geneva, v. 150, p. 28–31, 1993.

XIAO, J.Q.; LEVIN, S.M.. The diagnosis and management of solvent- related disorders. **Amer. J. Ind. Med.**, v. 37, p. 44–61, 2000.

XIE, Q. W.; WHISNANT, R.; NATHAN, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon-g and bacterial lipopolysaccharide. **J Exp Med** v. 177, p. 1779 – 84, 1993.

XIE, W.R., DENG, H., LI H. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. **Neuroscience**, v. 142, p. 809–822, 2006.

YAKUBU, M. T.; AKANJI, M. A.; OLADIJI, A. T. Hematological evaluation in male albino rats following chronic administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem. **Phcog Mag**. v. 0973-1296, p. 34-38, 2007.

YOSHIDA, A. et al. IFN-g induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. **Biochem Biophys Res Commun**, v.198, p. 857 – 61, 1994.

ZHANG, L.; ROTHMAN, N.; LI, G. Aberrations in chromosomes associated with lymphoma and therapyrelated leukemia in benzene-exposed workers. **Environ Mol Mutagen**, 48: 467–474, 2007.

ZHANG, L.; ROTHMAN, N.; WANG, Y. Benzene increases aneuploidy in the lymphocytes of exposed workers: a comparison of data obtained by fluorescence in situ hybridization in interphase and metaphase cells. **Environ Mol Mutagen**, v. 34, p. 260–268, 1999.

ZWART, L. et al. **Free Radical Biol. Med.**, v. 26, p. 202, 1999.

ANEXO I**QUESTIONÁRIO SOBRE USO E EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A SOLVENTES****Nome:** _____**Idade:** _____**Sexo:** _____**Empresa:** _____**Tipo de solvente ao qual está exposto no ambiente de trabalho (tinta, vernizes, tiner, combustível):** _____

1. Há quanto tempo você trabalha com solventes?

 0 a 5 anos 5 a 10 anos 10 a 15 anos mais de 15 anos

2. Quantas horas por dia você trabalha com solventes?

 0 a 2 horas 2 a 4 horas 4 a 6 horas 6 a 8 horas

3. Você conhece os efeitos tóxicos relacionados ao uso de solventes?

 sim não vagamente

4. Você utiliza equipamentos de proteção individual (luvas, máscaras, óculos...) ou coletiva (capela, exaustor) durante o manuseio destas substâncias?

 sim **QUAIS?** _____ não

5. Você apresenta alguma patologia crônica (por exemplo: diabetes, doença pulmonar, cardíaca, hepatite ou outro)?

 sim **QUAL?** _____ não

6. Você teve algum problema de saúde relacionado ao uso de solventes orgânicos?

 sim **QUAL?** _____ não

7. Você tem o hábito de consumir bebidas alcoólicas?

- sim, uma vez por semana geralmente
- sim, duas vezes por semana geralmente
- sim, três vezes por semana ou mais
- não

8. A empresa na qual você trabalha costuma solicitar exames de saúde para monitorar sua exposição a solventes?

- sim não

9. Há quanto tempo é realizada esta monitoração (responda somente se a resposta da questão 9 for “sim”)?

- um a dois anos três a quatro anos
 dois a três anos desde que comecei a trabalhar com solventes

10. Qual a periodicidade da solicitação deste exame (responda somente se a resposta da questão 9 for “sim”)?

- mensal semestral anual

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário do projeto de pesquisa intitulado “**AValiação DE DIFERENTES MARCADORES DE DANO OXIDATIVO, GENOTOXICIDADE E INFLAMAÇÃO EM TRABALHADORES EXPOSTOS A SOLVENTES NO MUNICÍPIO DE SANTA MARIA, RS**” sob responsabilidade dos pesquisadores Ricardo Brandão e Lílian Marquezini da Silva, ambos residentes no município de Santa Maria. Este projeto tem como Instituição Proponente a Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.

Esta pesquisa busca contribuir para a investigação dos fatores de risco relacionados ao uso ocupacional de solventes, através de análises toxicológicas, bioquímicas e hematológicas.

Para tanto, será necessário colher uma amostra de seu sangue (10 mL) para detectar possíveis alterações de sua função hepática e renal (AST/ALT, bilirrubina, creatinina). Eventualmente, após esta punção, poderá apresentar uma pequena mancha roxa ou sensação dolorosa no local da picada. Isto passará após pouco tempo. Você também deverá coletar uma amostra de urina (50 mL) para a realização de alguns exames.

Como benefício, esta pesquisa propiciará o conhecimento dos resultados de alguns exames laboratoriais que normalmente não são disponibilizados em laboratórios de rotina (ácido metilhipúrico, ácido hipúrico, ácido trans, trans mucônico e ácido mandélico), o que contribuirá para uma avaliação médica mais ampla e, conseqüentemente, uma avaliação mais detalhada do seu estado de saúde.

Todas as informações pessoais por você fornecidas serão anônimas, e os resultados obtidos após a análise do seu sangue serão confidenciais e, estes últimos, só serão utilizados para divulgação de trabalhos científicos em eventos e/ou periódicos da área. Você não terá quaisquer direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Além de não receber nada em troca de sua participação na pesquisa, você não terá custo algum ao participar da mesma.

Não haverá nenhuma restrição ou penalização caso você decida recusar ou retirar seu consentimento em relação a sua participação neste estudo em qualquer momento da pesquisa. Ao assinar na linha abaixo, significa que você foi devidamente esclarecido e concorda em participar da pesquisa descrita acima. Para maiores esclarecimentos durante o período de pesquisa, você poderá contatar o pesquisador responsável a qualquer momento.

Santa Maria-RS, de de

Telefones para contato:

Ricardo Brandão
UFSM: 3220.8941
E-mail: ricardo_br79@yahoo.com.br

Qualquer dúvida entrar em contato com o CEP-UFSM:

Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - Sala 702
Cidade Universitária - Bairro Camobi

97105-900 – Santa Maria - RS
Tel.: (55) 3220 9362