

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

**INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO A
SOLVENTES ORGÂNICOS E SUA INTER-RELAÇÃO
COM O ESTRESSE OXIDATIVO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rachel Picada Bulcão

Santa Maria, RS, Brasil.

2008

INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO A SOLVENTES ORGÂNICOS E SUA INTER-RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO

por

Rachel Picada Bulcão

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Solange Cristina Garcia

Santa Maria, RS, Brasil.

2008

**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

**INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO A SOLVENTES
ORGÂNICOS E SUA INTER-RELAÇÃO COM O ESTRESSE
OXIDATIVO**

elaborada por
Rachel Picada Bulcão

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Solange Cristina Garcia, Prof.^a Dr.^a
(Presidente/Orientadora)

Flávia Valladão Thiesen, Prof.^a Dr.^a (PUCRS)

Simone Gonçalves Cardoso, Prof.^a Dr.^a (UFSC)

Santa Maria, 16 de Abril de 2008.

Dedicação

***Dedico este trabalho aos meus pais Jorge Luiz e Jussara,
meus referenciais de vida e minha fortaleza.
A vocês que sempre acreditaram em mim,
que sempre me incentivaram, apoiaram e estiveram ao meu
lado em todos os momentos desta jornada.
Agradeço por todo amor, carinho, apoio, dedicação,
incentivo, esforço, sacrifício e exemplo de vida.
Palavras são pouco para agradecer e expressar
todo amor e orgulho que sinto por vocês.***

***Também dedico aos meus
irmãos Silvana e Fabrício.
Obrigada por todo amor e carinho, por sempre
estarem ao meu lado apoiando, incentivando,
ouvindo, aconselhando e auxiliando.
Obrigada por serem estes irmãos maravilhosos.
À Elenara, que já é parte indispensável desta família.***

Amo muito vocês.

Agradecimento especial

A Prof. Dr. (a) Solange Cristina Garcia, que admiro pela determinação, humildade, honestidade e dedicação a pesquisa, a profissão, aos orientados, aos alunos da iniciação, e a todos que convive. Agradeço pela oportunidade para realizar este trabalho, pela oportunidade de trabalhar com Toxicologia. A ela, meu reconhecimento, admiração e respeito. Agradeço também pelos conselhos, pelas conversas, desabaços, e principalmente pela amizade que criamos durante o período de convivência, espero que permaneça por bastante tempo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pelas oportunidades que colocou em meu caminho e principalmente por ter povoado minha vida com tantas pessoas maravilhosas.

Aos meus pais pelo amor, incentivo, apoio, amizade e exemplo.

A toda a família pelo constante apoio emocional, amizade, carinho e por ser um grupo maravilhoso, que serve de estrutura e segurança.

Aos meus grandes e queridos amigos Agnes, Andrea, Lucas Simões, Lucas Dorneles, Ingrid, Gerusa, Augusto, Daniele, Maurício, Gabriela, Babe, Carolina, Marcelo, Márcio, Luc, Daiane, Daniele B, Loli, Larissa, Carol B., e vários outros que não estão citados, pela amizade verdadeira, parceria insubstituível, pelo incentivo constante, grandes presenças nos momentos de angústia e de alegrias. Os meus consultores para qualquer assunto, das maiores filosofadas e risadas até crises existenciais.

Aos colegas do LATOX: Amiguinha (Mariele), Angel, André, Raquel, Fernanda, Natália, Gianine, Fernando, Ana, Greicy, pelo carinho, o convívio amigo, a disponibilidade, o esforço e a aprendizagem que me proporcionaram. Além de todo o suporte técnico na realização de todo o projeto, na coleta das amostras, nas entrevistas e na realização de todas as análises. A participação de todos vocês foi fundamental.

Ao pessoal que fez parte do Latox, portanto parte também de todo meu agradecimento: Juniara, Lucas, Sílvia, Silvana, Gabi, Juliana Valentini, Carmem, e outros que apenas passaram, mas que de certa forma ficaram marcados.

À Juliana Vicentini (Green Star), Clóvis e Miguel pela amizade, paciência, parceria profissional e por toda convivência e apoio nestes últimos anos.

Ao Dr. Marcos Rutsatz pelo apoio e por gentilmente ceder os indivíduos expostos da indústria em que atua como médico do trabalho, imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial ao meu amigo de tempos PG, por ter conseguido uma indústria para eu poder realizar a parte prática deste trabalho. Sempre serei grata.

À Renata Limberger pela co-orientação deste trabalho.

À Fal pela parceria em vários momentos deste mestrado, pelos conselhos, ombro amigo além das dicas pra prova psicológica, muito útil.

Ao pessoal da Random de Caxias por ter cedido às coletas.

Às professoras Flávia Valladão Thiesen, Simone Gonçalves Cardoso e Ijoni Costabeber por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Aos professores da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas que de alguma maneira contribuíram para a construção do meu conhecimento científico.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar este curso.

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

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Indicadores Biológicos de Exposição a solventes orgânicos e sua inter-relação com o estresse oxidativo

Autora: Rachel Picada Bulcão

Orientadora: Prof^a. Dr^a Solange Cristina Garcia

Co-orientadora: Renata Pereira Limberger

Data e Local de defesa: Santa Maria, 16 de abril de 2008.

O uso de solventes orgânicos no meio ocupacional representa significativo risco à saúde do trabalhador. Os pintores compõem, dentre outros, um grupo de indivíduos ocupacionalmente expostos aos solventes, através da via respiratória e dérmica. A monitorização de indicadores biológicos de exposição (IBE) pode assegurar, em longo prazo, o não aparecimento de doenças crônicas ocupacionais. Desta forma, objetivou-se otimizar e validar uma metodologia utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV), para a quantificação simultânea dos seguintes IBE: ácidos hipúrico (HA), 3-metilhipúrico (3mHA), mandélico (MA) e fenilglicoxílico (PGA) em urina, dos solventes tolueno, xileno, estireno (MA e PGA) e etilbenzeno (MA) respectivamente. Além disso, existem relatos de que solventes orgânicos, dentre muitos outros agentes, ocasionam desequilíbrio nas defesas pró- e antioxidantes do organismo, ocasionando danos à saúde dos trabalhadores devido ao estresse oxidativo. Portanto, quantificou-se alguns biomarcadores sanguíneos do estresse oxidativo, verificando-se sua possível relação com os níveis dos indicadores biológicos em pintores (n=50) de uma indústria da cidade de Caxias do Sul, RS, comparando-os com os indivíduos não expostos ocupacionalmente. Assim, os biomarcadores analisados foram: antioxidantes endógenos como a glutathiona reduzida (GSH), as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx); antioxidantes exógenos como as vitaminas C e E; e os biomarcadores de oxidação, no caso da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA), e da oxidação de proteínas, as proteínas carboniladas (PCO).

Os parâmetros analíticos de validação foram linearidade, precisão, exatidão, recuperação e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Para todos os IBE analisados, os coeficientes de regressão linear $> 0,99$; CV% $< 6\%$; bias% $< \pm 10$; recuperação $> 95\%$, LD entre 0,001 a 0,009 g.L⁻¹ e LQ de 0,04 a 0,02 g.L⁻¹. Na aplicação do método validado, das amostras de indivíduos expostos (n=50), todos apresentaram concentração urinária de HA; 2,5% destes, acima dos valores de referência (VR) e apenas 8% destes, apresentaram valores acima do índice biológico máximo permitido (IBMP). Foram encontrados mHA em 96%, PGA em 30%, e MA em 26% das amostras analisadas, sendo estes valores, todos abaixo do IBMP. Dentre os indivíduos não expostos (n=30), somente HA foi encontrado, os valores foram de 0,058 – 0,23 g/g de creatinina urinária.

Quanto aos biomarcadores do estresse oxidativo, os níveis de MDA plasmático e de PCO sérica foram significativamente aumentados comparados aos controles ($p < 0,01$). Os níveis de GSH eritrocitária ($p < 0,05$); SOD, CAT e GPx ($p < 0,001$) sanguíneas também foram significativamente aumentados, demonstrando um aumento no sistema antioxidante em resposta aos efeitos deletérios da exposição às tintas. Os níveis de antioxidantes exógenos, vitamina C e vitamina E estavam significativamente diminuídos nestes indivíduos ($p < 0,05$) quando comparados aos controles. Além disso, foi observada correlação entre os biomarcadores do estresse oxidativo e os IBE. O ácido mandélico urinário, indicador de exposição ao estireno e ao etilbenzeno, apresentou correlação positiva com as enzimas

SOD e CAT, e com o MDA ($p < 0,01$), e uma correlação negativa com a vitamina E ($p < 0,05$). O ácido hipúrico urinário apresentou correlação positiva com os níveis sanguíneos de GPx ($p < 0,001$). Além disso, foi encontrada correlação positiva entre MDA e PCO ($p < 0,001$); e correlação negativa das PCO com GPx, com vitamina C e E ($p < 0,05$).

Os resultados da validação metodológica demonstraram linearidade, precisão e exatidão, permitindo concluir que o método é confiável para quantificar os indicadores biológicos de exposição, HA, mHA, MA e PGA, simultaneamente. Além disso, os níveis dos IBE mostraram-se quase que na sua totalidade, dentro dos índices biológicos máximos permitidos. Os biomarcadores do estresse oxidativo relacionados com a peroxidação lipídica e com a oxidação de proteínas apresentaram-se significativamente aumentados mesmo com um aumento dos antioxidantes endógenos analisados, GSH, SOD, CAT e GPx. Por outro lado, observou-se uma depleção dos antioxidantes vitamínicos exógenos, como as vitaminas C e E. Assim, com este trabalho é possível sugerir que os IBMP, para os IBE dos solventes orgânicos tolueno, xileno, estireno e etilbenzeno analisados, não asseguram o equilíbrio antioxidante/oxidante nos trabalhadores expostos.

Palavras-chave: exposição ocupacional, estresse oxidativo, biomarcadores, solventes orgânicos, IBE.

ABSTRACT

Master Dissertation

Post Graduate Course on Pharmaceutical Sciences

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

Biological Exposure Indices of organic solvents and its relationship with the oxidative stress

Author: Rachel Picada Bulcão

Adviser: Prof^a. Dr^a Solange Cristina Garcia

Co-adviser: Renata Pereira Limberger

Date and Place of the defense: Santa Maria, april 16, 2008.

The use of organic solvents in the work environment represents a significant risk to workers' health. The painters composed, among others, a group of individuals who are in direct contact with solvents through the respiratory and dermal route. The biological monitoring, through biological exposure index (BEI) determination, can ensure the emergence of chronic occupational diseases, even in a long-term exposure. Thus, it was aimed to optimize and validate a methodology using high performance liquid chromatography with ultraviolet detector (HPLC-UV), for the simultaneous quantification of the following BEI: hippuric acid (HA), 3-methylhippuric acid (3mHA), mandelic acid (MA) and phenylglyoxylic acid (PGA) in urine to the solvents toluene, xylene, styrene (MA and PGA) and ethylbenzene (MA) respectively. In addition, there are reports that organic solvents, among other agents, cause imbalance in pro - and antioxidant defenses of the body, causing damage to the health of workers due to the oxidative stress.

So, we quantified some blood biomarkers of oxidative stress, and its possible relationship to the levels of BEI in painters (n = 50) of an industry in Caxias do Sul, Brazil, and compared with non-exposed subjects. Thus, the biomarkers analyzed were: endogenous antioxidants such as reduced glutathione (GSH), the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx); exogenous antioxidants such as vitamins C and E; in addition we determined two biomarkers of oxidation, in lipid peroxidation, we evaluate the levels of malondialdehyde (MDA) and in oxidation of proteins, we analysed protein carbonyl (PCO).

The analytical parameters evaluated were linearity, accuracy, recovery and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). For all the analysed BEI, the linear regression coefficient > 0.99; CV% < 6 %; bias% < ± 10; recovery > 95%; LOD between 0.001 to 0.009 g.L⁻¹ and LOQ between 0.04 to 0.02 g.L⁻¹. In the application of the method, in exposed group (n=50), everyone had urinary concentration of HA; 2.5% of those were above the reference values (RV) and only 8% of these, had values above the biological exposure limit (BEL). Methylhippuric acid was found in 96%, PGA in 30%, and MA in 26% of the samples analyzed, those values, were all below the BEL. Among non-exposed ones, only urinary HA has been found, the values were 0.058 to 0.23 g / g creatinine.

In relation to the oxidative stress biomarkers, the levels of plasma MDA and serum PCO were significantly increased compared to controls (p <0.01). The levels of erythrocyte GSH (p<0.05); blood SOD, CAT and GPx (p<0.001) were also significantly increased, showing an increase in antioxidant system in response to the deleterious effects of exposure to paints. The levels of exogenous antioxidants, such as vitamin C and vitamin E were significantly reduced in these subjects (p<0.05) compared to control. Moreover, it was observed a correlation between the biomarkers of oxidative stress and some BEI. The urinary mandelic acid, biological exposure index for styrene and ethylbenzene, showed a positive correlation with the enzymes SOD and CAT, and the MDA (p<0.01) and a negative correlation with vitamin E (p<0.05). The hippuric acid found in urine samples showed a positive correlation with the blood levels of GPx (p<0.001). Furthermore, a positive

correlation was found between MDA and PCO ($p < 0.001$), and negative correlation between PCO with GPx, with vitamin C and with E ($p < 0.05$).

The results of the validation methodology showed linearity, precision and accuracy, allowing conclude that the method is reliable to quantify the biological exposure indices, HA, mHA, MA and PGA, simultaneously. Furthermore, the levels of these BEI showed to be within the biological exposure limits. The biomarkers of oxidative stress related to lipid peroxidation and the oxidation of proteins were significantly increased even with an increase in endogenous antioxidants analyzed, GSH, SOD, CAT and GPx. Moreover, there was a depletion of exogenous antioxidants, such as vitamins C and E. So with this work we can suggest that the biological exposure limit for the metabolites of toluene, xylene, styrene and ethylbenzene analyzed, failed to ensure the balance in antioxidant/oxidant status to exposed workers.

Keywords: occupational exposure, oxidative stress, biomarkers, organic solvent, BEI.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química do tolueno.....	27
FIGURA 2 – Esquema da biotransformação do tolueno	29
FIGURA 3 – Estrutura química do estireno.....	31
FIGURA 4 – Esquema da biotransformação do estireno	32
FIGURA 5 – Estrutura química do xileno	34
FIGURA 6 – Esquema da biotransformação do xileno.....	35
FIGURA 7 – Estrutura química do etilbenzeno	37
FIGURA 8 – Esquema da biotransformação do etilbenzeno.....	37
FIGURA 9 – Possíveis efeitos da carbonilação de proteínas (adaptado de Dalle- Donne <i>et al.</i> , 2006).....	46
FIGURA 10 – Sistema antioxidante enzimático	48
FIGURA 11 – Mecanismo de ação do sistema glutaciona (adaptado de Sies <i>et al.</i> , 1972).....	49

ARTIGO I

FIGURA 1 – Estrutura química dos quatro metabólitos que são referentes aos solventes orgânicos: estireno (MA e PGA), etilbenzeno (MA), tolueno (HA) e xileno (3mHA).....	75
---	-----------

FIGURA 2 – Perfil cromatográfico típico da adição de padrões, em amostra urinária, nas concentrações de 0,03 g.L ⁻¹ , sendo (1) PGA; (2) MA; (3) HA e (4) 3mHA. Os tempos de retenção foram: 5,80 min (PGA); 7,53 min (MA); 11,82 min (HA) e 20,4 min (3mHA)	76
---	-----------

FIGURA 3 – Cromatograma típico obtido da amostra urinária. (A) Indivíduo ocupacionalmente exposto a tintas automotivas (trabalhadores com tempo de exposição superior a 5 anos). (B) Indivíduo não ocupacionalmente exposto (controle). Os tempos de retenção foram: 5,03 min (PGA), 11,80 min (HA) e 20,45 min (3mHA)	77
---	-----------

MANUSCRITO I

FIGURA 1 – Chromatographic quantification of Biological Exposure Index obtained from nonexposed (A) and exposed (B) subjects.....**96**

FIGURA 2 – The erythrocytes GSH (mmol/gHb) and plasma MDA (μ M) levels from control (nonexposed) and exposed subjects**97**

MANUSCRITO II

FIGURA 1 – Pearson´s correlation between malondialdehyde (MDA) vs protein carbonyl levels in exposed workers (n=40)**120**

FIGURA 2 – Correlation between hippuric acid (HA) and glutathione peroxidase (GPx) activity in all subjects (n=60)**121**

FIGURA 3 – Correlation between mandelic acid (MA) and vitamin E levels in exposed workers (n=40).....**122**

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

TABELA 1 – Parâmetros da NR-7* relativos à exposição ocupacional ao tolueno, xileno, estireno e etilbenzeno. Os valores de referência e IBMP estão expressos por g/g de creatinina e o material biológico utilizado foi urina coletada após o final da jornada78

TABELA 2 – Equações das retas obtidas para cada metabólito, referente às curvas aquosas (n=5) e com adição de padrão na urina (n=5), e os respectivos coeficientes de regressão (r^2).....78

TABELA 3 – LD e LQ de cada IBE79

TABELA 4 – Níveis de concentração (g.L^{-1}), e seus respectivos valores de recuperação, % *bias* e coeficiente de variação (CV%), (n= 5)79

MANUSCRITO I

TABELA 1 – Biological monitoring values in urine, results are expressed as mean \pm SEM. Results are expressed in g/g creatinine.....94

TABELA 2 – Oxidative stress parameters obtained from control (nonexposed) and exposed subjects, results are expressed as mean \pm SEM94

TABELA 3 – Results of correlation test between urine malic acid (MA) levels with plasma MDA levels and with erythrocytes SOD and CAT activities (n= 13).....95

MANUSCRITO II

TABELA 1 – Biological monitoring values of metabolites of organic solvents in urine (g/g creatinine)117

TABELA 2 – Antioxidants and markers of oxidative damage.....118

TABELA 3 – Pearson's correlation between antioxidants and markers of oxidative damage in exposed workers (n=40)119

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Comprovante do aceite do artigo “Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência” à Revista <i>Química Nova</i>	145
ANEXO B – Comprovante da submissão do manuscrito “The effects of paint solvents exposure on blood biomarkers of oxidative stress in workers ” à Revista <i>International Archives of Occupational and Environmental Health</i>	146
ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS

3mHA – Ácido 3-metilhipúrico
ACGIH - American Conference of Governmental Industrial Hygienists
CAT – Catalase
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG – Cromatografia Gasosa
DNA – ácido desoxirribonucléico
ERNS – Espécies reativas do nitrogênio
EROs – Espécies reativas de oxigênio
IBE – Indicador Biológico de Exposição
IBMP – Índice Biológico Máximo Permitido
G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx – Glutaciona peroxidase
GSH – Glutaciona reduzida
GR – Glutaciona redutase
GSSG – Glutaciona dissulfeto
GST – Glutaciona S-transferase
HA – Ácido hipúrico
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HOCl⁻ - Ácido hipocloroso
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
MA – Ácido mandélico
MDA – Malondialdeído
MPO – Mieloperoxidase
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NO – Óxido nítrico
NR-7 – Norma Regulamentadora nº7
ONOO⁻ – Peróxido nitrito
ONOOH – Peróxido nitroso
PCMSO – Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional
PCO – Proteínas carboniladas
PGA – Ácido fenilglioxílico
SH – Grupos sulfidrílicos
SOD – Superóxido dismutase

RBC – Red Blood Cells

RLs – Radicais Livres

ROS – Reactive Oxygen Species

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

UDPGA – ácido urodindifosfatoglicurônico

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
-------------	----

ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ANEXOS	16
LISTA DE ABREVIATURAS.....	17
APRESENTAÇÃO	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 Exposição Ocupacional.....	24
2.2 Solventes Orgânicos.....	24
2.2.1. Tolueno	27
2.2.1.1 Generalidades	27
2.2.1.2 Toxicocinética	28
2.2.1.3 Efeitos Toxicológicos	30
2.2.2. Estireno	30
2.2.2.1 Generalidades	30
2.2.2.2 Toxicocinética	31
2.2.2.3 Efeitos Toxicológicos.....	33
2.2.3. Xileno	33
2.2.3.1 Generalidades	33
2.2.3.2 Toxicocinética	34
2.2.3.3 Efeitos Toxicológicos	36
2.2.4. Etilbenzeno	36
2.2.4.1 Generalidades	36
2.2.4.2 Toxicocinética	37
2.2.4.3 Efeitos Toxicológicos.....	38
2.3 Monitorização Biológica	38
2.3.1 Parâmetros de validação metodológica	39
2.3.1.1 Limite de detecção e Limite de quantificação	39
2.3.1.2 Linearidade	40
2.3.1.3 Precisão Intermediária.....	40

2.3.1.4 Exatidão	41
2.3.1.5 Recuperação	41
2.4 Estresse Oxidativo	41
2.4.1 Radicais livres e espécies reativas	41
2.4.2 Peroxidação lipídica	43
2.4.3 Oxidação de proteínas	44
2.4.3.1 Carbonilação de proteínas.....	45
2.4.4 Antioxidantes.....	46
2.4.4.1 Sistema enzimático.....	47
2.4.4.2 Sistema não-enzimático	49
2.5 Inter-relação da exposição ocupacional a solventes e o estresse oxidativo	50
3. RESULTADOS.....	53
3.1 Artigo I.....	54
3.2 Manuscrito I	80
3.3 Manuscrito II	98
4. DISCUSSÃO	123
5. CONCLUSÕES	131
6. REFERÊNCIAS.....	132
7. ANEXOS	145

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo científico e dois manuscritos, os quais se encontram no item RESULTADOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e nos manuscritos e representam na íntegra este estudo.

Os artigos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos:

Artigo I – Química Nova;

Manuscrito I – International Archives of Occupational and Environmental Health;

Manuscrito II – Clinical Biochemistry.

Os manuscritos acima citados encontram-se em fase de avaliação nas respectivas revistas.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após os manuscritos, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados ao artigo e aos manuscritos deste trabalho.

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

1 INTRODUÇÃO

A toxicologia ocupacional estuda a exposição laboral a produtos químicos e seus biomarcadores biológicos, com o objetivo principal de prevenir prejuízos, em longo prazo, à saúde dos trabalhadores expostos a estes agentes (Lauwerys *et al.*, 1996). Além disso, procura-se entender as relações causais entre exposição e efeito para que se possa, desta forma, atuar nas etapas iniciais do processo, quando as alterações fisiológicas ainda são reversíveis.

Atualmente, a maioria das pessoas tem sido exposta a algum tipo de solvente no trabalho ou em casa. Embora na última década os níveis de exposição tenham diminuído muito nos países industrializados, o número de trabalhadores expostos regularmente a solventes orgânicos é ainda grande. Presume-se que várias dezenas de milhões de trabalhadores são expostos a solventes por todo o mundo (Johnson & Nylén, 1995).

Solvente orgânico é a designação genérica dada a um grupo de substâncias químicas orgânicas que apresentam maior ou menor grau de volatilidade e lipossolubilidade, e são empregados em diferentes processos ocupacionais. O uso de solventes orgânicos no meio ocupacional representa significativo risco à saúde do trabalhador, posto ser o espectro de utilização destes compostos bastante amplo, em diferentes processos industriais, em pequenas, médias e grandes empresas, meio rural, laboratório químico entre outros (Oga, 2003).

A monitorização biológica complementa o monitoramento ambiental e a vigilância à saúde, considerando-se que determina a exposição global diretamente no indivíduo e detecta efeitos precoces e reversíveis, proporcionando uma melhor estimativa de risco (Della Rosa *et al.*, 2003).

Os indicadores biológicos de exposição (IBE) e os índices biológicos máximos permitidos (IBMP) são determinados por meio de estudos epidemiológicos, experimentais e casos clínicos para assegurar a saúde do trabalhador. No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7) de 29 de dezembro de 1994 da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho, estabelece os parâmetros biológicos para controle da exposição a agentes químicos. Conforme esta Portaria, todos os empregados e instituições que admitam trabalhadores como empregados são obrigados a elaborar e implementar o Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO). O referido programa tem por objetivo promover e preservar a saúde dos trabalhadores (Brasil, 1994).

Os pintores compõem um grupo de indivíduos expostos a estes solventes através da via respiratória e dérmica. A qualidade do ar no interior desses locais também representa um risco à saúde humana, principalmente, se medidas de proteção individual e/ou coletiva não forem devidamente aplicadas de acordo com a necessidade imposta pelo serviço a ser executado (Costa, 2002). Exposições crônicas a estes solventes podem resultar em danos permanentes ou muitas vezes fatais (Klaassen *et al.*, 2001).

Compostos orgânicos voláteis como o tolueno, xilenos, etilbenzeno, n-butanol e metilisobutilcetona são comumente encontrados no ar durante o processo de pintura, provenientes da emissão de solventes orgânicos da tinta fresca ou utilizados para dissolver ou dispersar tintas, resinas e produtos de polimentos. Estas substâncias químicas atuam predominantemente sobre o sistema nervoso central como depressoras, que dependendo da concentração e do tempo de exposição, podem causar desde sonolência, tontura, fadiga até narcose e morte (Philips *et al.*, 1999).

Os solventes orgânicos têm sido associados ao estresse oxidativo, decorrente do desequilíbrio entre os oxidantes/pró-oxidantes e os antioxidantes do organismo, podendo estar relacionado a inúmeras doenças (Oga, 2003). Estudos *in vivo* e *in vitro* revelaram que alguns solventes orgânicos são responsáveis pelo desequilíbrio nas defesas pró- e antioxidantes do organismo (Gromadzinska & Wasowicz, 2003), como por exemplo, alterações na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), e diminuição nos níveis de glutathione reduzida (Ulakoglu *et al.*, 1998), ocasionando danos à saúde dos trabalhadores (Costa *et al.*, 2005). Portanto, estudos abordando a exposição ocupacional a solventes orgânicos e o estresse oxidativo, são importantes para auxiliar no entendimento do mecanismo envolvido na toxicidade destes xenobióticos e, prevenir possivelmente os danos à saúde dos trabalhadores.

Diante disso, verificar a possível relação entre os metabólitos dos solventes orgânicos e os biomarcadores do estresse oxidativo torna-se importante, já que dados sobre esta inter-relação, especificamente em humanos, são escassos na literatura científica. Além disso, o grau de exposição e o efeito sobre a saúde pode assegurar, em longo prazo, o não aparecimento de problemas de saúde crônicos devido a estas exposições.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Exposição Ocupacional

A exposição é o período em que o ser humano está sujeito aos diversos componentes ambientais através das diversas vias possíveis de absorção da substância tóxica pelo organismo: respiratória, cutânea e digestiva (Câmara & Galvão, 1995). No caso dos solventes orgânicos as vias são respiratória e cutânea, sendo a primeira predominante no ambiente laboral. O fato de uma pessoa estar exposta a uma substância química não significa que necessariamente será intoxicada. Devem ser considerados fatores inerentes ao indivíduo, como sexo, idade, raça, genética, estado nutricional, psíquico e doenças prévias, que podem interferir no aparecimento, duração e gravidade dos efeitos adversos ocasionados por agentes presentes no ambiente de trabalho (Bertoncello, 1999). Além disso, o grau de exposição também é um fator importante.

A forma de manuseio da substância, as condições de trabalho e ambientais são determinantes na exposição ocupacional (Amorim, 2003). Apenas recentemente tem sido dada maior atenção ao local de trabalho e à interação que ocorre entre os fatores físicos, químicos, biológicos e organizacionais (Cheminfo, 1997).

2.2. Solventes Orgânicos

Os solventes orgânicos em geral, do ponto de vista toxicológico, são substâncias orgânicas, lipossolúveis, que atravessam a barreira hematoencefálica com facilidade produzindo uma alteração no estado de consciência similar aos níveis mais leves de anestesia (Forster *et al.*, 1994).

São obtidos do refino do petróleo cru (constituído por hidrocarbonetos, enxofre, oxigênio, compostos nitrogenados e traços de metais) e são de grande uso industrial, comercial e doméstico (Ali, 1995). São produtos químicos líquidos à base de carbono, compostos de diversas estruturas químicas, utilizados para dissolver outras substâncias orgânicas (McDiarmid & Agnew, 1995).

De um modo geral, são substâncias orgânicas de baixa toxicidade para o ser humano. Algumas exceções merecem ser citadas, dentre elas o benzeno, dissulfeto

de carbono, tricloroetileno, os quais devem ser manipulados somente dentro de normas rígidas de segurança (Ali, 1995).

Dentre os solventes orgânicos, destacam-se tolueno, os xilenos, estireno e etilbenzeno como agentes químicos potencialmente importantes como risco ocupacional de exposição e toxicidade (Astier, 1992; Laffon *et al.*, 2001; Gromadzinska & Wasowicz, 2003).

Cerca de 50% dos solventes são utilizados na fabricação de vernizes, tintas, colas, cosméticos; 20% para fabricação de sapatos; 10% para indústrias de agrotóxicos e 10% são usados na limpeza de metais, lavagem a seco, indústria têxtil e farmacêutica. Muitos produtos classificados e usados com solventes são também matéria-prima da indústria química (fabricação de plástico) e combustível (Buschinelli, 2000).

Por serem voláteis, sua principal via de absorção é a respiratória. A capacidade de penetração no fluxo sanguíneo dos vapores dos solventes e sua velocidade de transporte pelas membranas dependem da sua solubilidade lipídica, uma vez que as lipoproteínas das membranas celulares têm que ser atravessadas (Klaassen *et al.*, 2001).

Volatilidade e lipofilicidade são as duas principais propriedades dos solventes que determinam sua absorção e deposição no corpo. A volatilidade varia de composto para composto. Considera-se que um trabalhador utilizando um solvente altamente volátil irá inalar quatro vezes mais vapor do que um solvente menos volátil. A pressão do vapor de um solvente é um importante indicador de risco à saúde do trabalhador e está diretamente relacionada à concentração do ar transportado (Aylott & Prasher, 2002).

Uma segunda via de exposição é a pele. O contato freqüente com solventes lipossolúveis pode levar a irritações dérmicas, entre outras injúrias. A American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH, 2003) ressalta que existem evidências de que a irritação da pele pode iniciar, favorecer ou acelerar os danos físicos pela interação com outros agentes químicos ou biológicos. Uma condição dermatológica pode afetar significativamente o potencial de absorção cutânea (Klaassen *et al.*, 2001).

Indivíduos que trabalham expostos a um solvente orgânico são, freqüentemente, expostos de maneira simultânea ou seqüencial, aos vapores de outro solvente orgânico. Esta exposição mista pode resultar em inibição ou indução

de etapas da biotransformação dos mesmos. As inibições resultantes de exposições mistas a solventes são mais freqüentes quando os compostos são biotransformados por um mesmo sistema enzimático. Como as enzimas em geral e as oxidases de função mista em particular possuem pequena especificidade, não é surpreendente que um solvente possa competir com outro pela biotransformação e, até mesmo, de ocorrer saturação enzimática (Oga, 2003).

Os danos causados tanto pelo solvente como por seu(s) metabólito(s) tóxico(s) podem desencadear no trabalhador uma doença clinicamente reconhecível. Este fenômeno é conhecido como bioativação e é mediado em grande parte pela família de enzimas denominadas genericamente de Citocromo P- 450. Durante o curso do metabolismo, químicos relativamente inativos são freqüentemente convertidos em metabólitos altamente reativos que podem ser desativados pela glutathione, ácido ascórbico ou por outros antioxidantes celulares. Se não forem inativados, podem reagir e ligarem-se covalentemente a macromoléculas celulares, tais com as proteínas, lipídios, RNA ou DNA. O resultado pode ser a inativação de receptores e de proteínas específicas, danos nas membranas celulares ou o início de reações mutagênicas como resultado da união com o DNA (Klaassen *et al.*, 2001).

Os principais determinantes da toxicidade dos solventes são: número de átomos de carbono; números de ligações químicas entre átomos de carbono; estrutura molecular (Azevedo, 2004).

Os solventes orgânicos, na sua maioria, são compostos por uma mistura de solventes (Azevedo, 2004). Há similaridade nos efeitos agudos de diversos solventes orgânicos. Desorientação, euforia e confusão, progredindo para inconsciência, convulsão e morte por parada respiratória ou cardíaca. A rapidez de desenvolvimento destes sintomas assegura que os efeitos narcóticos dos solventes devem-se ao solvente em si, e não aos metabólitos. Na maioria dos indivíduos, a recuperação dos efeitos no sistema nervoso central é rápida e completa após a remoção do local de exposição (Klaassen *et al.*, 2001; Oga, 2003). E, a neurotoxicidade, pode se manifestar através de vários sinais e sintomas, entre eles alteração na coordenação e disfunção motora. A tontura é um sintoma precoce envolvendo exposição a solventes (Aylott & Prasher, 2002).

2.2.1. Tolueno

2.2.1.1 Generalidades

As principais fontes de exposição ocupacional ao tolueno decorrem do seu uso como solvente para óleos, borracha natural e sintética, resinas, carvão, piche, betume e acetilcelulose. É utilizado, também, como diluente para tintas e verniz na indústria química e como matéria-prima para a síntese orgânica do cloreto de benzoato, sacarina, cloramina T, trinitrotolueno, tolueno diisocianato, entre outros (Moraes, 2003). É também empregado na indústria gráfica (Larini, 1998).

Este solvente é um líquido incolor, com ponto de ebulição de 110,6°C, muito pouco solúvel na água (6,5 mmol/litro a 20°C), solúvel em acetona e miscível com etanol, éter etílico, benzeno, entre outros (Larini, 1998), sua estrutura química está apresentada na Figura 1.

É um químico intermediário importante, produzido em enormes quantidades, principalmente nos EUA, Europa e Japão. Apesar da exposição ocupacional ao tolueno ser bastante difundida, a exposição exclusiva ao tolueno é rara. Este representa o problema mais grave no estudo de patologias relacionadas ao tolueno, pois está geralmente associado, em suas preparações comerciais, a outras substâncias. Uma exceção seria em rotogravuras, exposição em que o tolueno é utilizado praticamente puro, o que aumenta a concentração neste tipo de exposição. Por esta razão, estes trabalhadores têm sido escolhidos para participar dos estudos relacionados à exposição crônica ao tolueno (Morata *et al.*, 1995).

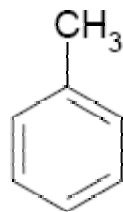


Figura 1: Estrutura química do tolueno

2.2.1.2 Toxicocinética

O tolueno é facilmente absorvido através dos pulmões. A sua absorção pulmonar, quando sob a forma de vapor, é estimada como sendo de 40 a 60% da concentração total inalada (Michel, 2000). A retenção do tolueno nos pulmões é

dependente da ventilação pulmonar, do gradiente de concentração na mucosa alveolar, do coeficiente de distribuição sangüíneo e, em pequena extensão, da circulação sanguínea alveolar (Oga, 2003). A absorção pelo trato gastrointestinal é mais lenta que a absorção pulmonar e a concentração sangüínea do agente tóxico atinge um valor máximo 2 horas após a absorção oral.

A solubilidade do tolueno no sangue é indicada através de seu coeficiente de distribuição sangue/ar como sendo de 11,2 a 15,6 a 37°C. Este coeficiente de distribuição é independente dos valores de hematócrito e do conteúdo de hemoglobina (Larini, 1998).

O ácido benzóico é o mais importante produto da biotransformação do tolueno, sendo calculado que 75 a 80% do composto absorvido é biotransformado neste produto (Figura 2). É formado através de oxidações microssomais no grupamento metil, com formação dos intermediários alcoólico e aldeídico correspondentes. Em ratos, a oxidação do tolueno a ácido benzóico, realizada via citocromo P-450, é de 0,6 mmol.hora⁻¹/Kg de fígado. O ácido benzóico é conjugado com a glicina (cerca de 80%) formando o ácido hipúrico e em menor escala com o ácido urodindifosfatoglicurônico, UDPGA (cerca de 20%) formando o glicuronídeo correspondente. A quantificação do ácido hipúrico urinário constitui um método para verificação dos níveis de exposição ao tolueno (Angerer & Kramer, 1997; Michel, 2000; Broussard, 2000). No organismo humano, o tolueno é também oxidado no anel aromático sendo transformado em p-cresol (1%) o-cresol (0,1%) e m-cresol em menor proporção, sendo esta oxidação realizada com a formação de epóxidos intermediários (Al-Ghamdi *et al.*, 2003). Estes produtos sofrem posteriormente reações de conjugação com formação de produtos altamente hidrossolúveis que são excretados na urina. Ainda, não mais de 2% do tolueno absorvido é excretado inalterado ou biotransformado através da bile, sofrendo uma reabsorção e somente uma proporção muito pequena é excretada nas fezes (Larini, 1998; Oga, 2003).

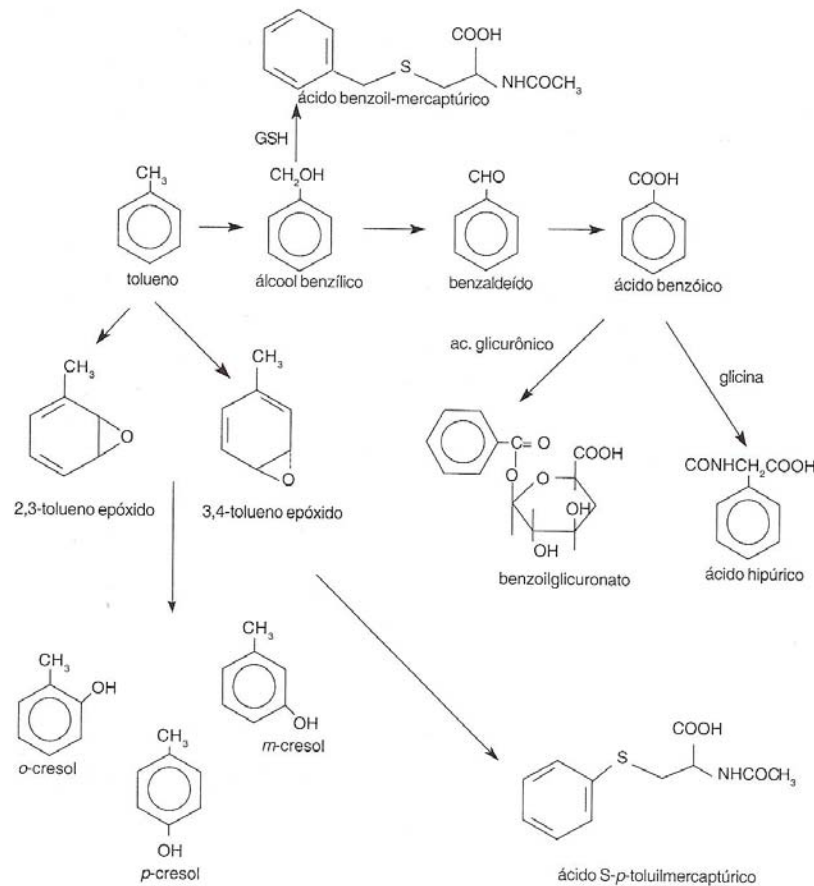


Figura 2: Esquema da biotransformação do tolueno (adaptado de Oga, 2003).

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). 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).

Os níveis urinários de ácido hipúrico representam o indicador proposto para a monitorização biológica da exposição ocupacional ao tolueno (Brasil, 1994). No entanto, o ácido hipúrico possui valor de referência (VR), de até 1,5 g/g de creatinina, é encontrado em indivíduos não expostos ao tolueno (Brasil, 1994). A excreção do ácido hipúrico na urina poder sofrer influência da dieta, devido a 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).

O IBMP para o ácido hipúrico urinário é de 2,5 g/g creatinina (Brasil, 1994; Michel, 2000; Oga, 2003).

2.2.1.3 Efeitos Toxicológicos

O principal efeito dá-se no sistema nervoso central, tanto em animais como no homem, levando a uma ação predominantemente depressora, sendo bem conhecida sua neurotoxicidade (Santos Júnior *et al.*, 2003). Por este motivo, representa risco à saúde dos trabalhadores expostos. Na inalação de seus vapores observa-se um estado de euforia, confusão mental, incoordenação muscular, cefaléia, vertigens, midríase, náuseas e vômitos. Após esta fase inicial o intoxicado apresenta durante vários dias uma irritabilidade acentuada, cefaléia, náuseas e astenia. Quando da ingestão observa-se um intenso quadro gastrintestinal com dores abdominais, náuseas, vômitos e diarreia, que pode estar associado às manifestações neurológicas (Broussard, 2000; Thiesen, 2005). Em exposições crônicas induz a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (Amorim & Alvarez Leite, 1999; Klaassen *et al.*, 2001).

A toxicodinâmica do tolueno é ainda desconhecido. Identicamente a outros solventes orgânicos, apresenta uma ação predominantemente depressora do sistema nervoso central, como foi citado anteriormente (Klaassen *et al.*, 2001).

A concentração de 100 ppm numa exposição de curta duração (4 horas) pode provocar mudanças neurocomportamentais, já que o limite de tolerância preconizado para o tolueno é de 78 ppm ou 290 mg/m³. Estudos em animais, expostos durante três dias a concentrações de 500, 1500 ou 3000 ppm de tolueno, demonstraram um aumento da concentração hepática do citocromo P450 (Larini, 1998).

2.2.2. Estireno

2.2.2.1 Generalidades

O estireno, também denominado feniletileno, é um composto de grande poder reativo, que se polimeriza e se oxida facilmente. Os principais usos ocupacionais

ocorrem durante a produção de polímeros plásticos (poliestireno), resinas (acrilonitrila-estireno), borracha sintética, na fabricação de produtos de fibra de vidro e sínteses orgânicas (ATSDR, 1993; Oga, 2003).

É um líquido incolor, oleoso, pouco volátil (PE= 146°C), muito pouco solúvel na água (0,03g/100ml) e solúvel em metanol, etanol acetona, éter etílico, etc. Os trabalhadores industriais e a população em geral podem estar expostos ao estireno durante o seu processamento ou através dos alimentos embalados em recipientes de poliestireno (Larini, 1998). Sua estrutura está apresentada na Figura 3. O poliestireno é um polímero obtido pelo aquecimento do estireno a 200°C.

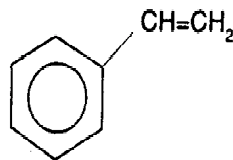


Figura 3: Estrutura química do estireno.

2.2.2.2 Toxicocinética

As vias de exposições ocupacionais pelo estireno ocorrem pela via respiratória e pela absorção através da pele. A concentração sanguínea do estireno decresce rapidamente após o período da exposição, concentrando-se especialmente no fígado e rins, pulmões, cérebro e baço. A oxidação metabólica do estireno ocorre através do citocromo P450, ocorrendo a formação do metabólito etilbenzeno 1,2-epóxido (Figura 4) que, ligando-se covalentemente a macromoléculas celulares, pode produzir mutações somáticas ou degeneração do sistema nervoso central (Lof *et al.*, 1986; ATSDR, 1993; Linhart *et al.*, 1997). Este epóxido é detoxificado pela ação da epóxido hidratase e da glutathione S-transferase (Klaassen *et al.*, 2001; Daré *et al.*, 2004).

O esquema da biotransformação do estireno está demonstrado na Figura 4. Estes metabólitos citados são reconhecidos pela legislação como os indicadores biológicos de exposição (Brasil, 1994; Heinrich-Ramm *et al.*, 2000). Seu metabolismo é inibido por outros solventes como tolueno e benzeno. Assim, os metabólitos urinários do estireno podem estar reduzidos quando indivíduos

estiverem expostos a estes solventes orgânicos concomitantemente (ATSDR, 1992; Gromadzinska & Wasowicz, 2003).

No homem em média 2,5% do estireno absorvido é excretado no ar expirado, cerca de 85% é excretado como ácido mandélico e 10% como ácido fenilgloxílico na urina (Larini, 1998).

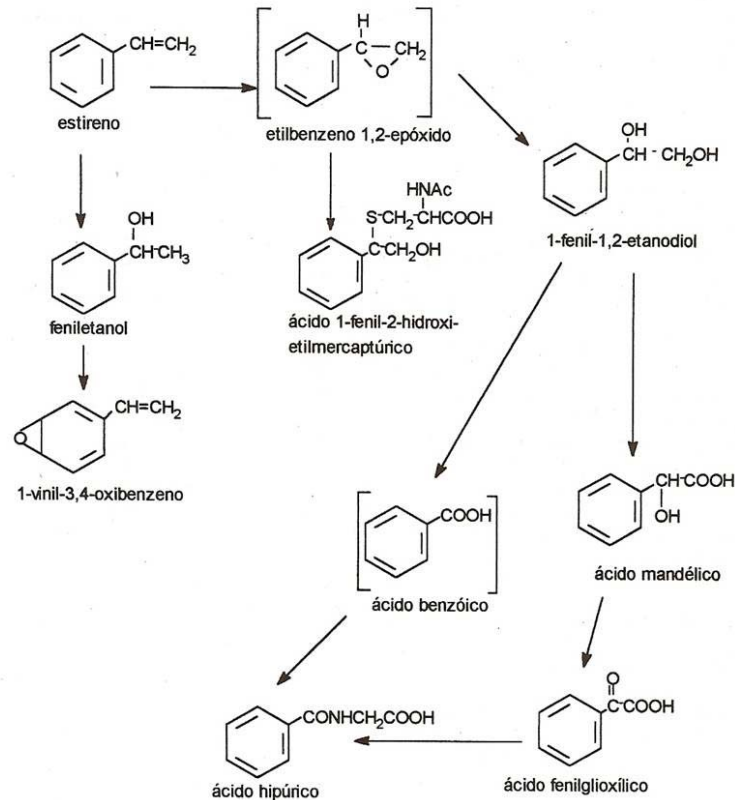


Figura 4: Esquema da biotransformação do estireno (adaptado de Oga, 2003).

A avaliação da exposição ao estireno pode ser estimada pela quantificação da excreção urinária do ácido mandélico e/ou do ácido fenilgloxílico que apresentam uma concentração máxima aceitável de 0,80 e 0,24 grama por grama de creatinina, respectivamente. Alguns autores recomendam que a excreção de ácido mandélico seja avaliada na urina coletada ao final da jornada semanal de trabalho, já para o ácido fenilgloxílico a amostra pode ser coletada ao final da jornada diária de trabalho (Oga, 2003).

A avaliação da exposição ao estireno também pode ser realizada pela quantificação de um metabólito formado por outra via, o estireno-7,8-óxido no sangue, coletado ao final da jornada diária de trabalho. Em indivíduos expostos

existe uma correlação linear entre os níveis de estireno no ambiente de trabalho (10 a 70 ppm) ou no sangue (100 a 700 mg/l) com a concentração de estireno-7,8-óxido no sangue (1 a 4 µg/l). O seu limite de tolerância é de 100 ppm (Larini, 1998).

2.2.2.3 Efeitos Toxicológicos

As propriedades narcóticas e neurotóxicas do estireno representam os principais efeitos em seres humanos. Esses efeitos têm sido observados em casos de curtas exposições a altas concentrações e/ou longas exposições a baixas concentrações. O processo neuropatológico induzido pelo estireno é desconhecido (Marczynski *et al.*, 2000; Morata & Campo, 2002).

Possui ação irritante de pele e mucosa, apresenta neurotoxicidade central e periférica, além de ser hepatotóxico e carcinogênico. Alguns estudos mostram efeito tóxico ocular, onde se observa deficiência na capacidade de discriminação de cores (ATSDR, 1993).

Exposições ocupacionais ao estireno na concentração de 200 ppm podem provocar náuseas, vômitos, anorexia, astenia e depressão do sistema nervoso central. É descrito também o aparecimento de uma leucopenia rapidamente reversível (Larini, 1998).

Existem debates a respeito da carcinogenicidade do estireno, recentemente foram reportados resultados negativos em ratos CD, após 104 semanas de inalação deste solvente (Cruzan *et al.*, 1998).

2.2.3. Xileno

2.2.3.1 Generalidades

Os xilenos (orto, meta e para-xileno) são hidrocarbonetos aromáticos utilizados como tiner para tintas, solventes em indústrias de couro e borracha, agentes de limpeza e como matéria prima na indústria química, plástica, de fibras sintéticas, entre outras (Moraes, 2003). O xileno é um solvente bastante comum na formulação de inseticidas do tipo emulsões e concentrados emulsionáveis e também, largamente empregado na indústria química. O xileno técnico, conhecido comercialmente por xilol, é constituído de uma mistura dos isômeros orto, meta (60-

70%), paraxileno e etilbenzeno, apresentando um ponto de ebulição de cerca de 140°C (Larini, 1998). A estrutura química do xileno está apresentada na Figura 5.

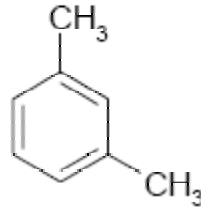


Figura 5: Estrutura química do xileno.

2.2.3.2 Toxicocinética

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 paraxileno 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 (Larini, 1998; Oga, 2003).

A sua biotransformação, ilustrada na 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 microssomas hepáticos com formação do derivado alcoólico que sofrendo uma oxidação, agora no citosol, através da álcool desidrogenase produz o metilbenzaldeído que, por sua vez, 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 subseqüentes. Sua excreção urinária é reduzida nas pessoas obesas em função da retenção do xileno no tecido

adiposo (Oga, 2003). O ácido metilhipúrico representa mais que 95% da fração metabolizada do xileno (Klaassen *et al.*, 2001).

Este metabólito não está normalmente presente na urina 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. O IBMP é de 1,5 g/g creatinina, o limite de tolerância do xileno é de 78 ppm ou 340 mg/m³ (Michel, 2000; Oga, 2003).

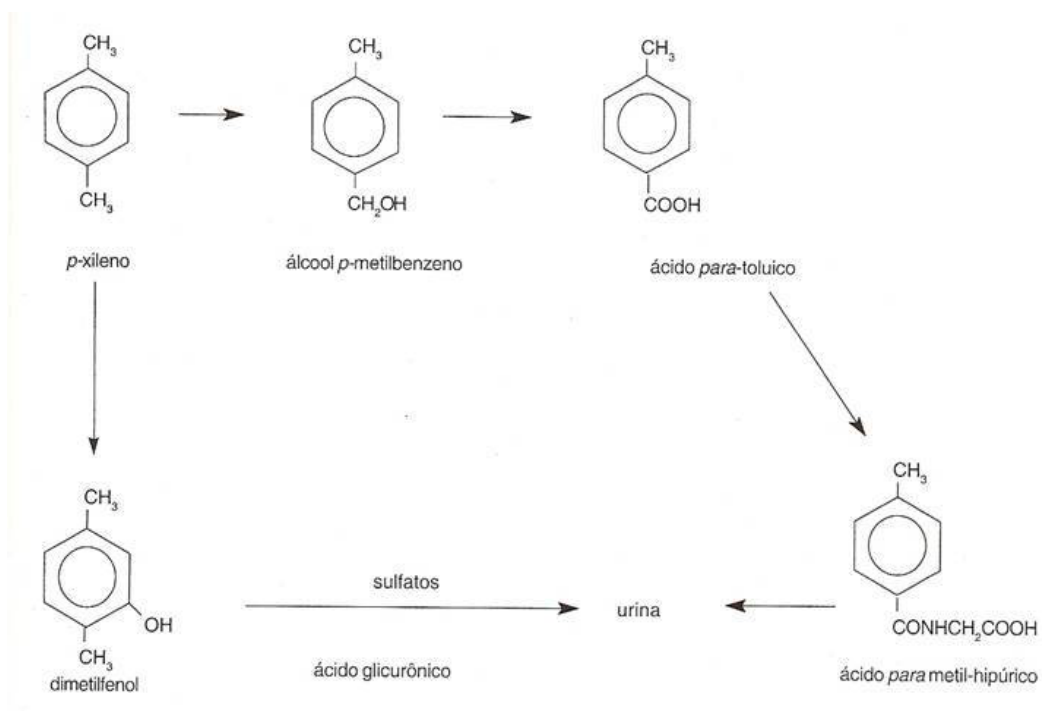


Figura 6: Esquema da biotransformação do xileno (adaptado de Oga, 2003).

O ácido metilhipúrico urinário é seu IBE proposto pela legislação brasileira (Brasil, 1994). Este metabólito não representa um componente fisiológico da urina e correlaciona-se bem com a concentração total do solvente absorvido pelo indivíduo exposto (Klaassen *et al.*, 2001; Oga, 2003).

2.2.3.3 Efeitos Toxicológicos

Em contato com a pele provoca dermatites e nas mucosas provoca irritação grave. No sistema nervoso central atua como narcótico com ação depressora, são similares ao tolueno, mas preferencialmente se acumulam no cérebro e tecido adiposo (Moraes, 2003). A nível pulmonar a produção de um aldeído, intermediário na formação do ácido metilbenzóico durante a biotransformação do xileno, pode resultar numa ação deletéria em vários componentes celulares (Larini, 1998).

Existem poucos relatos de que exposições crônicas ao xileno estejam associadas a efeitos neurológicos residuais (ATSDR, 1995). Em 1993, Ushida et al. reportaram um aumento subjetivo de sinais e sintomas no sistema nervoso central de trabalhadores expostos durante 7 anos a uma concentração de 21 ppm. A prevalência dos sintomas não foi dose-dependente.

Algumas evidências de injúrias hepáticas e renais foram observadas em estudos com animais (ATSDR, 1995). Muitos investigadores reportaram um aumento no peso do fígado, além de uma indução das enzimas hepáticas, principalmente do citocromo P450, em ratos e outros animais de laboratório (Klaassen *et al.*, 2001).

2.2.4. Etilbenzeno

2.2.4.1 Generalidades

O etilbenzeno, estrutura química do estireno representada na Figura 7, é um intermediário químico de alto valor comercial, utilizado extensivamente nas indústrias química, petroquímica e farmacêutica, com diferentes aplicações, na fabricação de tintas e vernizes e como precursor de diversos outros produtos. O seu maior emprego, entretanto, é na manufatura do monômero estireno, um outro importante intermediário químico usado na produção de polímeros, resinas e borrachas sintéticas. A produção mundial de etilbenzeno é estimada como 23 milhões de toneladas ao ano, com cerca de 90% sendo empregada diretamente na síntese do estireno (Degnan-Jr , 2001; Kirk & Othmer, 1984).

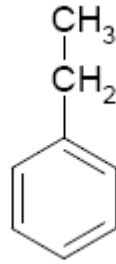


Figura 7: Estrutura química do etilbenzeno.

2.2.4.2 Toxicocinética

A principal via de absorção é a respiratória. Na forma líquida pode penetrar através da pele, além de ser bem absorvido pelo trato gastrointestinal. É distribuído pelos tecidos através do fluxo sangüíneo e da lipofilicidade, sendo metabolizado pelas enzimas hepáticas do citocromo P450, e posteriormente, é largamente excretado na forma de metabólitos urinários (Lof & Johanson, 1998). A biotransformação do estireno está demonstrada abaixo na Figura 8. O IBE recomendado pela legislação brasileira é o ácido mandélico urinário (Brasil, 1994).

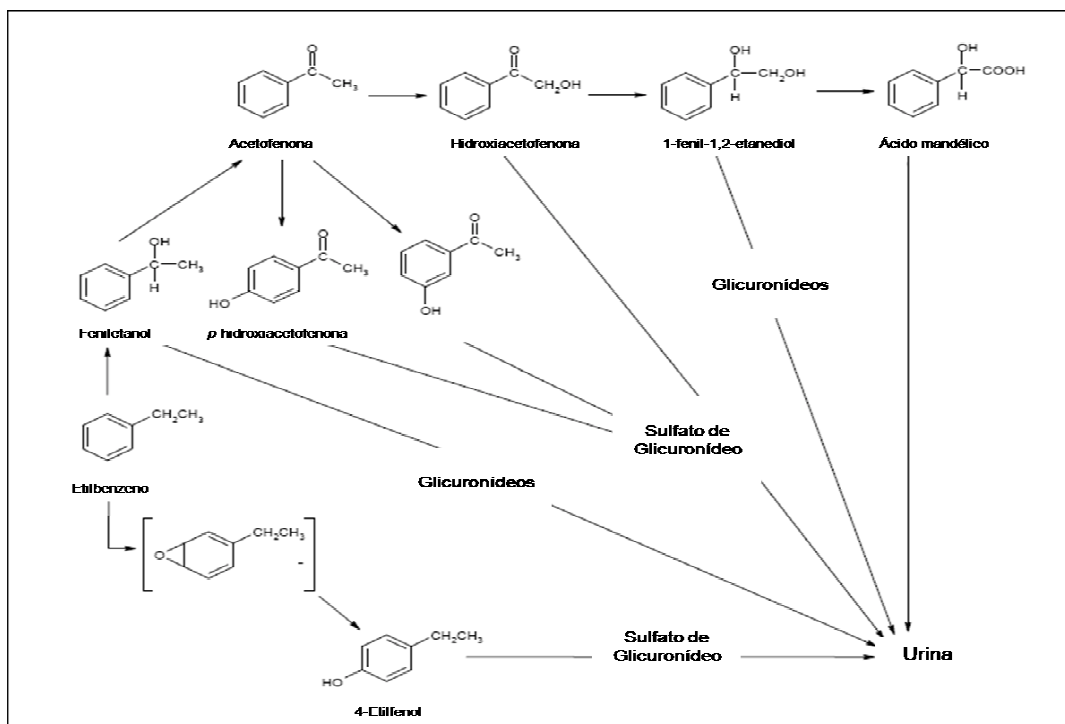


Figura 8: Esquema da biotransformação do etilbenzeno (adaptado de Engstrom *et al.*, 1984).

2.2.4.3 Efeitos Toxicológicos

A ação tóxica do etilbenzeno é semelhante a do xileno e de outros hidrocarbonetos aromáticos, e atinge principalmente o sistema nervoso central (Klaassen *et al.*, 2001). Tem ação irritante e o contato repetido pode provocar dermatite, diminuição das habilidades manuais e prolongamento do tempo de reação. A exposição aguda pode produzir irritação das vias aéreas superiores seguida de narcose, calafrios e parada respiratória (ACGIH, 1996; Angerer & Wulf, 1985)

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

2.3. Monitorização biológica

A monitorização da exposição ocupacional é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais, com a finalidade de detectar os possíveis riscos à saúde do trabalhador.

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 (Amorim, 2003).

Existem métodos para quantificação de IBE em urina de indivíduos expostos que incluem, principalmente, a cromatografia gasosa (CG) (Ohashi *et al.*, 2006) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Manini *et al.*, 2004). Estas duas técnicas são sensíveis e seletivas, permitindo a detecção de pequenas quantidades dos indicadores. A análise dos IBE por CLAE tem aumentado, já que além de oferecer a vantagem de separação e quantificação simultâneas, pode representar menor custo comparado à CG porque não é necessária a derivatização prévia da amostra para torná-la volátil e/ou termicamente estável. Por outro lado, a maioria das análises realizadas por CLAE, apresenta várias etapas pré-analíticas, como por exemplo, extração da amostra, representando assim, algumas desvantagens relacionadas às condições cromatográficas (Manini *et al.*, 2004; Bulcão *et al.*, 2008).

A quantificação simultânea dos IBE é importante devido ao fato dos indivíduos encontrarem-se expostos a uma mistura de solventes, tornando assim, a determinação mais rápida, barata e confiável. Níveis acima dos IBMP indicam exposição excessiva e a possibilidade do surgimento de efeitos em longo prazo, mesmo que os indivíduos não apresentem sinais e sintomas resultantes do processo de toxicidade. Portanto, métodos simples e rápidos são imprescindíveis na rotina laboratorial, no auxílio da monitorização biológica e na prevenção de patologias ocupacionais crônicas. Para se realizar a monitorização biológica é necessário validar a metodologia analítica previamente.

2.3.1. Parâmetros de validação metodológica

2.3.1.1 *Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)*

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 1995; INMETRO, 2003).

O LD pode ser calculado baseado em parâmetros da curva analítica, através da fórmula $LD = 3,3 \times s/b$, onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e b é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica (Ribani, 2004).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 1995; INMETRO, 2003). Como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas. Pode ser calculado baseado nos parâmetros da curva analítica, e expressos pela fórmula $LQ = 10 \times s/b$, em que s é a estimativa do desvio padrão da resposta (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica b , em níveis próximos ao LQ (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1998; Brasil, 2003; ICH, 2004; Ribani, 2004).

2.3.1.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 1995; Ribani, 2004). A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (Ribani *et al.*, 2004). Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (Barros Neto *et al.*, 2002). Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r (Ribani *et al.*, 2004). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (ICH, 1995; Ribani, 2004).

2.3.1.3 Precisão intermediária

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 1995; INMETRO, 2003). Indica o efeito das variações dentro do laboratório, a precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (Brasil, 2003; Ribani, 2004). A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2001; ICH, 2004).

2.3.1.4 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 1995; INMETRO, 2003). A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (Chasin *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2001; Brasil, 2003; ICH, 2004).

2.3.1.5 Recuperação

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (Thompson *et al.*, 1999). A limitação do procedimento de recuperação é a de que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra. Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados (Ribani, 2004). É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1998; Brasil, 2003; ICH, 2004).

2.4. Estresse Oxidativo e Biomarcadores do estresse oxidativo

2.4.1 Radicais livres e espécies reativas

Os radicais livres (RLs) são agentes oxidantes caracterizados como espécies atômicas ou moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na

sua órbita externa, tornando-as espécies altamente reativas que agem como eletrófilos (Gilhan *et al.*, 1997).

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

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

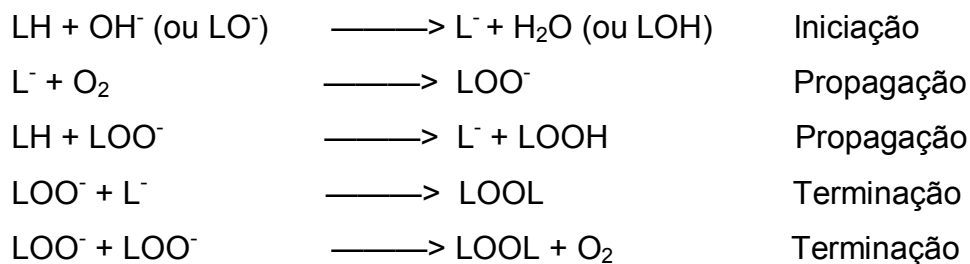
Em condições fisiológicas normais as EROS podem desempenhar importante papel fisiológico na regulação da resposta imunológica, participando do processo fagocítico de defesa contra infecções e atuando como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose (Halliwell, 1994; Biesalski, 2002). No entanto, o aumento na sua produção e/ou a redução de antioxidantes gera um desequilíbrio, caracterizando o estresse oxidativo (Beal, 1995; Finkel & Holbrook, 2000; Gutteridge & Halliwell, 2000; Junqueira & Ramos, 2005), causando danos em muitos constituintes celulares, como lipídios insaturados, proteínas e DNA (Findlay *et al.*, 2005).

A homeostase entre a formação e a degradação de EROs no organismo é mantida por moléculas e proteínas antioxidantes que removem as EROs e restauram o balanço redox (Findlay *et al.*, 2005), entre elas podem ser citadas a glutatona reduzida, a albumina e algumas enzimas como a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase.

2.4.2 Peroxidação lipídica

O ataque de espécies reativas aos lipídios das membranas desencadeia um processo chamado peroxidação lipídica (Urso & Clarkson, 2003), formando muitos produtos secundários. Estes produtos são principalmente aldeídos, com capacidade para aumentar o dano oxidativo (Uchida, 2000) entre eles, o malondialdeído (MDA) que é considerado o principal e o mais estudado biomarcador da peroxidação lipídica.

Esta é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio:



A reação acima se inicia com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo OH^{\cdot} ou pelo LO^{\cdot} (radical alcóxila), com conseqüente formação do L^{\cdot} (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o L^{\cdot} reage rapidamente com o O_2 , resultando em LOO^{\cdot} (radical peróxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o L^{\cdot} na segunda equação de propagação. O término da peroxidação lipídica ocorre quando os radicais (L^{\cdot} e LOO^{\cdot}) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios (Ferreira & Matsubara, 1997).

O tempo de vida longo e a alta reatividade permitem a estas moléculas agir tanto dentro quanto fora das células, interagindo com outras biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas, freqüentemente levando a danos irreversíveis sobre o delicado mecanismo de funcionamento da célula (Del Rio, 2005). O contínuo dano oxidativo leva a destruição de membranas, ricas em ácidos graxos poliinsaturados, diminuindo a sua fluidez e contribuindo para a injúria celular (Hershko, 1989). Ocorre

perda da seletividade na troca iônica, inativação de enzimas e proteínas de transporte da membrana e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos. Adicionalmente, a oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo destes lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (Barreiros, 2006).

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

O malondialdeído (MDA) é um dos mais conhecidos produtos secundários da peroxidação lipídica, resultante da exposição de membranas biológicas a radicais livres, podendo ser utilizado como um indicador da injúria de membranas celulares. Por esta razão, a quantificação de MDA em biomateriais é amplamente utilizada como biomarcador do estresse oxidativo (Esterbauer *et al.*, 1991; Bonnes & Guérin, 1992).

2.4.3 Oxidação de proteínas

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

Geralmente, proteínas são os maiores alvos celulares dos EROS e de produtos do estresse oxidativo, por serem os principais componentes de muitos sistemas biológicos e por combaterem de 50 a 75% de EROS como a OH^- (Davies, 1999). Elas são modificadas por um vasto número de reações envolvendo EROS (Nyström, 2005).

2.4.3.1 Carbonilação de proteínas

Algumas modificações protéicas podem não ocasionar perda de função ou alterações estruturais em proteínas e são, muitas vezes, uma maneira de o organismo defender-se do ataque oxidativo. Neste caso, proteínas com ação antioxidante sofrem oxidação reversível (Levine *et al.*, 2000; Dalle-Donne *et al.*, 2005a, Dalle-Donne *et al.*, 2005b). Por outro lado, modificações irreversíveis de proteínas podem levar a danos estruturais com inativação e perdas funcionais das mesmas.

Embora a biologia das modificações oxidativas de proteínas permaneça complexa e mal definida, a carbonilação de proteínas é bem caracterizada. Carbonilação é uma modificação protéica irreversível e não enzimática (Stadtman & Berlett, 1991; Stadtman & Levine, 2003). Grupos carbonil são introduzidos nas proteínas por uma variedade de rotas oxidativas. Modificações de proteínas podem ser induzidas diretamente por EROS ou indiretamente pelo ataque de produtos secundários do estresse oxidativo. A oxidação direta de proteínas por EROS produz derivados carbonilados altamente reativos, resultando na oxidação das cadeias laterais de diversos aminoácidos (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Os aminoácidos tiólicos cisteína e metionina são particularmente suscetíveis ao ataques oxidativo de quase todos as EROS (Dalle-Donne *et al.*, 2003b).

Proteínas moderadamente carboniladas são degradadas por um sistema proteosomal, enquanto que, proteínas fortemente carboniladas tendem a formar agregados de alto peso molecular que são resistentes à degradação e acumulam como proteínas danificadas. Tais agregados de proteínas carboniladas podem inibir a atividade das proteases (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

A figura 9 mostra que as proteínas carboniladas resultante do processo oxidativo podem ser degradadas ou recuperadas resultando em não aparecimento de patologias ou em casos mais acentuados induzir a morte celular resultando em processos patológicos.

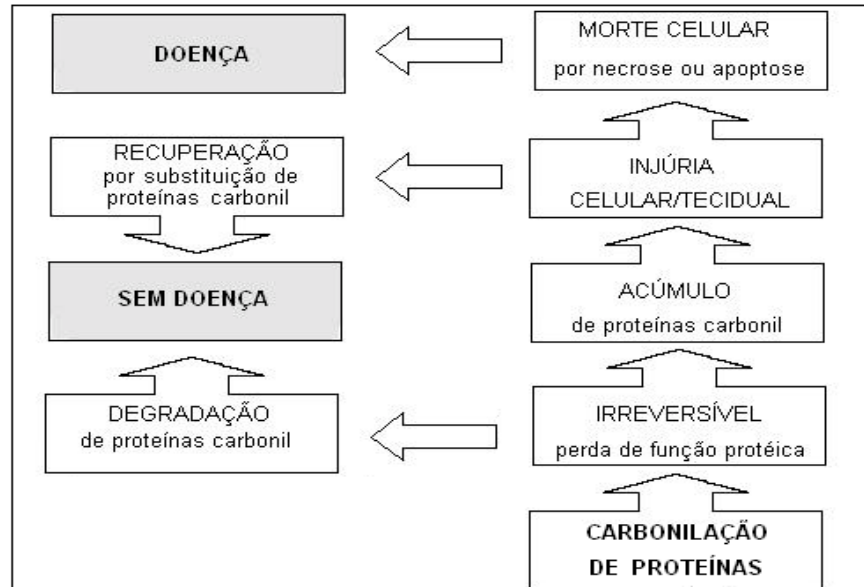


Figura 9 Possíveis efeitos da carbonilação de proteínas. Ela é geralmente associada com perda permanente de função e pode levar à eliminação ou acúmulo de proteínas carboniladas, com freqüente produção de injúria tecidual, e eventualmente morte da célula. (adaptado de Dalle-Donne et al., 2006).

Em adição, estudos demonstraram que a carbonilação de proteínas está envolvida no diabetes, catarata e câncer (Dalle-Donne *et al.*, 2003a; Nyström, 2005).

A carbonilação de proteínas é um biomarcador muito usado para avaliar dano oxidativo nas proteínas, e reflete danos celulares ocasionados pelas espécies reativas (Standtman & Levine, 2003; Dalle-Donne *et al.*, 2003; Butterfield & Castegna, 2003; Dalle-Donne *et al.*, 2005b).

A quantificação de proteínas carboniladas (PCO) apresenta uma vantagem sobre os produtos da peroxidação lipídica como biomarcador de estresse oxidativo, pois as proteínas oxidadas geralmente são mais estáveis (Dalle-Donne *et al.*, 2003b).

2.4.4 Antioxidantes

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de diminuir ou inibir a oxidação mesmo presente em baixas concentrações em relação a seu substrato. Desta forma, estes compostos protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Isto implica que os diferentes antioxidantes podem atuar em níveis e com modo de ação distintos.

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

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

Assim, as defesas antioxidantes são constituídas pelos sistemas enzimáticos como a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase, e pelos sistemas não-enzimáticos, como os antioxidantes endógenos, glutathione redutase, ubiquinona e micronutricionais, antioxidantes exógenos, como as vitaminas A, C, E e flavonóides (Urso & Clarkson, 2003; Mayne, 2003).

2.4.4.1 Sistema enzimático

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

Na Figura 10, etapa A, é possível observar que a SOD age transformando dois ânions radicais superóxido em peróxido de hidrogênio, a qual é uma reação normal em pH fisiológico, porém muito acelerada na presença dessa enzima. Pode ocorrer de três formas, dependendo do metal associado à mesma: cobre (Cu) e zinco (Zn) no citoplasma dos eucariontes, manganês (Mn) na matriz mitocondrial e ferro (Fe) em bactérias (Gillham *et al.*, 1997, Sies, 1997).

Outro antioxidante enzimático é a catalase, a qual possui a capacidade de transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Fig. 10, etapa B). Sua localização está nos peroxissomas, tendo por isto ação diminuída em órgãos como o

coração, pulmão e o cérebro que possuem pouco peroxissomas. Nestes órgãos a ação antioxidante por esta enzima ocorre quando os radicais livres atingem a corrente sanguínea, através da catalase eritrocitária (Gillham *et al.*, 1997, Sies, 1997).

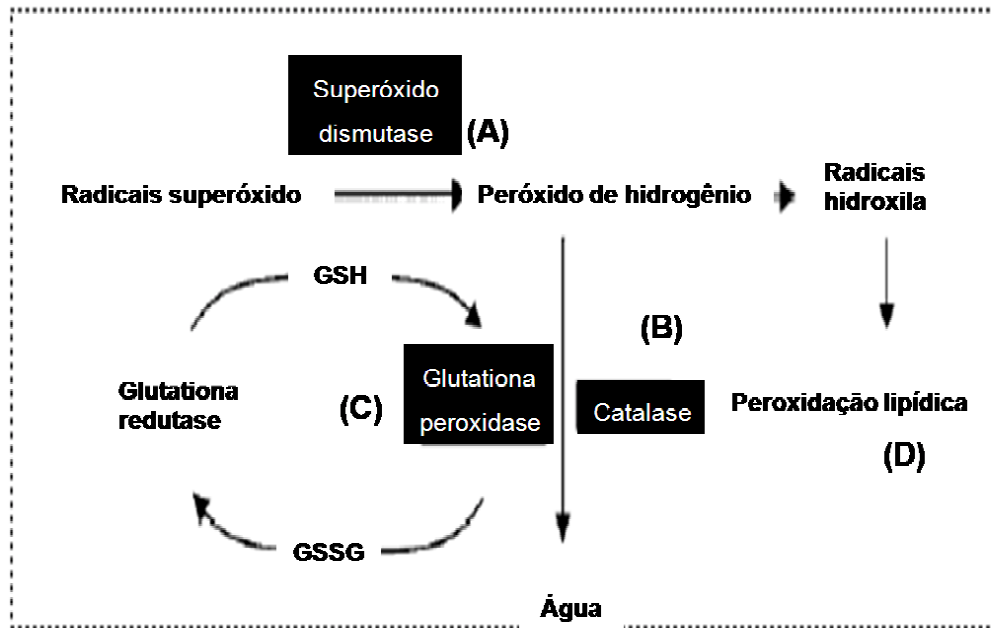


Figura 10: Sistema antioxidante enzimático (adaptado de Sies *et al.*, 1972).

O H_2O_2 também pode ser desintoxicado pela glutaciona peroxidase (GPx) (Fig. 10, etapa C), localizada no citoplasma e na matriz mitocondrial. Sua ação ocorre através da redução do H_2O_2 e de hidropeptídeos orgânicos através da utilização da glutaciona reduzida (GSH), um tripeptídeo composto de glutamato, cisteína e glicina. Assim a GSH atua como um co-substrato, de maneira que doa dois hidrogênios dos seus grupamentos sulfidrilas para os peróxidos, transformando-os em álcool e água. A glutaciona oxidada ou dissulfeto (GSSG) formada é regenerada para GSH através da glutaciona redutase (GR) com transferência de elétron do NADPH (Fig. 11). A GPx ocorre em sua maioria associada ao selênio (Se), e seus principais locais de ação são fígado e eritrócitos, podendo ocorrer também no coração, pulmões e músculos.

Desta forma, o sistema antioxidante enzimático diminui a formação de radicais hidroxila e, conseqüentemente a peroxidação lipídica (Fig. 10; etapa D).

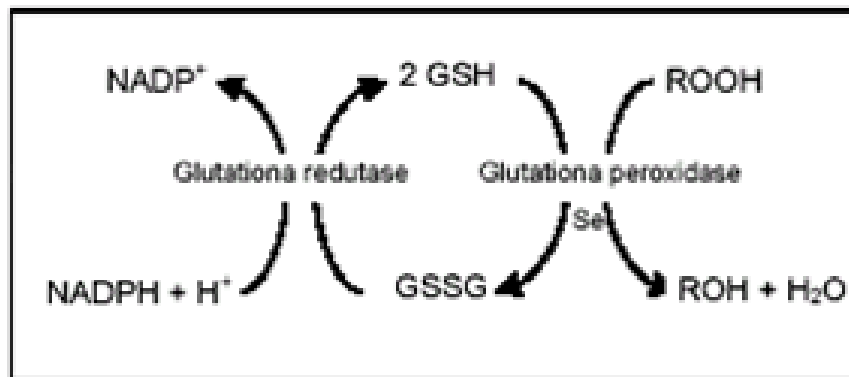


Figura 11: Mecanismo de ação do sistema glutatona (Sies et al., 1972).

Ainda existem as enzimas chamadas glutaciona S-transferases, as quais agem detoxificando agentes alquilantes, incluindo herbicidas, pesticidas e xenobióticos, através da catálise das reações desses agentes com o grupo SH da glutaciona, neutralizando-os e tornando-os mais facilmente excretáveis.

2.4.4.2 Sistema não-enzimático

É formado por antioxidantes hidrofílicos (GSH, vitamina C, indóis e catecóis) e lipofílicos (bioflavonas, vitamina E e carotenóides).

A GSH, cujo sistema antioxidante da qual participa foi mostrado anteriormente, é o principal antioxidante não-enzimático endógeno e pode ser encontrada em vários tecidos biológicos, sendo que no sangue, 99,5% da GSH é eritrocitária. Sua função antioxidante se dá pela capacidade de ser um doador imediato de elétrons para neutralizar H_2O_2 e lipoperóxidos, e também pela capacidade de seqüestrar EROs e ERNs (Nozal *et al.*, 1997; Leichtweis & Ji, 2001). É um tiol, ou seja, possui grupos sulfidrílicos (-SH) reativos, é não protéica, tem baixo peso molecular e está presente em altas concentrações no interior das células, sendo considerada como o principal antioxidante multifuncional endógeno (Cecconi *et al.*, 1988).

O ácido ascórbico é um antioxidante que atua principalmente no plasma devido a sua hidrossolubilidade, e exerce sua ação como doador de elétrons, através do ascorbato e também como regenerador do tocoferol (Chan, 1993). Também possui habilidade de eliminar o ácido hipocloroso, um agente igualmente envolvido em processos de estresse (Fumeron *et al.*, 2005). Entretanto, sabe-se que

em grandes quantidades e associada ao ferro pode ter efeito pró-oxidante por induzir a geração de OH^\bullet (Chan, 1993).

O alfa-tocoferol é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e, portanto, atua na proteção contra a peroxidação lipídica. Sua ação antioxidante baseia-se na conversão de radicais hidroxila e superóxido em formas menos ativas, e pode ser regenerada pelo ascorbato e pela GSH (Chan, 1993).

As espécies reativas podem ser inativadas por sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos presentes na circulação sanguínea ou no interior das células. A superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) são enzimas antioxidantes intracelulares, as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol), glutathione reduzida (GSH) e albumina são antioxidantes não enzimáticos. A vitamina C é hidrossolúvel, enquanto a vitamina E é lipossolúvel, e ambas estão presentes na circulação e nos tecidos, sendo ambas de origem exógena (Nakazawa *et al.*, 1996).

O estresse oxidativo pode alterar sistemas antioxidantes e, com isto, ocorre o aparecimento de biomarcadores característicos desta disfunção, como proteínas carboniladas, produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído.

2.5 Inter-relação da exposição ocupacional a solventes e o estresse oxidativo

Alguns solventes orgânicos vêm sendo apontados como causadores de injúria tecidual em diferentes órgãos devido ao aumento da produção de radicais livres e/ou espécies reativas (Gromadzinska & Wasowicz, 2003; Costa *et al.*, 2005).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo algumas degenerativas, e também cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (Ames *et al.*, 1993; Witzum, 1994; Sies & Stahl, 1995; Roy & Kulkarni, 1996). Os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (Poulsen *et al.*, 1998).

Existem algumas evidências de que solventes orgânicos, entre eles, benzeno, tolueno, xileno, estireno e etilbenzeno, possam expressar sua toxicidade através de EROS, induzindo dano celular (Mattia, 1991; 1993). Foi demonstrado o envolvimento do tolueno como responsável pela indução da peroxidação lipídica em alvéolos

pulmonares (Suleiman, 1987). O p-xileno, uma estrutura análoga, ocasionou aumentos similares em microssomas pulmonares (Stickney *et al.*, 1989). Em 1998, Ulakoglu *et al.*, estudaram efeitos de solventes orgânicos em ratos, e notaram aumentos significativos nos níveis de MDA e 4-DHA (hidroxi-alquenos), biomarcadores da peroxidação lipídica, em relação ao tempo de exposição. Além disso, houve diminuição da atividade da SOD (superóxido dismutase) e dos níveis de glutathiona a partir da terceira semana de inalação. Quanto maior o tempo de exposição a solventes maiores os danos (Ulakoglu *et al.*, 1998).

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

Estudos preliminares, com um grupo de 22 trabalhadores expostos ao estireno e outras misturas presente em tintas, demonstraram concentrações significativamente elevadas de MDA em comparação com o grupo controle (Dlugosz, 2005). Um estudo preliminar realizado por Dlugosz & Sawicka, em 1998, em trabalhadores expostos a uma mistura de solventes, apresentou uma diminuição nos antioxidantes, demonstrados pela atividade da SOD e GPx que estavam diminuídas.

Em um estudo recente, realizado em 2007, em vinte pintores do sexo masculino os níveis de MDA plasmático, SOD eritrocitária e da capacidade antioxidante total (GSH e GPx) foram avaliados e demonstraram níveis aumentados de MDA e SOD nos pintores, quando comparados ao grupo não exposto e diminuição da capacidade antioxidante total (Bayil *et al.*, 2007). Karagözler *et al.*, encontraram resultados similares, aumento significativo de MDA em pintores comparados ao grupo controle ($p < 0,05$), entretanto os valores de SOD e GPx estavam diminuídos (Karagözler *et al.*, 2002).

Em 2002, Serron *et al.* realizaram um estudo sobre a indução de estresse oxidativo em ratos pelo solvente etilbenzeno, confirmando que um dos danos ocasionados por este solvente aromático é a produção de radicais livres. Esta indução foi confirmada pelas alterações nas atividades das enzimas SOD e CAT observadas neste estudo (Serron *et al.*, 2002).

Existem poucos relatos abordando exposições a solventes orgânicos e os biomarcadores do estresse oxidativo, principalmente antioxidantes exógenos, como

vitaminas C e E. A vitamina E parece proteger contra danos oxidativos, em um estudo realizado em ratos expostos a acetona, pois os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) diminuíram após suplementação com vitamina E (Armutcu *et al.*, 2005). Além disso, a extensão da oxidação de proteínas, avaliadas através da quantificação das proteínas carboniladas, não foram relatadas em exposições ocupacionais crônicas a solventes.

Portanto, exposições crônicas podem resultar em danos permanentes ou muitas vezes fatais. Complicações importantes podem ser o aumento da peroxidação lipídica e a diminuição da capacidade antioxidante do organismo (Ulakoglu, 1998).

Desta forma, devido aos poucos trabalhos encontrados e alguns contraditórios, estudos que contribuam para o melhor entendimento do possível envolvimento da exposição ocupacional a solventes orgânicos e o estresse oxidativo são importantes para um melhor entendimento dos efeitos toxicológicos destes xenobióticos dentro da toxicologia ocupacional.

3 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo e dois manuscritos que se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e/ou manuscrito. A apresentação destes está baseada na versão submetida às revistas: Química Nova, International Archives of Occupational and Environmental Health e Clinical Biochemistry.

4 DISCUSSÃO

A avaliação da exposição de trabalhadores a substâncias químicas no ambiente de trabalho é importante para evitar o aparecimento de danos patológicos permanentes. E neste sentido, a monitorização biológica é realizada através da quantificação de agentes presentes no ambiente de trabalho e/ou de seus metabólitos em material biológico, com o objetivo de avaliar o grau de exposição e o risco à saúde (Della Rosa *et al.*, 2003). Os níveis dos metabólitos urinários quantificados são parâmetros que possuem um alto poder preditivo dos riscos à saúde decorrentes da exposição a solventes (Angerer & Kramer, 1997; Thiesen, 2005), pois apresentam uma relação linear com a intensidade da exposição no ambiente de trabalho (Inoue *et al.*, 1986).

Desta forma, a quantificação dos metabólitos urinários dos solventes orgânicos é o método mais adequado para avaliar exposição a estes solventes, pois, por se tratar de análises realizadas em urina, ao invés de sangue, a colheita da amostra é mais fácil e não invasiva. Além disto, os parâmetros preconizados pela legislação indicam os metabólitos urinários como preferenciais para avaliação da exposição ocupacional a estes solventes (Michel, 2000; Thiesen, 2005).

Segundo a NR-7, os ácidos hipúrico (HA), metilhipúrico (mHA), mandélico (MA) e fenilgloxílico (PGA) urinários são considerados indicadores biológicos de exposição ocupacional aos solventes, tolueno, xileno, etilbenzeno e estireno. Os ácidos mHA, PGA e MA são encontrados somente em urina de indivíduos expostos. No entanto, o ácido hipúrico possui valor de referência (VR), podendo atingir até 1,5 g/g de creatinina, pois é encontrado em indivíduos não expostos ao tolueno (Brasil, 1994). A excreção do ácido hipúrico na urina pode sofrer influência da dieta, devido a 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).

Os trabalhadores expostos a solventes orgânicos, normalmente estão expostos a uma mistura de solventes. Por esta razão, a quantificação simultânea dos metabólitos do tolueno, estireno, xileno e etilbenzeno é importante para a monitorização biológica. Pois, em laboratórios responsáveis pela monitorização de

trabalhadores, estas análises não quantificam simultaneamente os metabólitos, necessitando de um tempo maior, além do custo ser mais elevado para fazer cada análise separadamente.

No Artigo I, os resultados apresentados demonstraram que um método eficiente para quantificação dos metabólitos urinários dos solventes orgânicos tolueno, xileno, estireno e etilbenzeno por CLAE foi otimizado e validado. Pois, através dos parâmetros de validação utilizados neste trabalho foi possível estabelecer que os resultados encontrados estavam de acordo com as normas da ICH e ANVISA.

O método foi otimizado através de modificações metodológicas como por exemplo, a diminuição na concentração de KH_2PO_4 da fase móvel para 22,5 mM, pois em trabalhos prévios esta concentração era de 50mM. Sabe-se que altas concentrações de sais de fosfato podem precipitar na coluna e no sistema cromatográfico, danificando e aumentando a pressão do cromatógrafo. O pH da fase móvel também foi modificado, passando de 2,5 a 3,5, comparando-se ao método de Laffon, 2001. A maioria das colunas cromatográficas pode ser danificada em pH extremamente baixo. A eluição isocrática permitiu uma análise rápida devido à ausência de tempo entre uma análise e outra para recondicionar a coluna.

O tratamento da amostra baseou-se apenas na diluição e centrifugação da amostra, demonstrando ser um procedimento prático e rápido (Bulcão *et al.*, 2008), em comparação a métodos que utilizam extração em fase sólida (SPE) ou extração líquido-líquido ou ainda hidrólise enzimática (Manini, 2004).

Os resultados dos parâmetros de validação metodológica observados no artigo I foram coeficientes de regressão (r^2) superiores a 0,99, os LD e LQ entre 0,001 a 0,02 g.L^{-1} , a recuperação obtida a partir da fortificação das amostras apresentou valores acima de 96%. Estes parâmetros mostraram-se satisfatórios tratando-se de validação cromatográfica para a análise de amostras biológicas (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2001; ICH, 2004).

No estudo da especificidade foi observada uma boa separação cromatográfica e a precisão intermediária encontrada apresentou $\text{CV} < 6\%$, dentro do limite aceito para validação de métodos cromatográficos que deve ser menor que 15%. A inexatidão foi calculada pela tendenciosidade ($\% \text{ bias}$), e apresentou valores satisfatórios, ou seja, inferiores a $\pm 15\%$ (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1998).

Quando um método é validado, ele assegura a credibilidade das análises realizadas durante a rotina laboratorial, sendo algumas vezes mencionado como “o processo que fornece uma evidência documentada de que a metodologia realiza aquilo para o qual é indicada a fazer” (ICH, 1994). Portanto, o método otimizado apresentou-se apropriado para a quantificação dos quatro metabólitos, respeitando todos os parâmetros de desempenho analítico: linearidade, precisão, exatidão, recuperação e sensibilidade (Causon, 1997; Bakshi & Singh, 2002; Brasil, 2003).

A aplicação do método foi realizada em trabalhadores expostos e não expostos. Nos indivíduos expostos, os níveis de ácido hipúrico estavam significativamente aumentados quando comparados com o grupo não exposto (duas vezes maior). Ainda assim, estes níveis encontravam-se abaixo dos valores de referência. Os níveis de ácido hipúrico urinário encontrados nas amostras dos indivíduos não expostos apresentaram um intervalo de 0,058 – 0,23 g/g creatinina, todos abaixo do valor de referência considerado seguro para a saúde e bem-estar do indivíduo.

Por outro lado, nenhum indivíduo do grupo não exposto apresentou níveis detectáveis de ácido 3-metilhipúrico, de ácido fenilglioxílico ou de ácido mandélico. Porém, entre os trabalhadores expostos, 95% apresentaram o metabólito do xileno (ácido 3-metilhipúrico) e 37,5% apresentaram o metabólito de exposição ao estireno (ácido fenilglioxílico, 30%) e ao estireno e etilbenzeno (ácido mandélico, 26%).

Em estudos recentes sobre exposições a tintas, alguns solventes têm sido associados ao estresse oxidativo, que é decorrente do desequilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes do organismo, podendo estar relacionado a inúmeras doenças (Klaassen *et al.*, 2001; Oga, 2003; Baydas *et al.*, 2005). Desta forma, neste trabalho foram avaliados os níveis de alguns importantes biomarcadores do estresse oxidativo, em pintores expostos aos solventes presente nas tintas, de uma indústria da cidade de Caxias do Sul e comparados com indivíduos não expostos. Além disso, foi verificada a possível relação entre os níveis de antioxidantes exógenos, como as vitaminas C e E, de alguns antioxidantes endógenos, como a GSH, e as enzimas SOD, CAT e GPx, além de biomarcadores resultantes da oxidação lipídica e protéica, como o MDA e a PCO com os níveis urinários dos indicadores biológicos de exposição ao tolueno, xileno, estireno e etilbenzeno.

Os resultados dos IBE estavam abaixo do IBMP e encontraram-se de acordo com os preconizados pela legislação (Brasil, 1994; Heinrich-Ramm *et al.*, 2000;

ACGIH, 2003). Os trabalhadores expostos apresentaram alterações nos biomarcadores do estresse, apresentando um aumento significativo nos níveis de MDA plasmáticos, que é o principal produto do ataque de radicais livres aos ácidos graxos, e é largamente utilizado como biomarcador de peroxidação lipídica (Lasheras *et al.*, 2002). O MDA indica a extensão de dano da membrana celular (Esterbauer *et al.*, 1991). A elevação dos níveis de MDA observada nos trabalhadores expostos demonstrou que a peroxidação lipídica é mais alta nestes indivíduos quando comparado aos não expostos ($p < 0,01$). Estes resultados podem ser devido a exposição a estes solventes em longo prazo, sugerindo que o metabolismo do tolueno, xileno, etilbenzeno e estireno geram dano oxidativo nestes indivíduos.

A SOD desempenha um importante papel na proteção contra os efeitos tóxicos do ânion superóxido (O_2^-) por catalisar a sua dismutação a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Quanto mais oxigênio reativo é produzido, mais a atividade da SOD tende a aumentar para converter em H_2O_2 (Ulakoglu *et al.*, 1998). No presente estudo, manuscrito I, foi encontrado um aumento significativo na atividade da SOD nos indivíduos expostos ($p < 0,001$), desta forma, a exposição a solventes orgânicos parece aumentar a produção dos ânions superóxido como mecanismo compensatório.

Por outro lado, H_2O_2 é um das espécies de oxigênio mais ativa e deve ser biotransformado em H_2O que é realizado por outras enzimas como catalase ou sistema enzimático glutaciona peroxidase (GPx) na presença de GSH (Chance *et al.*, 1979). A atividade sangüínea da catalase foi significativamente aumentada nos indivíduos expostos ($p < 0,001$). As enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT são a primeira linha de defesa celular contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) e têm sido sugerido que o decréscimo de sua atividade contribui para o dano oxidativo nos tecidos (Sivaprasad *et al.*, 2004).

Em 2000, Halifeoglu *et al.* avaliaram trabalhadores que tinham sido expostos a solventes durante 10 anos enquanto trabalhavam em uma indústria de tintas, e os níveis de MDA, glutaciona peroxidase (GPx) e SOD foram significativamente mais altos que no grupo controle, entretanto, não foram quantificados os IBE urinários.

No presente estudo, a exposição crônica a solventes resultou em níveis aumentados de GSH eritrocitária comparados com indivíduos não expostos ($p < 0,05$). O aumento na atividade de enzimas antioxidantes e de grupos tióis não-

protéicos após a exposição a agentes tóxicos é geralmente considerado como uma resposta de defesa e acredita-se que seja desencadeado como resultado ao aumento das espécies reativas (Nordberg & Arnér, 2001; Farmand *et al.*, 2005).

A exposição crônica a solventes resultou em níveis aumentados de MDA plasmático ($p < 0,01$). Assim, o aumento observado nos antioxidantes endógenos pareceu ser insuficiente para combater a peroxidação, corroborando com o processo do estresse oxidativo que, mesmo com o processo compensatório desencadeado demonstrou dano. Uma correlação positiva foi encontrada entre os níveis urinários do ácido mandélico com os biomarcadores do estresse oxidativo MDA, SOD e CAT. Estes resultados sugerem que a exposição ao estireno e ao etilbenzeno induz ao aumento das espécies reativas do oxigênio. Pode-se inferir com isso, que quanto mais elevados os níveis desse metabólito maior poderá ser o estresse oxidativo no trabalhador exposto e, conseqüentemente maior a peroxidação lipídica.

Estudos demonstraram que exposições a solventes, mesmo em baixas concentrações, podem induzir danos celulares. Por isso, a possibilidade de estresse oxidativo em trabalhadores expostos a solventes orgânicos tem sido objeto de alguns estudos, que inclui a associação entre exposição e os efeitos na saúde. Por outro lado, pouco se sabe sobre atividade da GPx, vitaminas exógenas como a C e E e a oxidação de proteínas.

Desta forma, no manuscrito II, os antioxidantes exógenos, vitaminas C e E, a GPx, que é uma enzima antioxidante endógena, MDA e as proteínas carboniladas (PCO), foram comparados entre os expostos e não expostos. Além disso, a relação destes biomarcadores com os IBE foi avaliada.

A monitorização biológica dos pintores, como foi citada anteriormente, demonstrou que todos os níveis dos metabolitos estavam abaixo do IBMP. Estes dados confirmam o grau aceitável de exposição dos trabalhadores aos solventes orgânicos (Tabela 1, Manuscrito II) (Bulcão *et al.*, 2008), segundo os níveis estabelecidos pela NR-7 e ACGIH. No entanto, os trabalhadores expostos apresentaram níveis significativamente diminuídos de vitaminas C e E séricos em comparação com o grupo não exposto ($p < 0,05$), apesar de encontrarem-se dentro dos valores de referência para adultos.

Essas vitaminas são agentes de baixa massa molecular que tem ação como *scavengers*. Os antioxidantes são encontrados em fluidos extra e intracelulares e provêm da dieta (vitamina E, beta-caroteno, a vitamina C) (Therond *et al.*, 2000).

A vitamina C age diretamente sobre os RLs de oxigênio e do óxido nítrico e está envolvida na regeneração de α -tocoferil em α -tocoferol (vitamina E) (Chan, 1993). Também possui habilidade de eliminar o ácido hipocloroso, um agente igualmente envolvido em processos de estresse (Fumeron *et al.*, 2005). A vitamina C interage com os EROS na fase aquosa do plasma antes que eles possam reagir oxidativamente sobre os lipídios e lipoproteínas.

Alguns autores enfatizam a importância da vitamina C como antioxidante em situações de estresse oxidativo vinculado a danos neurológicos (Polidori, 2003). Estudos clássicos mostram que em condições de estresse oxidativo, até que toda a vitamina C seja consumida, não ocorre significantes perdas de outros antioxidantes, nem aumento da peroxidação lipídica em plasma humano (Frei *et al.*, 1988).

A vitamina E apresenta ação antioxidante, convertendo radicais hidroxila e superóxido em formas menos ativas e pode ser regenerada por mecanismos não enzimáticos, pela vitamina C, e por mecanismos enzimáticos, pela GSH. Como possui alta lipossolubilidade, distribui-se pelas membranas lipídicas, constituindo-se na principal defesa das mesmas contra as lesões oxidativas (Chan, 1993).

Estudos apontam a vitamina E como um dos mais importantes antioxidantes exógenos para a lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Stampfer & Rimm, 1995; Bonithon-Kopp *et al.*, 1997).

Enzimas antioxidantes, como a GPx também possui ação de *scavengers* de radicais livres e peróxidos lipídicos detoxificando-os (Therond *et al.*, 2000). Em nossos resultados, a atividade da GPx foi significativamente aumentada em trabalhadores expostos a solventes orgânicos ($p < 0,01$). A GPx pode reagir de forma eficaz com H_2O_2 , lipídios hidroperóxidos orgânicos e outros, sendo a principal fonte de proteção contra baixos níveis de estresse oxidativo (Mates *et al.*, 1999). Portanto, o aumento de atividade da GPx poderia ser interpretado como uma tentativa para combater a superprodução de espécies reativas de oxigênio gerado por solventes orgânicos.

Um aumento dos níveis de MDA, bem como dos níveis de PCO comparado ao grupo controle ($p < 0,01$) foram encontrados. MDA indica a extensão da lesão na membrana celular (Esterbauer *et al.*, 1991). PCO é o mais utilizado biomarcador de dano oxidativo protéico, refletindo o dano celular induzido por múltiplas formas de ROS (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Grune *et al.*, 2001). O aumento nos níveis de PCO nos trabalhadores expostos a tintas pode indicar os danos oxidativos nas proteínas.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que radicais livres gerados ultrapassam a capacidade dos antioxidantes exógenos e endógenos, ocasionando danos oxidativos demonstrados pela carbonilação de proteínas e pela peroxidação lipídica.

Além disso, foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de MDA e PCO ($p < 0,001$) e uma correlação negativa foi encontrada entre os níveis de PCO e vitaminas C, E ($p < 0,01$) e GPx ($p < 0,05$), reforçando essa afirmação. Estes achados estão em concordância com outros estudos como o de Halifeoglu et al. (2000) que encontraram níveis mais elevados de MDA, SOD e GPx em trabalhadores expostos a solventes comparado ao grupo controle. No entanto, não há relatos sobre níveis de vitamina C e E em trabalhadores expostos ao tolueno, xileno, etilbenzeno e estireno.

Já os níveis de vitamina E foram inversamente correlacionados com MDA. A vitamina E por ser uma vitamina com alta afinidade por lipídios de membrana pode oferecer uma proteção contra o ataque peroxidativo, diminuindo desta forma, aumentos nos níveis de MDA. Assim, o grupo exposto apresentou ao mesmo tempo níveis significativamente menores de vitamina E e maiores de MDA. Sabe-se que o tempo de vida longo e a alta reatividade dos produtos da peroxidação lipídica, permitem a estas moléculas agir tanto dentro quanto fora das células, interagindo com outras biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas (Del Rio, 2005). Deste modo, os níveis de vitamina E, tendem a impedir a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas, justificando a correlação negativa também, entre os níveis de vitamina E e PCO ($p < 0,01$).

As alterações encontradas nos parâmetros do estresse oxidativo juntamente com os níveis normais de metabólitos dos solventes orgânicos encontrados na urina dos pintores sugerem que distúrbios no sistema antioxidante poderiam ser úteis indicadores da susceptibilidade aos radicais livres, apesar do baixo nível de metabólitos de exposição aos solventes orgânicos. Além disso, corroborando esta hipótese, a correlação negativa entre os valores de ácido mandélico e vitamina E ($p < 0,05$), bem como a correlação positiva entre ácido hipúrico e atividade da GPx ($p < 0,01$) sugerindo que exposição aos solventes orgânicos induziu a perturbação no estado antioxidante. Poderíamos especular que antioxidantes exógenos (vitamina E) foram consumidos para neutralizar os radicais livres gerados por solventes orgânicos, e que a atividade da GPx foi aumentada como uma resposta à defesa

contra o estresse oxidativo. No entanto, este aumento de atividade da GPx não protegeu contra o estresse oxidativo como demonstrado pelo aumento da oxidação dos lipídeos e proteínas nos trabalhadores expostos.

Os danos observados em macromoléculas biológicas poderiam sugerir a toxicidade dos compostos. Por esta razão, o acompanhamento de alguns biomarcadores do estresse oxidativo pode dar informações sobre o envolvimento deste tipo de dano no mecanismo toxicológico dos xenobióticos (Suleiman, 1987; Stickney, 1989; Mattia, 1993).

Perturbações nos sistemas antioxidantes podem ser úteis para decidir sobre iniciar uma suplementação com antioxidantes, a fim de evitar danos oxidativos e avaliar a eficácia deste tipo de medicamentos.

Os resultados permitem sugerir que pintores representam um grupo de risco aos efeitos toxicológicos provocados pelo aumento do estresse oxidativo e exames complementares, como biomarcadores do estresse, poderiam ser clinicamente importantes. Mesmo expostos a baixas concentrações é necessário reduzir os efeitos nocivos da exposição ocupacional a agentes tóxicos. Alterações significativas nos níveis dos antioxidantes nos trabalhadores expostos sugerem o aumento de espécies reativas e, a sua ineficiência em combatê-las, demonstrado pela oxidação de proteínas e peroxidação lipídica. Assim, este processo está envolvido na patogênese da toxicidade crônica com misturas de solventes orgânicos presentes nas tintas. Assim, este estudo representa um passo à frente na investigação e vigilância à saúde ocupacional.

5 CONCLUSÕES

Um método analítico para quantificar simultaneamente o ácido hipúrico, o ácido 3-metilhipúrico, o ácido mandélico e o ácido fenilglioílico em urina por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta foi otimizado e através dos parâmetros de validação encontrados é possível inferir que se trata de um método confiável, reprodutível e exeqüível.

Trabalhadores expostos ocupacionalmente a tintas apresentaram os IBE para os solventes tolueno, xileno, estireno e etilbenzeno, porém todos estavam abaixo dos IBMP. Os indivíduos não expostos apresentaram somente o ácido hipúrico e os níveis encontraram-se abaixo dos valores de referência. Trabalhadores expostos aos solventes apresentaram aumento do sistema antioxidante endógeno quantificado através do aumento da SOD, CAT, GPx e GSH. Por outro lado, os antioxidantes exógenos, verificados pela quantificação das vitaminas C e E séricas demonstraram diminuição deste sistema comparado ao grupo de indivíduos não expostos.

Os trabalhadores expostos ocupacionalmente a tintas apresentaram os IBE para solventes orgânicos abaixo dos IBMP, porém demonstraram um aumento do estresse oxidativo, corroborado pelo aumento da oxidação de proteínas e de lipídeos. Assim, os resultados encontrados evidenciam o estresse oxidativo como um processo provavelmente envolvido no aparecimento e agravamento de doenças ocupacionais em longo prazo. E exposições a baixas concentrações destes xenobióticos não garantem proteção contra este desequilíbrio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-GHAMDI S. S. et al. Acute solvent exposure induced activation of cytochrome P450E1 causes proximal tubular cell necrosis by oxidative stress. **Toxicology in Vitro**. v. 17, p. 335-341, 2003.

ALI, A. S. Dermatoses Ocupacionais. In: MENDES, R ed. **Patologia do trabalho**. Rio de Janeiro, Editora Atheneu, p.139-72, 1995.

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

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH). Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais. Limites de Exposição para substâncias químicas e agentes físicos e índices biológicos de exposição. Trad. ABHO. 2003.

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

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

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

ANGERER J.; WULF H. Occupational chronic exposure to organic solvents.XI. Alkylbenzene exposure of varnish workers: Effects on hematopoietic system. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**. v. 56, p. 307-321, 1985.

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

ARMUTCU, F. et al. Vitamin E protects against acetone-induced oxidative stress in rat red blood cells. **Cell Biology and Toxicology**. v. 21, p. 53-60, 2005.

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

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

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry): Toxicological Profile for Styrene. Atlanta, GA: **Public Health Service**. 1993. Disponível em <<http://www.atsdr.cdc.gov>>.

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

AYLOTT, S.; PRASHER, D. Solvents impair balance in man. **Noise & Health**. v. 4, p. 63-71, 2002.

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

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 28, p. 1011-1040, 2002.

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

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, p. 856, 2002.

BAYDAS G. et al. Effects of thinner exposure on the expression pattern of neural cell adhesion molecules, level of lipid peroxidation in the brain and cognitive function in rats. **European Journal of Pharmacology**. 512, 2005.

BAYIL S. et al. Free radical and antioxidant enzyme levels at exposure of volatile organic compounds in workers. **Saudi Medical Journal**. v. 28, p. 290-1, 2007.

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

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

BERTONCELLO L. **Efeitos da exposição ocupacional a solventes orgânicos, no sistema auditivo**. Monografia de Conclusão do curso de especialização em Audiologia Clínica, Porto Alegre, 1999.

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

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

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.

BONITHON-KOPP C. et al. Combined effects of lipid peroxidation and antioxidant status on Carotid atherosclerosis in a population aged 59-71 y: The EVA Study. Etude sur le Vieillissement Arteriel. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 65, p. 121-7, 1997.

BONNES, T.; GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? **Biochemical Pharmacology**. v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Nr-7. In: Segurança e Medicina do Trabalho. 50 ed. 1994. Disponível em <http://www.mtb.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_07.asp>.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasil. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 de junho de 2003. Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.

BROUSSARD L. A. The role of the laboratory in detecting inhalant abuse. **Annals of Clinical and Laboratory Science**. v. 13, p. 205-209, 2000.

BULCÃO, R. et al. Simultaneous quantification of organic solvent biomarkers by high performance liquid chromatography. **Química Nova**. 2008 (*in press*).

BUSCHINELLI, J. T. P. Agentes químicos e intoxicações ocupacionais. In: **Saúde no trabalho: temas básicos para o profissional que cuida da saúde dos trabalhadores** (Ferreira Jr., M., org.), São Paulo: Roca. p.137-175, 2000.

BUTTERFIELD, D. A.; CASTEGNA, A. Proteomic analysis of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain: insights into neurodegeneration. **Cellular and Molecular Biology**. v. 49, p. 747-751, 2003.

CÂMARA, V. M.; GALVÃO, L. A. C. A patologia do trabalho numa perspectiva ambiental. In: MENDES, R ed. **Patologia do trabalho**. Rio de Janeiro, Editora Atheneu, p. 609-30, 1995.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analyses - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**. v. 689, p. 175-180, 1997.

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

CHAN, A. C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 71, n. 9, p. 725-731, 1993.

CHASIN, A. A. M. et al. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 11, p. 1-6, 1999.

CHEMINFO . Canadian Centre for Occupational Health and Safety. Xylene, styrene, carbon disulfide, toluene, carbon monoxide, lead, manganese. Centro de Vigilância Sanitária, 1997.

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

COSTA, M. F. B.; COSTA, M. A. F. Exposição ocupacional a compostos orgânicos voláteis na indústria naval. **Química Nova**. v. 25, 2002.

COSTA C. et al. In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin, **Toxicology in Vitro**, 2005.

CRUZAN C. G. et al. Chronic toxicity/oncogenicity study of styrene in CD rats by inhalation exposure for 104 weeks. **Toxicology Science**. v. 46, p. 266–281, 1998.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

DALLE-DONNE, I. et al. S-glutathionylation in human platelets by a thioldisulfide exchange-independent mechanism. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 38, p. 1501-1510, 2005a.

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

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**. v. 329, p. 23-38, 2003a.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **TRENDS in Molecular Medicine**. v. 9, n. 4, p.169-176, 2003b.

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

DAVIES, M. J. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in study of human disease. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 27, p. 1151–61, 1999.

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

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

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

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

DLUGOSZ, A.; SAWICKA, E.; MARCHEWKA, Z. Styrene and ethylene glycol have a synergetic effect on lipid peroxidation that is better protected than repaired by CoQ₁₀, **Toxicology in Vitro**. 19, 2005.

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

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

FARMAND, F. et al. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. **Environmental Research**. v. 98, p. 33-39, 2005.

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

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

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

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

FREI, B.; STOCKER, R.; AMES, B. N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 85, n. 24, p. 9748-9752, 1988.

FUMERON, C. et al. Effects of oral vitamin C supplementation on oxidative stress and inflammation status in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation**. v. 20, n. 9, p. 1874-1879, 2005.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. **Wills' biochemical basis of medicine**. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997. p. 196-202.

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

GRUNE, T. et al. Age related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. **The Journal of Gerontology. A, Biological Science and Medical Science**. v. 56, p. B459-B467, 2001.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 899, p. 136-47, 2000.

HALIFEOGCLU I.; CANATAN H.; USTUNDAG B. Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. **Cell Biochemistry Function**. v.18, p. 263-267, 2000.

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

HEINRICH-RAMM, R. et al. Biological monitoring for exposure to volatile organic compounds (VOCs). **Pure Applied Chemistry**. v. 72, p. 385, 2000.

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

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of Analytical Procedures: methodology. **ICH Steering Committee**, 1995.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Text on Validation of Analytical Procedures. **ICH Steering Committee**, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INOUE O. et al. Possible ethnic difference in toluene metabolism: a comparative study among Chinese, Turkish and Japanese solvent workers. **Toxicology Letters**. v. 34, p. 167-174, 1986.

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

JOHNSON, A. C.; NYLÉN, P. R. Effects of industrial solvent on hearing. **Occupational Medicine**. v. 10, p. 623-40, 1995.

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

KARAGÖZLER, A. A.; MEHMET N.; BATCIOGLU K. Effects of long-term solvent exposure on blood cytokine levels and antioxidant enzyme activities in house painters. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**. v. 65, p. 1237-1246, 2002.

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

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

LASHERAS, C. et al. Independent and interactive association of blood antioxidants and oxidative damage in elderly people. **Free Radical Research**. v. 36, p. 875-882, 2002.

LAFFON B.; LEMA M.; MÉNDEZ J. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids as indirect evaluation of styrene exposure, **Journal of Chromatography B**. v. 753, p. 385-93, 2001.

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

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

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

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

LINHART I. et al. The evidence for conjugated mandelic acid and phenylglyoxylic acids in the urine of rats dosed with styrene. **Toxicology Letters**. v. 90, 1997.

LOF A. et al. Toxicokinetics of styrene biotransformation and covalent binding. **Arbete Och Halsa**. v. 6, p. 7-87, 1986.

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

MANINI P. et al. Liquid chromatography-mass spectrometry in occupational toxicology: A novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals, **Journal of Chromatography A**. v. 1058, 2004.

MATES J. M.; PEREZ-GOMEZ C.; NUNEZ DE CASTRO I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**. v.32, p. 595-603, 1999.

MATTIA C. J.; LEBEL C. P.; BONDY S. C. Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. **Biochemical Pharmacology**. v. 42, p. 879-82, 1991.

MATTIA C. J.; ADAMS J. D.; BONDY S. C. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. **Biochemical Pharmacology**. v. 46, p. 103-10, 1993.

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

MARCZYNSKI B.; PEEL M.; BAUR X. New aspects in genotoxic risk assessment of styrene exposure – a working hypothesis. **Medical Hypotheses**, 2000.

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

MORAES. A C.L. et al. A Saúde na Gestão Ambiental, **Petrobras**, 2003

MORATA, T. C. et al. Auditory and Vestibular functions after single or combined exposure to toluene: a review. **Archives of Toxicology**. v. 69, p. 431-443, 1995.

MORATA, T.; CAMPO, P. Ototoxic effects of styrene alone or in concert with other agents: a review. **Noise & Health**. v. 14, p. 15-24, 2002.

MICHEL, O. R. **Toxicologia Ocupacional**. Editora Revinter. Rio de Janeiro. 2000.

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

NORDBERG J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOZAL, M. J. et al. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column

derivatization with 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). **Journal of Chromatography A**. v. 778, n. 1-2, p. 347-353, 1997.

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

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

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

OHASHI Y. et al. Simultaneous determination of urinary hippuric acid, *o*-, *m*- and *p*-methylhippuric acids, mandelic acid and phenylglyoxylic acid for biomonitoring of volatile organic compounds by gas chromatography–mass spectrometry **Analytica Chimica Acta**. v. 566, p. 167-171, 2006.

PHILLIPS, M. et al. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. **Lancet**. v. 353, p. 1930-3, 1999.

POLIDORI, M. C. Antioxidant micronutrients in the prevention of age-related diseases. **Journal of Postgraduate Medicine**. v. 49, n. 3, p. 229-235, 2003

POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**. Oxford, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em eluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**. v. 1, p. 68-76, 2001.

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

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, p. 771, 2004.

ROY, P.; KULKARNI, A. P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology**. v. 34, n.6, p. 563-570, 1996.

SANTOS JÚNIOR, E. A. et al. Condições de Risco de Natureza Química. In: **Patologia do trabalho**. (Mendes, R.), p. 325-514, Rio de Janeiro. Atheneu. 2003.

SERRON, S. C.; DWIVEDI, N.; BACKES, W. L. Ethylbenzene Induces Microsomal Oxygen Free Radical Generation: Antibody-Directed Characterization of the Responsible Cytochrome P450 Enzymes. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 164, p. 305-311, 2002.

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

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

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

STADTMAN, E. R.; BERLETT, B. S. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 266, p. 17201-17211, 1991.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**. v. 25, p. 207-218, 2003.

STAMPFER, M. J.; RIMM, E. B. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 62, p. 1365-1369, 1995

SIVAPRASAD, R; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Combine efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v 15, p. 18-23, 2004.

STICKNEY J. A. et al. The effect of m-xylene on rat lung benzol[α]pyrene metabolism and microsomal membrane lipids: comparison with p-xylene. **Toxicology**. v. 58, p.155-65, 1989.

SULEIMAN S. A. Petroleum hydrocarbon toxicity in vitro. Effects of n-alkanes, benzene and toluene on pulmonary alveolar macrophages and lysosomal enzymes of the lung. **Archives of Toxicology**. v. 59, p. 402-7, 1987.

THEROND P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Current Opinion in Clinical Nutritional Metabolism Care**. v. 3, p. 373–384, 2000.

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.

THOMPSON, M. et al. Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement. **Pure & Applied Chemistry**. v. 71, p. 337, 1999.

UCHIDA, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 28, p. 1685-96, 2000.

ULAKOGLU E. A. et al. Alterations in superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: relationship between histopathological properties. **Pharmacological Research**. v. 38, p. 209-14, 1998.

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

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

XIAO J. Q.; LEVIN S. M. The diagnosis and management of solvent-related disorders, **American Journal of Industrial Medicine**. v. 37, p. 44-61, 2000.

WITZUM, J.L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**. London, v.344, n.8926, p.793-795, 1994.

7 ANEXOS

ANEXO A – Comprovante do aceite do artigo “Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência” à Revista *Química Nova*.

Editoria SBQ <sbqedit@iq.usp.br> escreveu:

Prezada Profa. Solange C. Garcia,

Comunicamos a V. Sa. que seu manuscrito Quantificação simultânea de indicadores..., QN 239/07, foi aceito para publicação na revista Química Nova.

Aproveitamos a oportunidade para informar que, quando estiver previsto para ser publicado, enviaremos por e-mail a prova tipográfica para ser corrigida.

No momento, temos uma demora média de 7 meses entre a data de aceite e a de publicação na versão impressa da revista.

Atenciosamente,
Pricila Gil
gerente editorial

ANEXO B – Comprovante da submissão do manuscrito “The effects of paint solvents exposure on blood biomarkers of oxidative stress in workers” à Revista *International Archives of Occupational and Environmental Health*.

Dear PhD Solange Cristina Garcia,

Thank you for submitting your manuscript,
"The effects of paint solvents exposure on blood biomarkers of oxidative stress in workers", to International Archives of Occupational and Environmental Health

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,,
 data de nascimento/..../....., sexo, R.G:....., fui convidado(a) pela profa. Dra. Solange Cristina Garcia a fazer parte de um trabalho científico intitulado **“Indicadores biológicos de exposição e a sua inter-relação com o estresse oxidativo”**.

Neste trabalho serão realizados exames que não costumam ser feitos nos laboratórios de análises clínicas, com o objetivo de avaliar os níveis (medir) dos antioxidantes (substâncias capazes de impedir a ação dos radicais livres, que podem causar doenças). Além dos indicadores biológicos de exposição aos solventes, tolueno, xileno e estireno (a pessoa que está exposta a algum tipo de solvente elimina este indicador na urina e este será quantificado no laboratório). Serão necessárias amostras de urina (30mL) e sangue (10mL), coletadas pós-jornada de trabalho (após 5 ou mais horas no ambiente de trabalho). Além destes exames serão realizadas entrevistas com questionários sobre o uso de medicamentos e o estado de saúde dos indivíduos. Isto será necessário para a realização de um trabalho de pesquisa de mestrado, onde será avaliado o nível de exposição aos solventes e a relação com o estresse oxidativo, já que não existem estudos na literatura. Fui esclarecido que minha participação é de livre e espontânea vontade e que caso aceite, será realizada uma coleta de 10 mL de sangue venoso, com o mínimo de risco já conhecido para esta técnica sem custo para o doador, além de uma amostra de ± 30 mL de urina.

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

Eu terei garantia de não identificação e de caráter confidencial dos resultados. Terei garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca de procedimentos, riscos, benefícios, etc, contatando a professora Dra. Solange Cristina Garcia, telefone (55) 9614-0553 ou no Laboratório de Toxicologia pelo fone (55) 3220-8941.

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

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

Santa Maria, novembro de 2006.

 Assinatura do paciente ou responsável

 Assinatura do responsável pela pesquisa