



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DOS GASES
DERIVADOS DO PETRÓLEO EM TRABALHADORES
EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE EM AMBIENTE
FECHADO**

ANA ELIZABETH OLIVEIRA DE ARAÚJO

Dissertação apresentada ao curso de
pós-graduação em Patologia
Molecular da UnB como requisito
parcial para obtenção do título de
mestre.

Fevereiro-2008.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DOS GASES
DERIVADOS DO PETRÓLEO EM TRABALHADORES
EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE EM AMBIENTES
FECHADOS**

ANA ELIZABETH OLIVEIRA DE ARAÚJO

Orientador: Profº Dr. Cesar Koppe Grisolia

Dissertação apresentada ao curso de
pós-graduação em Patologia
Molecular da UnB como requisito
parcial para obtenção do título de
mestre.

Fevereiro-2008.

FICHA CATALOGRÁFICA

{ SHAPE * MERGEFORMAT }



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Dissertação de Mestrado

ANA ELIZABETH OLIVEIRA DE ARAÚJO

Título:

**Avaliação da Genotoxicidade dos Gases Derivados do Petróleo em Trabalhadores
Expostos Ocupacionalmente em Ambientes Fechados.**

{PAGE }

Comissão examinadora:

Prof.º Dr. Cesar Koppe Grisolia
Presidente/Orientador
UnB

Prof.ª Dra. Eloísa Dutra Caldas
Membro titular
UnB

Prof.ª Dra. Ildinete Silva Pereira
Membro titular
UnB

Prof.ª Dra. Zulmira Guerrero Marques Locava
Suplente
UnB

Brasília, 28 de fevereiro de 2008.

**Dedico este trabalho a
minha amada mãe, Elza,
pois sempre foi meu
exemplo de perseverança,
lutas e conquistas.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande mestre, Jesus Cristo, que me deu a oportunidade de estar aqui.

A Nossa Senhora Rainha da Paz, minha intercessora e bondosa mãe.

Ao meu grande mestre terreno, Cesar Koppe, por ter me ensinado a fazer Ciência para a humanidade. A sua amizade, companheirismo, paciência, conhecimento, humildade, competência. Obrigado por ter me dado à oportunidade de ter sido sua aluna e de compartilhar momentos inesquecíveis.

Aos meus pais, Elza Oliveira e Antonio Botelho, por ter me dado à oportunidade de estudar nos melhores colégios e por ter investido na minha formação. Obrigado por ter acreditado na minha capacidade.

Ao meu marido, que de sua maneira, contribuiu com o meu trabalho, me tranquilizando com a rotina do dia-a-dia.

À minha filha, Maria Eduarda, que inconscientemente participou de várias fases desse caminho percorrido. Essa “pequeninha” que passou a ser a razão do meu viver.

A toda minha família, irmãos Leonardo e Eltoni, Maria Luíza, Nina, que brincaram com Maria enquanto estava no laboratório.

À minha querida sogra, que de sogra não tem nada, pelos seus deliciosos bolos. A Ana Paula, tia e madrinha da Maria, que inúmeras vezes ficou com ela enquanto trabalhava.

A todos os colegas de laboratório, pois temos uma nova família. Principalmente a Bélin, que me ajudou a terminar as análises, e a Isabel, a luz da bioestatística dos nossos trabalhos. A Professora Silviene, que aceitou a ser a Presidente da banca, devido à ausência do Professor Cesar.

À Cinthia, que foi nosso elo entre o Laboratório de Genética e a ANP. A querida Ana Luisa, companheira de muitas jornadas. À Penha, pelas suas palavras doces. E da nossa amiga Elisa, por toda sua paciência e dedicação.

Aos 21 trabalhadores da ANP que concordaram em participar do projeto. Aos meus amigos do Ministério da Saúde, que aceitaram participar como controles, mesmo com as temíveis picadinhas das coletas. Não posso esquecer da minha supervisora Luciana e coordenador Ademar, que me ajudaram a cumprir os créditos do mestrado, e a Fê Conde, pelas noites no laboratório que passamos juntas.

Ao Dr. Luiz Carlos Gomes Amorim que me forneceu às requisições médicas dos hemogramas. A Dra. Sandra Maria de Andrade Oliveira que também me ajudou com as requisições e nas dúvidas com o sistema imunológico. A Dra. Íris Ferrari, pois sua contribuição foi fundamental para a realização deste projeto.

À Universidade de Brasília, ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina. Aos professores da banca examinadora, que aceitaram avaliar o meu trabalho. A todos que participaram indiretamente dessa conquista.

ÍNDICE

Lista de tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução Geral.....	02
2. Objetivo.....	04
3. Revisão da Literatura.....	05
3.1. Agência Nacional do Petróleo.....	06

3.2. Substâncias voláteis emitidas durante a avaliação da qualidade dos combustíveis.....	08
3.3. Exposição ocupacional aos derivados de petróleo.....	12
4. Materiais e Métodos.....	26
4.1. Avaliação das aberrações cromossômicas em linfócitos humanos.....	28
4.2. Análise de micronúcleos em células esfoliadas da bexiga urinária.....	29
4.3. Caracterização do ambiente de trabalho.....	30
4.4. Análise estatística.....	33
5. Resultados.....	35
5.1. Caracterização da amostra.....	36
5.2. Resultados da pesquisa de aberrações cromossômicas.....	38
5.3. Resultados das análises de micronúcleos.....	42
5.4. Resultados da análise de correlação, obtido através do teste de Spearmam, coeficiente (<i>r</i>)	45
5.5. Resultados dos exames hematológicos.....	47
6. Discussão.....	48
7. Conclusões.....	54
8. Recomendações.....	56
9. Referências Bibliográficas.....	58
10. Anexos.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados extraídos dos questionários preenchidos pelos indivíduos: (a) expostos, onde a cor azul indica os trabalhadores empregados desde 1999/2000 e a cor verde, os trabalhadores empregados desde 2005; (b) controles.

Tabela 2. Aberrações cromossômicas encontradas nos linfócitos dos indivíduos: (a) expostos, onde a cor azul indica os trabalhadores empregados desde 1999/2000 e a cor verde, os trabalhadores empregados desde 2005; (b) controles.

Tabela 3. Cálculos estatísticos básicos do número de aberrações cromossômicas encontradas nos linfócitos dos indivíduos expostos e controles.

Tabela 4. Micronúcleos encontrados nas células esfoliadas da bexiga urinária extraídas da urina dos indivíduos expostos e controles. A cor azul indica os funcionários empregados desde 1999/2000, e a cor verde, funcionários empregados desde 2005.

Tabela 5. Cálculos estatísticos básicos do número de micronúcleos encontrados nas células da bexiga urinária extraídas da urina dos indivíduos expostos e controles.

Tabela 6. Avaliação dos resultados dos exames hematológicos realizados pelos indivíduos expostos e controles, concomitante com a coleta do material sanguíneo para análise das aberrações cromossômicas. Valores com a média e desvio padrão das hemácias, série leucocitária e plaquetária.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto do Laboratório de Referência para Qualidade de Combustíveis da ANP, em Brasília-DF, retirado do site { HYPERLINK "<http://www.anp.gov.br>" } (acesso em novembro de 2005): (a) sala de cromatografia e (b) sala de motores.

Figura 2. Número de análises de combustíveis realizados pelos Laboratórios de Referência-CEPAT em todo território nacional. NT é o número total de amostras e NC,

amostras em não-conformidade com os padrões de qualidade. Figura retirado do site { HYPERLINK "http://www.anp.gov.br" }, atualizado em 14/01/2008.

Figura 3. Fórmulas químicas dos compostos da fração BTX: (a) benzeno, (b) tolueno e (c) xileno (Solomons & Fryhle, 2003).

Figura 4. Biotransformação do benzeno (em Bermond & Tose, 2000).

Figura 5: Papel do CYP450 e peroxidases na ativação do benzeno a intermediários mielotóxicos (em Bermond & Tose, 2000).

Figura 6. Falha ou *gap* cromatídica (em destaque) encontrada em uma célula metafásica de um dos indivíduos expostos avaliados. Lâmina corada com Giemsa analisada com óleo de imersão em objetiva de 100X.

Figura 7. Média do número de aberrações cromossômicas encontradas nos linfócitos dos indivíduos expostos e controles. A barra representa o erro padrão. Figura projetada no Excel 2003.

Figura 8. Micronúcleos (setas) encontrados em células da bexiga urinária extraídas da urina de um dos indivíduos expostos avaliados. Lâmina corada com Giemsa analisada com óleo de imersão em objetiva de 100X.

Figura 9. Média do número de micronúcleos encontrados nas células da bexiga urinária extraídas da urina dos indivíduos expostos e controles. A barra representa o erro padrão. Figura projetada no Excel 2003.

Figura 10. Correlação de Spearman (r) realizada entre a frequência das aberrações cromossômicas encontradas nos linfócitos dos indivíduos expostos e controles; e a frequência do número de micronúcleos encontrados nas células da bexiga urinária da urina dos indivíduos expostos e controles. O valor do Coeficiente de correlação encontrado foi 0,74, dita como uma correlação forte.

RESUMO

Os gases derivados do petróleo são conhecidos por causar danos à saúde das pessoas expostas ocupacionalmente, de modo crônico ou agudo. Funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade dos Combustíveis, da Agência Nacional do Petróleo-ANP, situada em Brasília (Brasil), estão expostos a várias substâncias químicas, pois realizam análises para o controle de qualidade nas amostras dos

combustíveis coletadas nos 306 postos de abastecimento do Distrito federal. Os monitoramentos citogenéticos desses trabalhadores foram realizados nos linfócitos retirados do sangue periférico e nas células esfoliadas da bexiga, extraídas da urina. A frequência de aberrações cromossômicas nos linfócitos e a quantidade de micronúcleos nas células esfoliadas da bexiga foram utilizadas como biomarcadores para analisar o risco genotóxico. Como resultado, observamos aumentos significantes desses biomarcadores, tanto no sangue como na urina, indicando que a exposição ocupacional aos derivados do petróleo pode estar envolvida nessas alterações citogenéticas encontradas. Dentre todas as substâncias presentes no petróleo e seus derivados, a fração benzeno, tolueno e xileno (BTX) é bastante volátil e toxicologicamente mais perigosa ao homem, com riscos conhecidos de carcinogênese. Observou-se também uma correlação direta entre o número de aberrações cromossômicas e a frequência de micronúcleo no grupo exposto ($r = 0,74$).

ABSTRACT

It is well-known that vapours from petroleum derivatives, specially aromatic compounds such as benzene, toluene and xylene, known as BTX fraction can be hazardous to human health. Chronic and acute exposure to petroleum derivative vapours are associated with several haematological disturbances. This study was carried out in a group of 21 individuals occupationally exposed to petroleum derivative vapours in a

Laboratory of Quality Control from the Brazilian government. Blood and urine samples were used to analyse chromosome aberration in lymphocytes cells and micronuclei in exfoliated cells from urinary bladder respectively. These results were compared with a control group of 10 non-exposed individuals working in office.

Chromosome aberrations and micronuclei frequencies were statistically increased ($P < 0.05$) in the exposed group. A positive relationship was found between chromosome aberration and micronuclei in the exposed group ($r = 0,74$).

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Agência Nacional de Petróleo é uma autarquia do Governo federal que regulamenta e fiscaliza todos os derivados do petróleo, combustíveis ou não. O Programa de Controle de Qualidade dos Combustíveis foi iniciado em 1999, e devido a extensão territorial, o centro de qualidade foi descentralizado para garantir uma fiscalização nacional ({ HYPERLINK "http://www.anp.gov.br" }, acesso em novembro de 2005).

A exposição ocupacional aos derivados do petróleo, como formaldeído, óxido propileno, benzeno e outros compostos orgânicos, podem provocar efeitos adversos à saúde. A fração benzeno, tolueno e xileno (BTX) é a principal responsável pelos danos à saúde, principalmente devido aos distúrbios hematológicos (Zhang *et al*, 1999, Boogaard *et al*, 1999, Shahan *et al*, 2002).

O monitoramento citogenético é utilizado para avaliar os riscos ocupacionais que não são observados nos exames clínicos rotineiros e de laboratório. Li *et al* (2006) observaram que em casos de exposições crônicas consideráveis ou em intoxicações ao benzeno, por exemplo, as alterações na medula óssea são imediatas. Portanto, os monitoramentos citogenéticos em ambientes de baixas concentrações e freqüentes exposições são importantes para se determinar riscos possíveis de carcinogenicidade, antes que os danos no DNA se tornem irreversíveis. Nesse tipo de atividade o principal risco de exposição é aquele associado à fração BTX. Sendo muito volátil e reconhecidamente tóxica ao homem, por mais que se cumpram as normas de segurança, com o uso de equipamentos de proteção individual, o risco de exposição é permanente. Sabe-se que há uma associação entre o aumento de danos no DNA com o aumento do risco para o câncer (Ames *et al*, 1975) e dessa forma torna-se importante o monitoramento citogenético em indivíduos expostos ocupacionalmente ou acidentalmente, às substâncias tóxicas que apresentam riscos de carcinogenicidade.

2. OBJETIVO

- Avaliação do potencial genotóxico da exposição ocupacional aos derivados do petróleo em trabalhadores do laboratório de controle de qualidade de combustíveis, da Agência Nacional do Petróleo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Agência Nacional do Petróleo

A Agência Nacional do Petróleo (ANP) é uma autarquia integrante da Administração Pública Federal, vinculada ao Ministério de Minas e Energia, que tem por finalidade promover a regulação, a contratação e a fiscalização das atividades econômicas integrantes da indústria do petróleo, de acordo com o estabelecido na { HYPERLINK "http://200.179.25.133/NXT/gateway.dll/leg/leis/1997/lei%209.478%20-%201997.xml?f=templates\$fn=default.htm&sync=1&vid=anp:10.1048/enu" \t "_blank" }, de 06/08/97, regulamentada pelo { HYPERLINK "http://200.179.25.133/NXT/gateway.dll/leg/decretos/1998/dec%202.455%20-%201998.xml?f=templates\$fn=default.htm&sync=1&vid=anp:10.1048/enu" \t "_blank" }, de 14/01/98 ({ HYPERLINK "http://www.anp.gov.br" }, acesso em novembro de 2005).

O Laboratório de Referência para Qualidade de Combustíveis da ANP (Figura 1), subordinado à Superintendência de Qualidade de Produtos, apóia as ações de fiscalização e colabora com a consistência técnica do Programa de Monitoramento da Qualidade de Combustíveis-PMQC ({ HYPERLINK "http://www.anp.gov.br" }, acesso em novembro de 2005).

{ INCLUDEPICTURE

"http://www.anp.gov.br/petro/images/cepat1.jpg" *

MERGEFORMATINET } { INCLUDEPICTURE

"http://www.anp.gov.br/petro/images/cepat2.jpg" *

MERGEFORMATINET }

a

b

Figura 1. Foto do Laboratório de Referência para Qualidade de Combustíveis da ANP, em Brasília-DF, retirado do site { HYPERLINK "<http://www.anp.gov.br>" } (acesso em novembro de 2005): (a) sala de cromatografia e (b) sala de motores.

Os óleos, graxas e aditivos em frascos para óleos lubrificantes de aplicação automotiva, comercializados no País, são obrigados a ter registro prévio na ANP. O Laboratório de Referência avalia as solicitações, que após análise autoriza ou não a comercialização do produto de origem mineral, vegetal ou sintética, em todo o território nacional ({ HYPERLINK "<http://www.anp.gov.br>" }, acesso em novembro de 2005).

O Programa de Monitoramento da Qualidade de Combustíveis da ANP foi iniciado no segundo semestre de 1999. No entanto, em razão das dimensões nacionais e da impossibilidade de avaliar a qualidade dos combustíveis num único laboratório, a ANP mantém convênio com mais de 23 instituições que atuam hoje no monitoramento da qualidade dos combustíveis brasileiros (Anexo 1). Em 2007, foram analisadas 169.052 amostras de combustíveis para controle de qualidade pelo CEPAT- Centro de Pesquisa e Análise Tecnológica em todo território nacional (Figura 2) ({ HYPERLINK "<http://www.anp.gov.br>" }, atualizado em 14/01/2007).

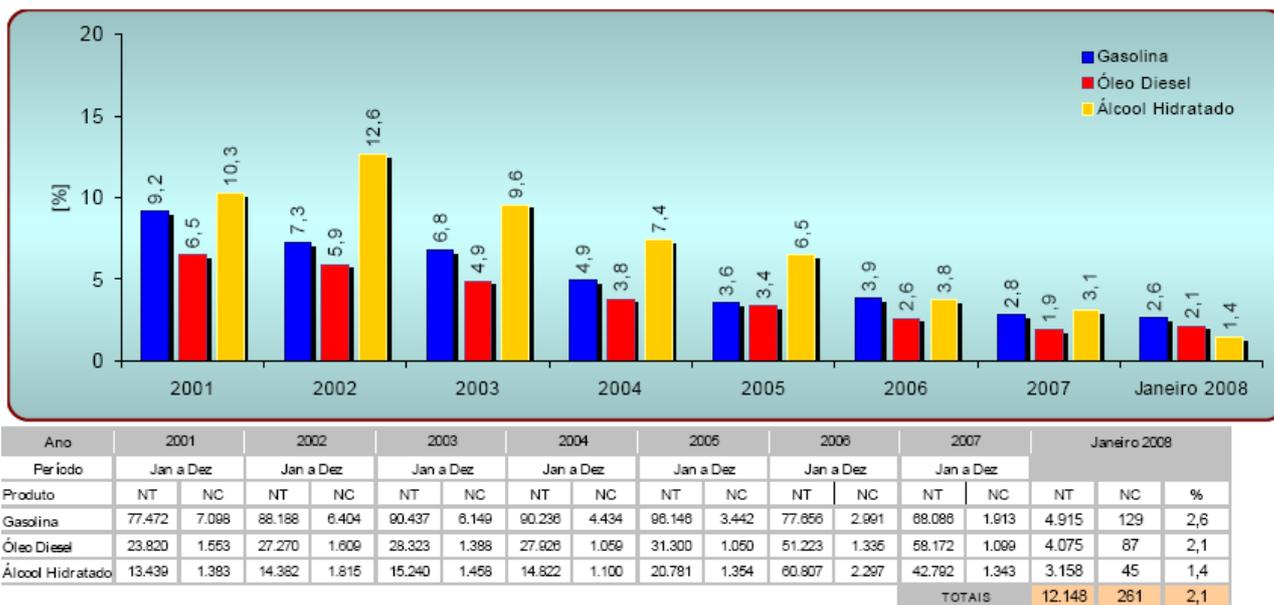


Figura 2. Número de análises de combustíveis realizados pelos Laboratórios de Referência-CEPAT em todo território nacional. NT é o número total de amostras e NC, amostras em não-conformidade com os padrões de qualidade. Figura retirado do site { [HYPERLINK "http://www.anp.gov.br"](http://www.anp.gov.br) }, atualizado em 14/01/2008.

No Distrito Federal, estão cadastrados 306 postos de abastecimentos de combustíveis e 2105 amostras são anualmente analisadas pelos técnicos do laboratório da ANP em Brasília ({ [HYPERLINK "http://www.anp.gov.br"](http://www.anp.gov.br) }, atualizado em 14/01/2007).

3.2. Substâncias voláteis emitidas durante a avaliação da qualidade dos combustíveis

No processamento das amostras de combustíveis nos Laboratórios de Referência para Controle de Qualidade, são liberados gases, que contém compostos como tolueno, xileno e benzeno (fração BTX), formaldeído, etileno, óxido propileno,

benzo[a]pireno, tricloroetileno e outros componentes orgânicos. Alguns desses gases também são produzidos na destilação das unidades aromáticas de petróleo e são usados como material para produtos petroquímicos (Roma-Torres *et al*, 2005).

São derivados do petróleo a { [HYPERLINK "http://pt.wikipedia.org/wiki/Gasolina"](http://pt.wikipedia.org/wiki/Gasolina) \o "Gasolina" }, { [HYPERLINK "http://pt.wikipedia.org/wiki/Alcatr%C3%A3o"](http://pt.wikipedia.org/wiki/Alcatr%C3%A3o) \o "Alcatrão" }, produtos asfálticos, querosene, solventes, óleos combustíveis, óleos lubrificantes, combustível de aviação, etc. Alguns desses compostos foram classificados pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*), como substâncias nocivas à saúde, carcinógenas ou poluentes ambientais. Nos combustíveis comercializados, se encontram a fração BTX (Figura 3) e outros compostos orgânicos voláteis (Zhou *et al.*,1986; Santos-Mello & Cavalcanti, 1992; Farmer, 1999).

As substâncias químicas carcinogênicas são substâncias que foram descritas como capazes de induzir o crescimento anormal ou descontrolado de células em animais de laboratório ou em seres humanos, como carcinoma, tumor maligno com tendência a produzir metástase (EPA, 2000).

O tolueno (metilbenzeno) foi classificado como uma substância nociva, pois pode causar danos à saúde, mas em geral não provocam danos sérios imediatos. Somente em doses muito altas podem provocar a morte, o que é difícil acontecer em um ambiente de trabalho. É largamente usado como solvente por pintores, na fabricação de *tinners*, adesivos, tintas, colas, produtos de limpeza. Também é usado como aditivo em produtos cosmético, e como matéria-prima para produção de outros produtos (Roma-Torres *et al*, 2005). O tolueno está naturalmente presente no petróleo cru, e é obtido

através do seu refinamento como subproduto da produção de estireno (Anderson *et al*, 1985).

O xileno (dimetilbenzeno) também é utilizado como solvente. Em forma de vapor, pode provocar irritação nos olhos, nariz e garganta. Se inalado, pode causar tontura, dificuldade respiratória ou perda da consciência. Se ingerido na forma líquida, pode causar vômito, náusea, e também perda da consciência. Não ocorre absorção dérmica. O principal grupo de exposição são os pintores, pois é um dos principais componentes das tintas (Roma-Torres *et al*, 2005).

Exposições ocupacionais crônicas ao tolueno e xileno foram associadas a efeitos adversos no sistema nervoso, fígado e rins (ATSDR, 2003; USEPA, 2004; NTP, 1999) (em Hinwood *et al*, 2007). No entanto, não apresentaram efeitos genotóxicos ou carcinógenos para humanos e animais em laboratório, e foram classificados pela IARC e pela ACGIH (Conferência Americana Governamental de Higienistas Industriais) como não carcinógeno humano, grupo D ou E (em Roma-Torres *et al*, 2005).

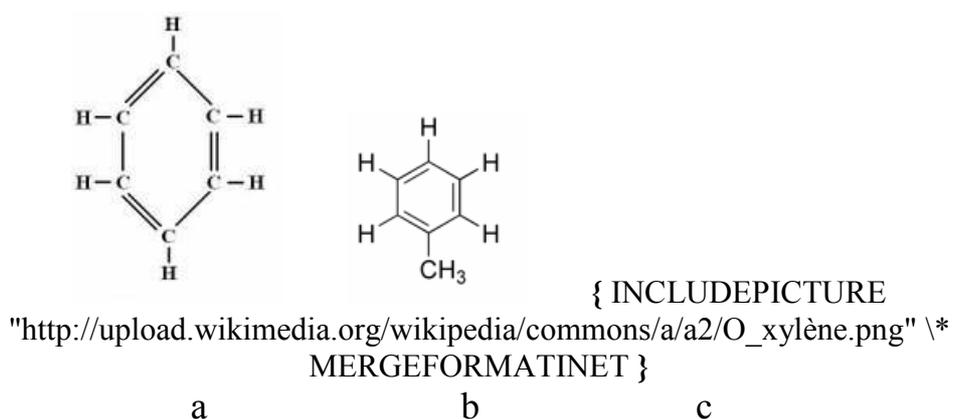


Figura 3: Fórmulas químicas dos compostos da fração BTX: (a) benzeno, (b) tolueno e (c) xileno (Solomons & Fryhle, 2003).

O formaldeído ou formol é um gás componente de exaustão de { HYPERLINK "<http://pt.wikipedia.org/wiki/Diesel>" \o "Diesel" }. Foi classificado pela ACGIH, como possível carcinógeno humano (ACGIH, 2001). O tricloroetileno (TCE) é usado em larga escala em processos industriais pela sua propriedade de dissolver graxas e gorduras. Noventa por cento desse produto é utilizado para operações de desengraxamento. É um hidrocarboneto não derivado do petróleo e muito utilizado pelos trabalhadores do CEPAT. Podem produzir efeitos no sistema nervoso, danos no fígado e no pulmão, arritmia cardíaca e outros sintomas. A IARC e a EPA tem este composto classificado no grupo 2B, provável carcinógeno humano (ATSDR, 2003).

Estudos *in vitro* mostraram que o benzo[a]pireno pode induzir danos em células procarióticas e eucarióticas, mas em células de mamíferos pode provocar efeitos genotóxicos variados, incluindo por exemplo, a formação de adutos de DNA (ligações de moléculas ao DNA), síntese de DNA não programada, entre outros. Compostos genotóxicos são aqueles com capacidade de induzir alterações no material genético de organismos a eles expostos. Ela pode se unir diretamente a ele ou atuar indiretamente afetando as enzimas ligadas a sua replicação ou reparo, levando a mutações que podem provocar o aparecimento de um câncer. No entanto, substâncias genotóxicas não são necessariamente cancerígenas (EPA, 2000).

Dentre as substâncias derivadas do petróleo, o benzeno é uma substância química potencialmente carcinogênica em humanos e a mais preocupante. Foi classificada pela Agência de Proteção Ambiental (EPA), pela ACGIH e a IARC, em 1982, como integrante do grupo A, reconhecido como carcinógeno humano (IARC, 1982). De acordo com a EPA (1996) as substâncias do grupo A, são os carcinógenos humanos comprovados. As classificadas como B1, B2 são os prováveis carcinógenos

humanos; C como possíveis carcinógenos humanos; D e E como não carcinógenos humanos.

No entanto, o benzeno não é um carcinógeno químico clássico. Há evidências que produz metabólitos altamente eletrofílicos com interação no DNA *in vivo* (Gowans et al, 2005). Os sintomas neurológicos em seres humanos associados ao benzeno incluem tonteira, dor de cabeça, e perda da consciência. A ingestão pode resultar em vômito, tonteira, convulsão e até mesmo óbito. Em forma de vapor pode irritar a pele, olhos e o trato respiratório superior. Estudos com animais mostraram efeitos neurológicos, imunológicos e hematológicos a partir de exposições orais e via inalatória (ATSDR, 2003).

Sua fórmula química é C_6H_6 , peso molecular 78,11 g/mol. Evapora rapidamente devido ao seu baixo ponto de ebulição (80,1° C). Altamente inflamável e lipossolúvel. Está presente na emissão e na evaporação do combustível automotivo. No entanto, o reconhecimento das características carcinogênicas do benzeno levou a restrição do uso (Roma-Torres *et al*, 2005).

No Brasil, a Portaria Interministerial nº 775 de 28/04/2004, resolve no seu artigo 1º: proibir, em todo o Território Nacional, a comercialização de produtos acabados que contenham "benzeno" em sua composição, admitida, porém, a presença desta substância, como agente contaminante, em percentual não superior a 1% (um por cento), em volume, até 30 de junho de 2004; não superior a 0,1% (zero vírgula um por cento), em volume, a partir de 1º de dezembro de 2007. Nos combustíveis derivados de petróleo é admitido um percentual não superior a 1% (um por cento), em volume ({ HYPERLINK "http://www.mte.gov.br" }, acesso em março de 2008).

A { HYPERLINK "http://www.toxikon.com.br/IN01.HTML" \l "INICIO" }, também proíbe a utilização do benzeno, a partir de 1º de janeiro de 1997, para qualquer emprego, exceto nas indústrias e laboratórios que o produzem, utilizam em processos de síntese química, empregam em combustíveis derivados de petróleo, em trabalhos de análise ou investigação realizados em laboratório, quando não for possível sua substituição, e na produção de álcool anidro ({ HYPERLINK "http://www.mte.gov.br" }, acesso em março de 2008).

3.3. Exposições ocupacionais aos derivados de petróleo

Pesquisando a literatura sobre exposição humana ocupacional a substâncias derivadas do petróleo, encontram-se vários artigos relacionados a estudos com trabalhadores em refinarias de petróleo, destiladores de benzeno em indústrias petroquímicas, atendentes de postos de combustíveis, motoristas profissionais (taxistas, motoristas de caminhão), policiais de trânsito, operadores de maquinarias de combustão interna, etc (IARC, 1987; Schnatter, 2000). Entretanto, todas essas exposições ocorrem em ambientes abertos.

Trabalhadores de refinarias de petróleo e plataformas petroquímicas são potencialmente expostos a uma larga taxa de hidrocarbonetos e substâncias químicas, como formaldeído, etileno, benzeno, óxido propileno e outros componentes orgânicos. Um aumento importante na incidência de aberrações cromossômicas nestes grupos expostos em comparação à população em geral foi observado (Roma-Torres *et al*, 2005).

No entanto, as exposições ao benzeno nas indústrias de petróleo e plataformas petroquímicas parecem ser relativamente baixas, pois estão instaladas em ambientes abertos. Brief *et al* (1980) estimaram que nas refinarias de petróleo, a probabilidade do nível de benzeno exceder 1 ppm (3,3 mg/m³) é menor do que 5%, e em plataformas petroquímicas, a probabilidade do nível de benzeno exceder 5 ppm (16.6 mg/m³) é menos do que 8%.

Setenta por cento das exposições do benzeno no meio ambiente provém da exaustão de combustíveis dos veículos (Farmer *et al*, 1999). Os gases emitidos pelos veículos que utilizam combustíveis derivados do petróleo podem conter até 100 diferentes tipos de hidrocarbonetos. Trinta trabalhadores expostos aos derivados do petróleo, em doze diferentes postos de abastecimento de combustíveis foram avaliados em Mersin, Turquia. A frequências de troca entre cromátides irmãs e aberrações cromossômicas estruturais e numéricas nos linfócitos periféricos foram investigadas neste grupo, comparados com 30 indivíduos controles não expostos. Também foram avaliados os níveis de fenol urinário dos trabalhadores expostos e controles. Importantes diferenças foram observadas no número de aberrações cromossômicas e no nível de fenol urinário. Além disso, o aumento do número de aberrações cromossômicas, nos linfócitos extraídos do sangue periférico desses indivíduos expostos, foram relacionados com o alto risco de câncer, como leucemias, linfomas e câncer de pulmão (Celik *et al*, 2003).

A exposição humana ocorre principalmente através da inalação do ar contaminado, incluindo também à fumaça de cigarros (ATSDR, 2003). As concentrações do benzeno e tolueno absorvidas pela pele e via inalatória foram analisadas em 70 funcionários de uma fábrica de sapatos na cidade de Tianjin, China.

As concentrações na pele foram medidas por meio de adesivos absorventes e a inalação, pelas concentrações de benzeno e tolueno urinário. As concentrações no ar de benzeno foram de 1.5 ppm e tolueno 7.5 ppm. Exposição dérmica significativa foi observada somente em relação ao tolueno. Nenhuma relação foi encontrada entre a absorção dérmica e as concentrações de benzeno e tolueno na urina. No entanto, as concentrações das substâncias no ambiente foram associadas com o nível das mesmas encontradas no material urinário (Vermeulen *et al*, 2006).

Estudos indicam que a absorção humana por inalação ao benzeno pode variar de 30 a 52%, pois dependente da concentração do benzeno no ambiente, período da exposição e da ventilação pulmonar (Kirkeleit *et al*, 2006).

No Brasil, foi realizada uma pesquisa para verificar a frequência de aberrações cromossômicas nos linfócitos de pessoas expostas a substâncias derivadas do petróleo, atendentes dos postos de abastecimento de combustíveis. Foi demonstrado que houve um aumento importante de quebras cromossômicas nos linfócitos dessas pessoas expostas, em relação ao grupo controle (Santos-Mello & Cavalcanti, 1992). Um estudo realizado em Roma, também avaliou atendentes de postos de abastecimento de combustíveis onde observou-se importante aumento na frequência de aberrações cromossômicas e de micronúcleo nos linfócitos periféricos (Clanfero *et al*, 1996).

Em relação aos óleos utilizados nos motores de veículos automotivos, um estudo realizado na Itália, verificou o potencial mutagênico dos hidrocarbonetos aromáticos, inclusive o benzeno, que faz parte da composição desses óleos automotivos. Concluiu-se que a combustão desses óleos colocava em risco a saúde dos motoristas, devido um importante aumento da frequência de aberrações cromossômicas encontradas nos linfócitos periféricos desses trabalhadores (Clanfero *et al*, 1996).

Em trabalhadores de manutenção de tanques de óleo, Kirkeleit *et al* (2006), compararam a concentração do benzeno do ar e a concentração de benzeno não metabolizado no sangue e na urina dos indivíduos expostos (12 horas de trabalho diário) e controles. Foram medidas as concentrações do benzeno durante três dias consecutivos, coletadas amostras de sangue e urina dos 13 trabalhadores de manutenção e de 9 pessoas não expostos (outra seção). Amostras foram coletadas antes do turno no primeiro dia, depois do turno no segundo dia e na manhã do terceiro dia. Os trabalhadores usavam máscaras de purificação de ar, mas nem todos os trabalhadores usavam sistematicamente. A média de benzeno no ar, nas áreas de exposição dos trabalhadores durante os três dias, foi de 0.15 ppm (0,5 mg/m³). A média de benzeno no sangue pós-turno foi de 12.3 nmol/l e na urina, 27.0 nmol/l. Nos controles, foram encontrados 0.7 nmol/l de benzeno em ambos sangue e urina. A concentração do benzeno no ambiente estava correlacionada com a concentração de benzeno no sangue e urina depois do turno, indicando que uso ou não da máscara, como equipamento de segurança individual, não modificou o padrão de absorção do benzeno. Os resultados mostraram que, apesar da baixa exposição ao benzeno neste ambiente de trabalho e o uso dos equipamentos de proteção individual, os trabalhadores dos tanques de óleo apresentaram uma importante taxa de benzeno nos fluidos corpóreos. Os níveis mais elevados de benzeno encontrados nas amostras foram atribuídos, provavelmente, ao extensivo horário de 12 horas consecutivas de trabalho.

Micilino *et al* (2002) estudaram a fumaça emitida durante o aquecimento e aplicação do betumem, usado para a pavimentação das ruas e rodovias (asfalto). Estes vapores contêm compostos aromáticos policíclicos. Em estudos prévios com roedores expostos ao betumem observou-se à formação de adultos de DNA. Os autores trabalharam com camundongos expostos ao betumem, através da inalação da fumaça

sob controladas condições. Foram expostos a uma concentração de 30 ppm (100 mg/m³), 6 horas diárias, por 5 dias. Depois de 30 dias, amostras dos pulmões foram retiradas e o DNA seqüenciado. Não foram observadas diferenças entre os animais expostos e controles.

Em novembro de 2002, um navio-tanque superpetroleiro, o *Pretigie*, se acidentou na costa da Galícia (Espanha) causando uma das maiores catástrofes ambientais marinha. Esse evento mobilizou um grande número de voluntários para limpar as praias, rochas e as aves contaminadas. Mais de 12.000 aves foram contaminadas, sendo que 9500 morreram e 2500 sobreviveram, pois foram levadas para um laboratório para serem descontaminadas. Os 34 voluntários envolvidos nesse procedimento laboratorial foram expostos à fração BTX, apesar do uso de todos os equipamentos de proteção individual, tais como máscaras, luvas, jaleco, óculos, etc. As exposições foram classificadas em baixa, menos de 150 h; média, entre 150 – 500 h; e alta, mais de 500 h. Verificou-se que os indivíduos expostos apresentaram importantes índices de danos no DNA, observados pelo teste do cometa, mas não houve indução de micronúcleos nos linfócitos em relação ao grupo controle. Verificaram também, uma correspondência entre o grau de genotoxicidade e o tempo de exposição (Laffon *et al*, 2006).

Estudos mostraram que as exposições ocupacionais em laboratórios com substâncias químicas induzem aberrações cromossômicas nos linfócitos. Oliveira-Martins e Grisolia (2007) demonstraram que a exposição dérmica de camundongos aos óleos lubrificantes de motores usados e re-refinados induziu micronúcleos nos reticulócitos. A análise da composição de tais óleos acusou a presença de compostos

poli-aromáticos, os quais são conhecidamente associados ao aumento do risco para o câncer.

Kim *et al* (2003) estudaram os efeitos genotóxicos dos compostos voláteis como tolueno, etil-benzeno e tricloroetileno em uma fábrica de filmes de PVC. As plantas *Tradescantia* foram usadas no biomonitoramento de genotoxicidade, e como resultado, os autores encontraram aumentos importantes nas frequências de micronúcleos nas células das inflorescências dessas plantas, que são muito usadas no biomonitoramento de genotoxicidade de ambientes fechados.

Martino-Roth *et al* (2002) estudando 60 empregados de oficinas mecânicas expostos aos subprodutos do petróleo encontraram aumento importante nas frequências de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa oral em relação ao grupo controle.

Chitra *et al* (2001) investigaram as frequências de aberrações cromossômicas em um grupo de 20 motoristas profissionais expostos aos gases das descargas de motores dos veículos. Ao comparar com o grupo controle de 20 indivíduos não expostos, verificaram níveis importantes de aberrações cromossômicas estruturais no grupo dos motoristas.

Entre as substâncias químicas tóxicas presentes no ar de um centro urbano, o benzeno é o mais considerável hematotóxico e que apresenta riscos leucemiogênicos. Quarenta e nove policiais do tráfego da cidade de Bologna, Itália, foram avaliados em relação ao um grupo de 36 trabalhadores internos não expostos (controles), através da análise de micronúcleos nos linfócitos periféricos e padrões hematológicos. A análise do ar revelou que a concentração do benzeno estava mais alta do que o limite permissível de 0,003 ppm ($10\mu\text{g}/\text{m}^3$ ou $0,01\text{ mg}/\text{m}^3$) para a cidade de Bologna e os

outros poluentes (óxido de nitrogênio, hidrocarbonetos aromáticos, monóxido de carbono) estavam dentro dos limites permitidos. A frequência de micronúcleos nos policiais não apresentou uma diferença importante em relação ao grupo controle, e também nenhuma alteração hematológica nos indivíduos foram observadas (Bolognese *et al*, 1996).

O extensivo uso do benzeno na indústria e no comércio levaram a um alto grau de exposição humana e considerável contaminação ambiental (Tice *et al*, 1980).

O limite de 100 ppm de exposição ocupacional ao benzeno foi proposto primeiramente em 1927. Os efeitos à saúde provocados pelos gases foram reconhecidos e as taxas de exposição foram reduzidas. Desde 1997 a recomendação da ACGIH para exposição ocupacional ao benzeno é de 0.5 ppm ou 1,6 mg/m³ (Roma-Torres *et al*, 2005). Em uma fábrica de borracha nos Estados Unidos, por exemplo, em 1960 a taxa de benzeno no ar chegou a 259 ppm ou 863,3 mg/m³ em um ambiente fechado (Li *et al*, 2006).

Em 1970, pesquisas de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos foram repetidamente estudadas em 32 sujeitos com histórico de intoxicação por exposição ocupacional ao benzeno, e 31 controles não-expostos. Observou-se um aumento importante do número de aberrações cromossômicas nos indivíduos expostos em relação aos controles. Todos os indivíduos intoxicados apresentaram alterações nas células da medula óssea (Forni, 1996).

Desde 1973, uma série de estudos epidemiológicos, moleculares e toxicológicos sobre o benzeno foi conduzida por pesquisadores da Academia Chinesa de Medicina Preventiva (CAPM), com a colaboração do Instituto Nacional do Câncer

(NCI) dos Estados Unidos, juntamente com as investigações realizadas pelas Universidades da Califórnia, Carolina do Norte, e Nova Iorque. Os resultados demonstraram que a incidência de linfomas e leucemias entre os trabalhadores expostos ao benzeno apresentou um aumento importante, não somente em exposições a altas concentrações de benzeno, mas entre trabalhadores expostos a concentrações menores que 10 ppm (Li *et al*, 2006).

O Ministério da Saúde da China, em 1978, organizou uma investigação em várias fábricas, em relação à exposição de trabalhadores ao benzeno e outras substâncias químicas. Quinhentos mil (500.000) trabalhadores foram expostos ao benzeno e seus derivados nessas fábricas. A média da concentração do benzeno encontrado em 19.969 fábricas foi de 5.5 ppm (18.3 mg/m³), e a prevalência de intoxicação chegou a 0.5%. Nesses grupos foram observados nove casos de anemia aplásica e nove casos de leucemia. Essas evidências mostraram que o benzeno pode causar neoplasia hematológica e desordens hematopoiéticas numa concentração de até 10 ppm (Li *et al*, 2006).

Em uma exposição ao benzeno abaixo de 2.5 ppm em uma plataforma petroquímica nos Estados Unidos, foram realizadas avaliações citogenéticas em 52 trabalhadores expostos, comparados com outros 44 empregados controles (não expostos). Observou-se um importante número de quebras cromossômicas em relação ao controle (Infante *et al*, 1983).

Um exemplo de monitoramento citogenético em ambientes fechados foi realizado no Brasil, na Universidade de Brasília. Os funcionários e os pesquisadores (professores e alunos) foram analisados citogeneticamente devido à exposição a uma grande variedade e quantidade de substâncias químicas. Os indivíduos expostos foram

comparados com os controles, mas nenhuma diferença importante foi observada entre eles. No entanto, o grupo de indivíduos do Laboratório de Genética mostrou importante aumento na frequência de aberrações cromossômicas estruturais do tipo falha, em relação aos outros laboratórios, como o Instituto de Química (Almeida-Santos *et al*, 2005). Testa *et al* (2002) também avaliaram técnicos de laboratórios de análises clínicas na Itália. Esses funcionários estavam expostos cronicamente a baixos níveis, a mais de 300 diferentes substâncias químicas, provenientes dos medicamentos e solventes. O grupo exposto, 50 indivíduos, apresentou aumento importante de danos citogenéticos (aberrações cromossômicas e micronúcleos nos linfócitos periféricos) em relação aos controles, 53 indivíduos não expostos.

Efeitos adversos à saúde podem estar associados com a exposição ocupacional ao benzeno em humanos. Está claro que o benzeno causa aberrações cromossômicas, troca entre cromátides irmãs e micronúcleo em linfócitos de trabalhadores expostos. Em adição as técnicas convencionais citogenéticas, o efeito genotóxico do benzeno foi também observado por uma técnica mais específica, a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), na qual utiliza sondas de DNA (Holecková *et al*, 2004).

Essas alterações podem aumentar os riscos do desenvolvimento de cânceres. Este tipo de resultado mostra que os grupos expostos apresentam maiores riscos de sofrer danos no DNA, e conseqüentemente aumentam a suscetibilidade aos processos carcinogênicos (Almeida-Santos *et al*, 2005). Entretanto, são poucos os estudos relacionados diretamente à exposição a derivados de petróleo em ambientes fechados com o risco de genotoxicidade.

O mecanismo preciso pelo qual o benzeno induz os efeitos citados permanece desconhecido, mas sabe-se que sua conversão para metabólitos é essencial para sua

toxicidade. Uma vez absorvido, o benzeno é primeiramente metabolizado no fígado, pelos citocromos P450 (Wan *et al*, 2006) (Figura 4 e 5). Assim, é largamente aceito que o metabolismo do benzeno é essencial para ocorrer o efeito hematotóxico e leucemiogênico (Badham *et al*, 2007; Bolognese *et al*, 2006).

{ INCLUDEPICTURE

"http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0304/Benzeno/mais%20benzeno_ficheiros/image009.gif" * MERGEFORMATINET }

Figura 4: Biotransformação do benzeno (em Bermond & Tose, 2000).

O polimorfismo genético das enzimas envolvidas na ativação de detoxificação de carcinógenos químicos foram recentemente relatadas como fatores de risco para desenvolvimento de neoplasias. Entre essas enzimas, incluem o citocromo P450 (CYP) alelos 1A1 e 2E1 envolvidas na ativação. As mieloperoxidases, NAD(P)H, quinona oxidoreductase (NQO), N-acetiltransferase 2 (NAT2) e glutathione S-transferase (GST) alelos M1, T1 e P que estão envolvidas na detoxificação; e o gene XRCC1 com o mecanismo de reparo do DNA. Tais sistemas foram estudados por Anderson (1985) e Chanvaivit *et al* (2007), verificando-se estarem associados com as vias de metabolização do benzeno (Figura 5).

{ INCLUDEPICTURE

"http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/r27(2)/fig3(69).gif" *

MERGEFORMATINET }

Figura 5: Papel do CYP450 e peroxidases na ativação do benzeno a intermediários mielotóxicos (em Bermond & Tose, 2000).

Os trabalhadores expostos ao benzeno que carregam o genótipo CYP2E1 *1/*5 ou 5*/5* excretaram maiores quantidades de *t,t*-MA (trans-trans-mucônico) em relação aos trabalhadores que portavam o genótipo CYP2E1 *1/*1. Os polimorfismos das enzimas NQO1 e GSTT1, não apresentaram diferenças significativas. No caso do gene XRCC1, trabalhadores do laboratório com as variantes 399Arg/Gln ou Gln/Gln tiveram baixa capacidade de reparo no DNA, em relação ao genótipo com 399 Arg/Arg. Esses resultados mostram que os biomarcadores de dose interna e de efeito biológico em pessoas ocupacionalmente expostas ao benzeno são influenciados pelo polimorfismo genético em genes de susceptibilidade (Chanvaivit *et al*, 2007).

Grandjean (1992) relatou que a variação individual a toxicidade química pode ser devida às diferenças no metabolismo toxicinético ou modificações nos efeitos. Evidências epidemiológicas sugerem que as variações mais comuns estão particularmente nas enzimas P450, que iniciam o maior papel para determinar a susceptibilidade individual a doenças induzidas por substâncias químicas. O conhecimento sobre a susceptibilidade individual pode ser importante para reduzir os riscos de doenças em trabalhadores e consumidores.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), são ligantes aos receptores de aril hidrocarboneto (AhR), que provocam a ativação do fator de transcrição, regulando a expressão de uma bateria de genes em uma variedade de tecidos e de diferentes espécies. A ligação do AhR com os DREs (elementos responsivos) induz um aumento na transcrição e incrementa a regulação de genes, inclusive o citocromo P450 1A1 (CYP1A1) (Badham *et al*, 2007).

O AhR é conhecido por iniciar um importante papel em processos da hematopoiese. Estudos usando camundongos *knockout* AhR *-/-* demonstraram que os camundongos que não possuem os genes AhR eram resistentes a hematotoxicidade induzida pelo benzeno, devido ao não aparecimento de alterações no sangue periférico ou na medula óssea. Assim, acredita-se que o AhR pode estar envolvido com a iniciação da toxicidade do benzeno (Badham *et al*, 2007). Além disso, Yoon *et al* (2002) observaram que a ausência de hematotoxicidade em camundongos AhR *-/-* foi devido a falta da expressão da CYP2E1. No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada na expressão da CYP2E1 entre os camundongos selvagens e AhR *-/-* . Portanto, o envolvimento dos mecanismos de AhR na iniciação da toxicidade do benzeno permanecem ainda não totalmente esclarecido (Badham *et al*, 2007).

O benzeno e o seu metabólito 1,2,4-benzenotriol também são conhecidos por causar mudanças citogenéticas em cromossomos específicos, especialmente nos cromossomos do grupo C e no cromossomo X humano. Sasiadek *et al* (1992) examinaram a distribuição das quebras no cariótipo humano causadas pelo benzeno, em trabalhadores expostos. Observou-se que os dados não são aleatórios e as quebras se acumularam principalmente nos cromossomos 2, 4 e 7 (em Holecková *et al*, 2004).

Nessa mesma linha de pesquisa foram avaliadas as células sanguíneas de 43 trabalhadores de fábricas, expostos ao benzeno em uma concentração média de 31 ppm ou 103,3 mg/m³, por 8 horas diárias de trabalho, comparados com 44 trabalhadores não expostos em Shanghai, China. Com alta exposição ao benzeno (>31 ppm), aumentaram-se as frequências de hiperdiploidias no cromossomo 9. No entanto, a exposição a baixas concentrações (< 31 ppm), não apresentou este resultado (Zhang *et al*, 1996).

A trissomia do cromossomo 9 é a mais comum hiperdiploidia induzida pelo benzeno. O nível de hiperdiploidia em trabalhadores expostos foi correlacionado com seu nível de fenol urinário. Uma correlação importante foi também encontrada entre hiperdiploidia e diminuição do número de linfócitos absolutos, que é um indicador da hematotoxicidade do benzeno, no grupo exposto, e não observada nos controles. Esses resultados demonstraram que a alta exposição ao benzeno induz aneuploidia no cromossomo 9 em indivíduos não doentes, onde a trissomia é a forma prevalente (Zhang *et al*, 1996).

A 1,4-benzoquinona mostrou ser um inibidor de formação da reunião dos microtúbulos. A hidroquinona e o 1,2,4-benzenotriol também mostram a desagregação na produção dos microtúbulos, em adição à aneuploidia, em células humanas intactas. Este provavelmente é o resultado da oxidação das quinonas, quando ligada covalentemente à tubulina. O mecanismo mais provável de aneuploidias induzidas por benzeno é através da conversão do benzeno para metabólitos quinonóides no sangue e na medula óssea, que se ligam e desagregam os microtúbulos na fase mitótica, causando erros de segregação dos cromossomos na anáfase (Zhang *et al*, 1996).

Um significativo aumento da frequência de quebras afetando os cromossomos 1 e 9 foram observados por Marcon *et al* (1999) em cultura de linfócitos de trabalhadores expostos ao benzeno. A incidência de cromossomos discêntricos no grupo de empregados expostos em uma indústria de sapatos foi significativamente mais alta do que no grupo controle (em Holecková *et al*, 2004).

Dessa forma, análise de aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos e a análise de micronúcleos nas células esfoliadas da bexiga urinária, foram utilizadas como biomarcadores para rastreamento de risco de exposição ocupacional às

substâncias químicas derivadas do petróleo, em ambiente fechado, nos funcionários do Laboratório de Referência de Qualidade dos Combustíveis da ANP.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A Agência Nacional de Petróleo emprega cerca de 30 funcionários específicos no Laboratório de Referência para a Qualidade de Combustíveis. São realizados processamentos das amostras coletadas nos postos de abastecimento de combustíveis do Distrito Federal, para análise e controle de qualidade ({ HYPERLINK "http://www.anp.gov.br" }).

Os trabalhadores do Laboratório de Controle de Qualidade foram informados sobre a intenção do projeto do Laboratório de Genética - UnB e então concordaram em participar espontaneamente. Dos 30 funcionários, 21 preencheram os questionários (Anexo 2) sobre estilo de vida, idade, sexo, tempo de trabalho, fornecendo suas amostras biológicas. Os controles foram funcionários dos escritórios do Ministério da Saúde, livres de qualquer exposição a esses gases e sem uso do tabaco.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pois se trata de um estudo com humanos. As coletas foram iniciadas em julho de 2005 em 11 trabalhadores expostos e em julho de 2006, mais 10 funcionários expostos. Realizadas no Laboratório de Genética, Universidade de Brasília. A coleta nos indivíduos controle foi realizada concomitantemente.

Os linfócitos foram extraídos do sangue periférico, e as células esfoliadas da bexiga foram extraídas da urina. Cada indivíduo recebeu uma solicitação de exame,

hemograma completo, para realizá-lo em laboratório particular, até trinta dias após a coleta. Este exame pode ser feito manualmente ou por aparelhos específicos e calibrados. Os dados sobre a série eritrocitária, leucocitária e plaquetária foram considerados.

4.1. Avaliação das aberrações cromossômicas em linfócitos humanos

Colheu-se 10 mL de sangue periférico por punção venosa, com seringa heparinizada (Liquemine-Lab.Roche). Transferiu-se o sangue para um tubo estéril à temperatura ambiente, deixando-o em repouso por algumas horas, a fim de se obter o plasma separado das hemácias. Os tubos foram rotulados com os nomes dos indivíduos e lacrados com tampa. Não foi necessário a coleta do sangue em jejum.

Cada frasco do meio de cultura possui um volume de 10 mL, sendo composto por: 80% de meio RPMI 1640 (Gibco), fitohemaglutinina (4%), estreptomicina (0,01 mg/mL) e penicilina (0,005 mg/mL). Adicionou-se 1,0 mL da fração leucocitária em 10 mL de meio. Este procedimento, conhecido como semeadura, foi realizado em capela de fluxo laminar, sem qualquer tipo de contaminação. As preparações metafásicas para análise de aberrações em cromossomos foram obtidas segundo a técnica de Moorhead e colaboradores (1960), com adaptações realizadas no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília.

Com 46 horas de cultivo a 37 °C, a contar do início da cultura, adicionou-se em cada frasco, 1 mL de uma solução de colchicina a 0,0165% (Fisher Scientific Co, USA). Com 48 horas procedeu-se à colheita do material. A cultura foi transferida para tubos de centrífuga. A primeira centrifugação tem por finalidade retirar o meio e foi

feita a 1000 rpm por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, ressuspensão das células em 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M) previamente aquecida a 37 °C, deixando-a em estufa a 37 °C por 15 minutos. Centrifugou-se o material para desprezar-se o sobrenadante. Adicionou-se suavemente 10 mL da solução fixadora recém-preparada (metanol-ácido acético 3:1). O fixador foi trocado por duas vezes, centrifugou-se por 7 minutos a 1000 rpm, desprezando-se o sobrenadante.

Em lâminas limpas e mantidas em água destilada gelada, pingou-se uma gota do material fixado sobre a lâmina, inclinando-a levemente para espalhar o material, passando-a rapidamente sobre a chama, com o cuidado para não aquecê-la demasiadamente.

A coloração é processada usando-se uma solução Giemsa (Merck) preparada na proporção de 1 mL de corante para 30 mL de tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,06M + KH_2PO_4 0,06M, pH = 6,8) por 5 minutos. Foram analisadas 100 células metafásicas por indivíduo em microscópio de luz com objetiva de 100 x, atingindo a magnificação de 1000 vezes. Nas análises foram pesquisadas quebras de cromátide, quebras cromossômicas, falhas cromatídicas e falhas cromossômicas, fragmentos cromossômico e outras aberrações cromossômicas estruturais.

4.2. Análise de micronúcleos em células esfoliadas da bexiga urinária

Retirou-se as células esfoliadas da bexiga urinária, através da centrifugação da urina dos indivíduos expostos e controles, realizada a 2000 rpm por 20 minutos.

Desprezou-se o sobrenadante, resuspendeu-se as células em 10 mL de solução fixadora recém-preparada (metanol-ácido acético 4:1). O fixador foi trocado duas vezes, centrifugou-se por 10 minutos a 1000 rpm, desprezando-se o sobrenadante.

Em lâminas limpas e mantidas em água destilada gelada, pingou-se duas gotas do material fixado sobre a lâmina, inclinando-a levemente para espalhar o material, passando-a rapidamente sobre a chama, com o cuidado para não aquecê-la demasiadamente.

A coloração é processada usando-se uma solução Giemsa (Merck) preparada na proporção de 1 mL de corante para 30 mL de tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,06M + KH_2PO_4 0,06M, pH=6,8) por 7 minutos. Foram analisadas 2.000 células interfásicas por indivíduo, para a pesquisa de micronúcleos. Foram consideradas, somente as células totalmente íntegras, com os contornos celulares bem delineados, sem sobreposição. Os micronúcleos considerados foram aqueles que estavam visivelmente dentro do citoplasma e sem contato com o núcleo principal.

4.3. Caracterização do ambiente de trabalho

No Laboratório de Referência para a Qualidade de Combustíveis da ANP, do Centro de Pesquisa e Análise Tecnológica (CEPAT), são realizados testes, ensaios e análises para caracterização tecnológica de combustíveis (álcool, gasolina, e óleo diesel), de petróleo cru, de óleos, de graxas, e de outros derivados de hidrocarbonetos (ANP, 2005).

Os equipamentos são específicos para cada área de atividade, sendo dotados de mesas, bancadas, e pias. Contém luminárias fluorescentes e ar refrigerado. São providas de capelas, exaustões, chuveiros de emergência, lava olhos e outros recursos de segurança. Fica no andar térreo, módulo H do prédio da ANP, em Brasília-DF (ANP, 2005).

Está organizado em laboratórios de combustíveis, de lubrificantes (óleos e graxas), de álcool, de instrumentação; sala de análise de petróleo, sala de motores, sala de amostras, sala de padrões e descarte, sala de reagentes; almoxarifado; oficina mecânica; galeria e central de gases (ANP, 2005).

Nos laboratórios é obrigatório o uso de equipamentos de proteção individual (EPI), como: jalecos, respirador de filtro químico contra vapores orgânicos, óculos de proteção de ampla visão com lentes anti-embaçantes, luvas impermeáveis de cano longo e creme de proteção contra graxa e óleo (ANP, 2005).

A equipe é formada por técnico químico, auxiliares de laboratório, engenheiros químicos e laboratoristas (ANP, 2005).

No laboratório de combustíveis, são realizados serviços em geral relativos ao controle de qualidade de combustíveis (gasolina, óleo diesel, querosene, solventes, etc). Os funcionários entram em contato com líquidos inflamáveis, através da manipulação de reagentes, como ácido nítrico, ácido clorídrico, metanol, ácido sulfúrico, álcool isopropílico, tetracloreto de carbono e outros (ANP, 2005).

No laboratório de lubrificantes, também são realizados serviços relativos ao controle de qualidade de lubrificantes em geral, como graxas, óleos minerais, aditivos, e outros. Ocorre também a manipulação de reagentes. Possui um forno instalado para queima de lubrificantes e combustíveis, a fim de determinar os níveis de resíduos existentes após a queima dos mesmos. Ocorre a formação e liberação do monóxido de carbono e benzopireno (ANP, 2005).

No laboratório de álcool é realizado o controle de qualidade do álcool. Os funcionários têm contato direto com líquidos inflamáveis e também manipulam reagentes (ANP, 2005).

No laboratório de instrumentação, são usados aparelhos de absorção atômica, para determinar o teor de metais em combustíveis e óleos lubrificantes. Realiza teste de infravermelho para análise de lubrificantes e aditivos, e uso de espectro de ultravioleta para ensaios em geral. Os funcionários entram em contato direto com os líquidos inflamáveis (ANP, 2005).

Na sala de análise de petróleo, são realizados análises e controles de qualidade de petróleo. Os funcionários utilizam líquidos inflamáveis como tolueno e álcool anidro (ANP, 2005).

Na sala de motores são realizadas atividades como ensaios para verificação de octanagem da gasolina (índice de resistência à detonação), com a formação e liberação do monóxido de carbono, bem como ruídos acima de 85 db (decibéis) dos motores. Os funcionários têm contato com tolueno, n-pentano, iso-octano e aguarrás (ANP, 2005).

Na sala de amostras ocorre recepção, guarda, e distribuição de amostras dos combustíveis e lubrificantes. Neste local o risco ocorre durante o armazenamento dos líquidos Inflamáveis. Na sala de descarte, também ocorre à recepção, guarda, e distribuição de padrões usados como reagentes em ensaios, como n-heptano, tolueno e iso-octano (ANP, 2005).

No almoxarifado ficam armazenados os instrumentos utilizados nos processamentos, como tubos de ensaio, rolhas, copos, papéis e outros materiais. Um ambiente aparentemente sem riscos. Na galeria, ficam as caldeiras e o compressor (ANP, 2005).

Até a realização deste trabalho, não havia registros de comprometimento à saúde dos trabalhadores, de acordo com o Laudo Técnico Pericial de Condições Ambientais de Trabalho, publicado anualmente pela ANP (ANP, 2006).

Este laudo caracteriza os riscos desses ambientes de trabalho, pois estão presentes grande volume de materiais inflamáveis (gasolina, óleo diesel, álcool, óleos, graxas), voláteis, e outros compostos elaborados à base de hidrocarbonetos. A periculosidade deste local de trabalho é de 10% e a insalubridade das atividades laboratoriais rotineiras, atinge grau máximo. No entanto, o laudo considera a exposição dos trabalhadores como moderada com efeitos reversíveis, devido às alternativas de proteção individual (ANP, 2006).

A ANP considera insalubre ou perigoso qualquer situação que possa originar doenças ocupacionais nos profissionais e lhes atingir a integridade física. A exposição ocupacional é entendida como contato do organismo com uma determinada substância tóxica. Relaciona-se com via de exposição, dose, frequência e duração (ANP, 2006).

As principais vias de exposição são a respiratória e a dérmica. O risco existe, mas controlado, pela presença de proteções coletivas e utilização obrigatória dos equipamentos de proteção individual. Para controle, as amostras são manipuladas em capelas, com exaustão e ventilação. Nestes ambientes, a restrição ao tabagismo é absoluta (ANP, 2006).

4.4. Análise estatística

Para a definição do teste estatístico, primeiramente fêz-se uma análise de homogeneidade das amostras. De acordo com o Teste de Normalidade, realizado com o auxílio do programa computacional Anova.

Assim, o mais recomendado seria um teste não-paramétrico, como o de Mann-Whitney's *U-test*, com um nível de significância de 95%. Este teste é aplicado para comprovar se dois grupos independentes foram ou não extraídos de uma mesma

população. Trata-se de uma das mais poderosas provas não-paramétricas, e constitui uma alternativa extremamente útil da prova paramétrica t , quando o pesquisador deseja evitar as suposições exigidas por este último, ou quando a mensuração atingida é inferior à da escala de intervalos (Siegel, 1975).

Os cálculos de média, mediana e desvio padrão foram obtidos no programa computacional Microsoft Excel e o programa WebCalc. Quando as amostras são pequenas, o desvio padrão tende a ser maior que a média, assim usamos como referência de variabilidade o erro padrão da média.

Para correlacionar os resultados de micronúcleos com aberrações cromossômicas, utilizamos o teste de Spearman, com um nível de significância de 95%. É uma avaliação quantitativa do coeficiente quanto à intensidade (Siegel, 1975).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da amostra

Dentre os 21 indivíduos monitorados, expostos aos vapores derivados dos combustíveis, encontra-se 6 mulheres e 15 homens, com idade entre 21 e 34 anos. O tempo de trabalho varia de 1 a 10 anos, sendo que até o ano de 2005, eram 40 horas semanais de trabalho. Após 2005 as horas trabalhadas foram reduzidas para 16 horas semanais nos locais de maior insalubridade. Não são fumantes e apenas 3 fazem uso de bebidas alcoólicas com pouca frequência (Tabela 1a).

Onze funcionários iniciaram suas atividades em 1999, juntamente com a implantação do programa de controle de qualidade. Os outros 10 funcionários iniciaram suas atividades em 2005.

São todos indivíduos saudáveis sem uso de medicação específica. Não há registro de alguma exposição a radiações ou outros agentes físicos com características mutagênicas, nenhum episódio de exposição acidental nos últimos 12 meses ou alguma patologia genética associada à instabilidade cromossômica. Apenas um dos indivíduos realizou exame de Raio X do tórax a menos de 6 meses do início das coletas.

Há registro de doenças crônicas e genéticas nas famílias, como hipertensão arterial, diabetes, artrites e cânceres, mas nenhum dado que possa interferir nos resultados obtidos.

No grupo controle, todos os indivíduos trabalham em escritórios, sem qualquer tipo de exposição ocupacional a substâncias químicas. Foram 3 mulheres e 7 homens que participaram espontaneamente. A idade varia entre 22 e 35 anos. Alguns já fizeram

uso de tabaco, mas no momento da coleta dos materiais biológicos, não estavam em uso.

Não há registro de qualquer exposição ocupacional a substâncias químicas e exposição accidental. Quatro desses indivíduos realizaram exame de raio x nos 6 meses do início das coletas.

Há registro de doenças crônicas e genéticas nas famílias, como hipertensão arterial, diabetes, cânceres, esclerose múltipla e Alzheimer, mas nenhum dado que possa interferir nos resultados obtidos (Tabela 1b).

Tabela 1. Dados extraídos dos questionários preenchidos pelos indivíduos: (a) expostos, onde a cor azul indica os trabalhadores empregados desde 1999/2000 e a cor verde, os trabalhadores empregados desde 2005; (b) controles.

a)

Indivíduos Expostos						
Expostos	Gênero	Idade	Anos	Hrs./Semana	Tabagismo	Etilismo
1	M	25	7	40	-	*
2	M	37	5	40	-	*
3	F	27	7	40	-	-
4	F	24	7	40	-	-
5	M	26	7	40	-	-
6	M	28	7	40	-	-
7	F	28	3	40	-	-
8	F	31	11	40	-	-
9	M	31	5	40	-	-
10	M	29	6	40	-	-
11	M	26	8	40	-	-
12	M	28	5	40	-	-
13	F	21	1	40	-	-
14	F	23	1	16	-	-
15	M	29	2	16	-	*
16	M	35	2	16	-	-
17	M	25	1	16	-	-
18	M	23	2	16	-	-
19	M	34	2	16	-	-
20	M	25	1	16	-	-
21	M	30	1	16	-	-

* Pouca frequência

b)

Indivíduos Controles				
Controles	Gênero	Idade	Tabagismo	Etilismo
1	M	22	-	S
2	F	26	-	-
3	F	27	-	-
4	M	27	S*	S
5	M	30	-	-
6	F	30	S*	-
7	M	35	-	-
8	M	29	-	-
9	M	24	-	-
10	M	27	S*	S

S*: parou de fumar há no mínimo 3 anos

S: pouca frequência

5.2. Resultados da pesquisa de aberrações cromossômicas

Na contagem total, foram analisadas 3100 células metafásicas: 2100 nos indivíduos expostos e 1000 nos controles, sendo 100 por indivíduo. Do total, encontrou-se 68 aberrações cromossômicas estruturais, sendo 67 nos indivíduos expostos e 1 nos indivíduos controles.

Na tabela 2, estão descritas as aberrações cromossômicas encontradas nos linfócitos analisados de todos os indivíduos. Foram encontrados 20 falhas (Figura 6), 42 fragmentos, 4 quebras, 1 união e 1 cromossomo dicêntrico nos expostos e 1 falha nos controles.

Tabela 2. Aberrações cromossômicas encontradas nos linfócitos periféricos dos indivíduos: (a) expostos, onde a cor azul indica os trabalhadores empregados desde 1999/2000 e a cor verde, os trabalhadores empregados desde 2005; (b) controles.

a)

Aberrações Cromatídicas encontradas nos Ind. Expostos					Total
Indivíduos	Falhas	Frag.	Quebra	Outras	
1	4	2	2	-	8
2	-	-	-	-	-
3	-	2	-	-	2
4	5	9	-	-	14
5	1	4	-	-	5
6	3	5	1	-	9
7	-	5	-	-	5
8	-	1	-	1 união	2
9	3	3	1	1 dicêntrico	8
10	-	-	-	-	-
11	3	-	-	-	3
12	1	1	-	-	2
13	-	4	-	-	4
14	-	3	-	-	3
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	1	-	-	1
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
21	-	1	-	-	1
Total	20	41	4	2	67
Total de células					2100

b)

Aberrações Cromatídicas encontradas nos Ind. Controles				Total
Indivíduos	Falhas	Frag.	Quebras	
1	-	1	-	1
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
Total	-	1	-	1
Total de células				1000

Em relação ao tempo de trabalho, 11 funcionários foram empregados em 1999/2000, e 10 funcionários em 2005. Observaram-se 58 aberrações cromossômicas nos funcionários empregados há mais tempo, e 9 aberrações cromossômicas nos trabalhadores empregados há menos tempo (Tabela 2a).

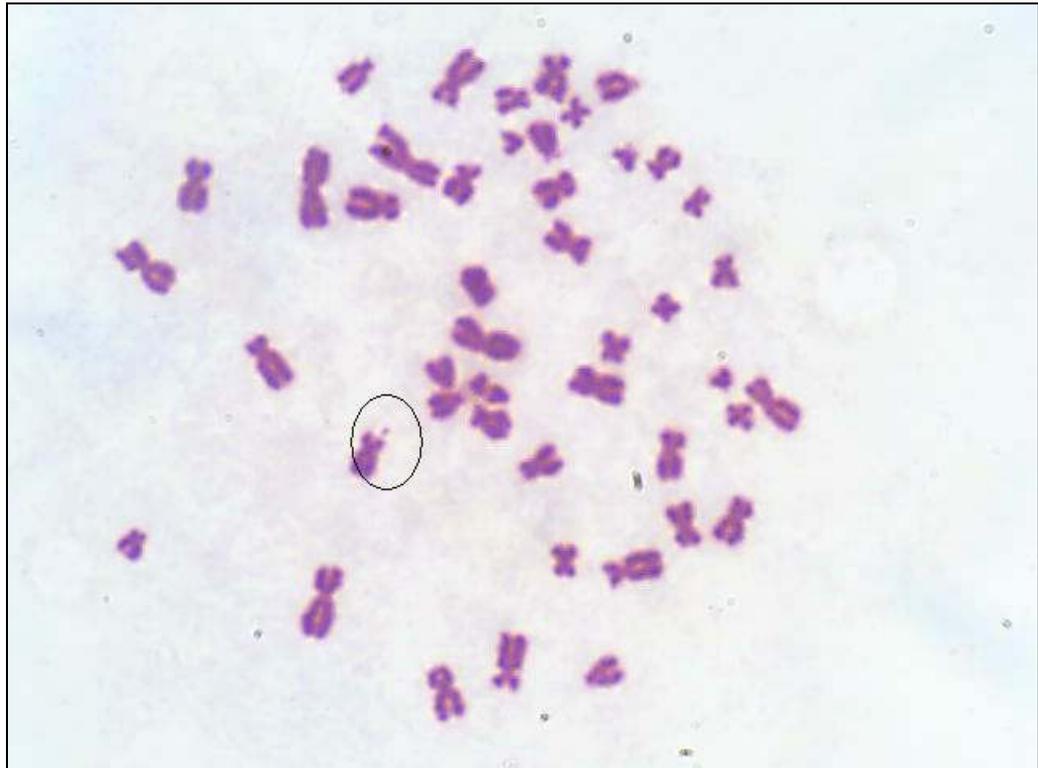


Figura 6. Falha ou *gap* cromatídica (em destaque) encontrada em uma célula metafásica de um dos indivíduos expostos avaliados. Lâmina corada com Giemsa analisada com óleo de imersão em objetiva de 100X.

A média de aberrações cromossômicas estruturais nos indivíduos expostos foi de $3,19 \pm 0,82$, e nos controles a média foi de $0,1 \pm 0,1$ (Figura 7). O desvio padrão foi substituído pelo erro padrão, pois havia indivíduos com e sem aberrações cromossômicas estruturais. A mediana para os expostos foi 2 e nos controles 0 (Tabela 3).

Tabela 3. Cálculos estatísticos básicos do número de aberrações cromossômicas encontradas nos linfócitos dos indivíduos expostos e controles.

Cálculos estatísticos básicos				
	Média	DP	SE	Mediana
Expostos	3,19	3,8	0,82	2
Controles	0,1	0,31	0,1	0

DP: desvio padrão
SE: erro padrão

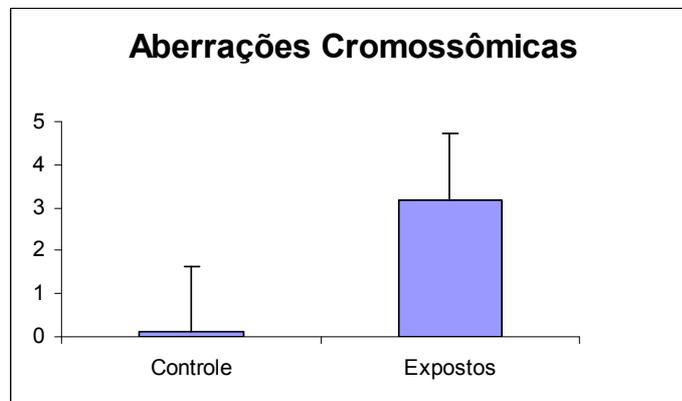


Figura 7. Média do número de aberrações cromossômicas encontradas nos linfócitos dos indivíduos expostos e controles. A barra representa o erro padrão. Figura projetada no Excel 2003.

De acordo com o teste de normalidade, os dados obtidos das amostras não apresentaram uma distribuição normal. Assim, não se aplica a estatística paramétrica (Anexo 3).

Na aplicação do teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$), verificou-se que o valor de P foi menor que 0,05 ($p = 0,0031$). Quando o valor de P é menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$), a amostra é estatisticamente significativa ao nível de 5%. Assim, observou-se que a quantidade de aberrações cromossômicas estruturais, encontrada no grupo de

indivíduos expostos aos vapores de combustíveis derivados de petróleo, é significativamente diferente do valor encontrado nos funcionários dos escritórios (controles).

5.3. Resultados das análises de micronúcleos

Em um total de 62.000 células esfoliadas da urina analisadas, 42.000 foram nos expostos e 20.000 nos controles, sendo analisadas 2000 por indivíduo. Foram encontrados 69 micronúcleos nas células dos indivíduos expostos, o que correspondeu a 0,16% e apenas 4 (0,02%) micronúcleos nas células dos indivíduos controles (Tabela 4 e Figura 8).

Os micronúcleos são massas de cromatina originadas de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, que se perdem durante a anáfase na divisão celular, devido aos eventos clastogênicos ou aneugênicos, também podem ser formados pela interação de agentes químicos, físicos e biológicos com estruturas não genômicas que promovem distúrbios na maquinaria mitótica e falha na segregação dos cromossomos. A ação dos agentes pode originar os micronúcleos, um ou vários por célula, que resultam em fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em relação aos demais em migração para os pólos da célula durante a anáfase (Schimid, 1975; Rabello-Gay, 1991; Al-Sabti, 1995; Fenech, 2000; Souza & Fontanelli, 2006).

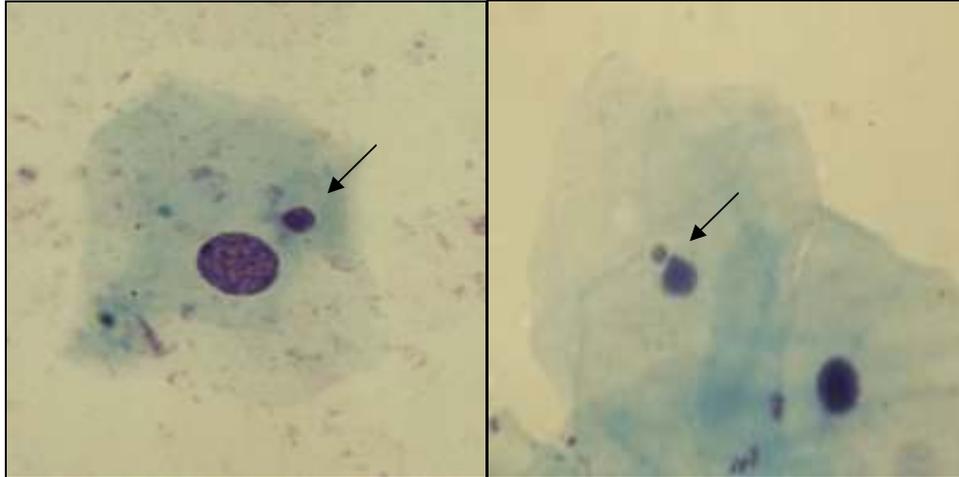


Figura 8. Micronúcleos (setas) encontrados em células da bexiga urinária extraídas da urina de um dos indivíduos expostos avaliados. Lâmina corada com Giemsa analisada com óleo de imersão em objetiva de 100X.

A quantidade de micronúcleos nos indivíduos empregados há mais tempo, foi de 62 e nos indivíduos empregados há menos tempo foi 9 micronúcleos, indicando que há uma tendência de aumento nos danos genéticos em relação ao tempo de exposição; entretanto esses dados não foram analisados estatisticamente devido ao tamanho da amostra.

Tabela 4. Micronúcleos encontrados nas células esfoliadas da bexiga presentes na urina dos indivíduos expostos e controles. A cor azul indica os funcionários empregados desde 1999/2000, e a cor verde, funcionários empregados desde 2005.

Contagem de Micronúcleos			
	Indivíduos Expostos		Indivíduos Controles
	MN		MN
1	3	1	-
2	11	2	-
3	2	3	2
4	10	4	1
5	11	5	-
6	2	6	-

7	13	7	1
8	1	8	-
9	4	9	-
10	-	10	-
11	3		
12	1		
13	2		
14	2		
15	-		
16	1		
17	-		
18	1		
19	-		
20	-		
21	2		
Total de MN	69	Total de MN	4
Total de células	42000	Total de células	20000

A média de micronúcleo nos indivíduos expostos foi de $3,28 \pm 0,90$, e nos controles a média foi de $0,4 \pm 0,22$ (Figura 9) O desvio padrão foi substituído pelo erro padrão, pois existem indivíduos com e sem micronúcleo. A mediana para os indivíduos expostos foi 2 e para os controles 0 (Tabela 5).

Tabela 5. Cálculos estatísticos básicos do número de micronúcleos encontrados nas células da bexiga urinária extraída da urina dos indivíduos expostos e controles.

Cálculos estatísticos básicos				
	Média	DP	SE	Mediana
Expostos	3,28	4,13	0,9	2
Controles	0,4	0,69	0,22	0

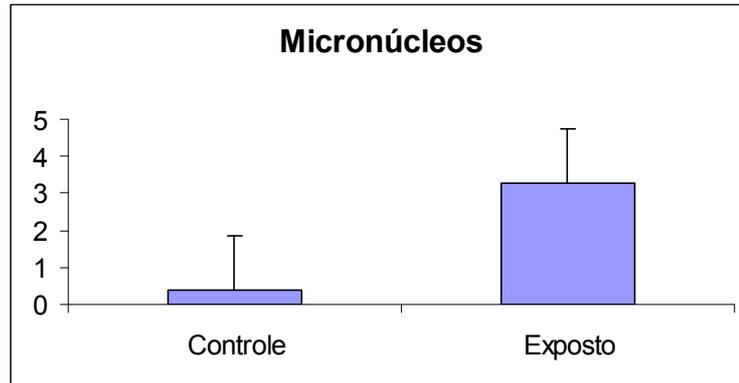


Figura 9. Média do número de micronúcleos encontrados nas células da bexiga urinária extraídas da urina dos indivíduos expostos e controles. A barra representa o erro padrão. Figura projetada no Excel 2003.

De acordo com o Teste de Normalidade, os dados obtidos das amostras não apresentam distribuição normal (Anexo 4). O valor de P para os micronúcleos encontrados foi menor de 0,05 ($P = 0,0070$).

5.4. Resultado da análise de correlação, obtido através do teste de Spearman, coeficiente (r)

A correlação de Spearman é uma avaliação não paramétrica qualitativa do coeficiente quanto à intensidade. Quando os valores de correlação estão entre 0,6 e 0,9 a correlação é dita forte. Correlacionamos às freqüências de aberrações cromossômicas com as freqüências de micronúcleos, tanto nos indivíduos expostos como no grupo controle. O valor do coeficiente de correlação entre os indivíduos expostos foi de $r = 0,74$ e o valor de $P = 0,000$ (Figura 10).

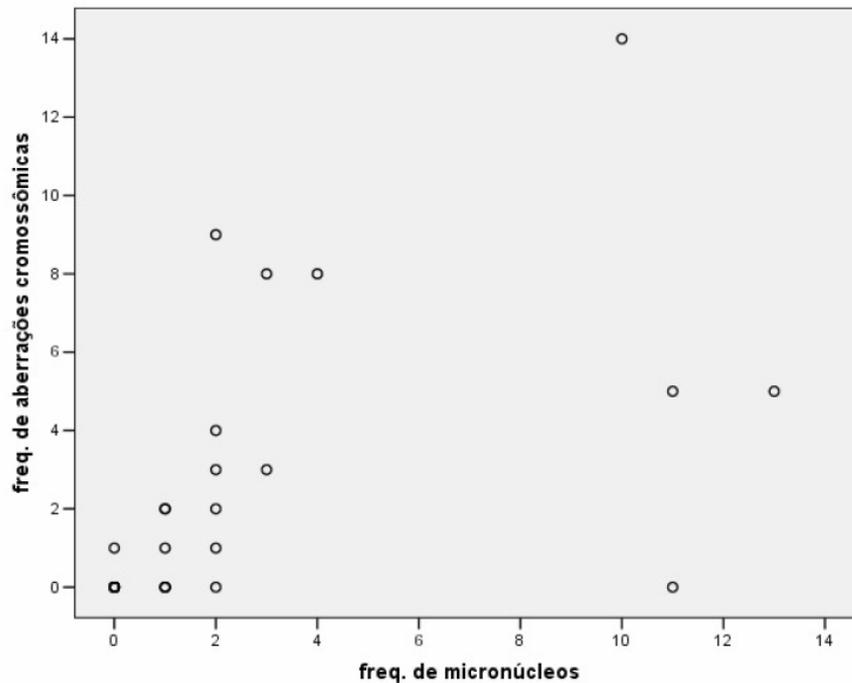


Figura 10. Correlação de Spearman (r) realizada entre a frequência das aberrações cromossômicas encontradas nos linfócitos dos indivíduos expostos e controles; e a frequência do número de micronúcleos encontrados nas células da bexiga urinária da urina dos indivíduos expostos e controles. O valor do Coeficiente de correlação encontrado foi 0,74, dita como uma correlação forte.

Por meio da Correlação de Spearman foi possível observar que, na medida que a quantidade de aberrações cromossômicas encontradas nos linfócitos dos indivíduos expostos aumentam, a frequência do número de micronúcleos, encontrados nas células da bexiga urinária dos indivíduos expostos também aumentam. Assim, podemos inferir, que os dois eventos apresentaram uma correlação.

5.5. Resultados dos exames hamatológicos

Avaliando os resultados dos hemogramas realizados pelos indivíduos expostos e controles em laboratórios particulares, a contagem das séries eritrocitárias, leucocitárias e plaquetárias, apresentaram-se dentro dos valores preconizados para indivíduos saudáveis.

Tabela 6. Avaliação dos resultados dos exames hematológicos realizados pelos indivíduos expostos e controles, concomitante com a coleta do material sanguíneo para análise das aberrações cromossômicas. Valores com a média e desvio padrão das hemácias, série leucocitária e plaquetária.

Valores extraídos dos hemogramas realizados por todos os indivíduos				
	Hemácias x10 ⁹ /mm ³	Leucócitos/mm ³	Linfócitos/mm ³	Plaquetas/mm ³
Expostos	5,01 ± 0,46	6467 ± 1264	2289 ± 599	237 mil ± 51
Controles	5,72 ± 0,39	6450 ± 1258	2612 ± 481	216 mil ± 64
Padrão*	4,0 a 6,1	3700 a 11000	740 a 5500	140 a 450

* Valor padrão para normalidade.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, as falhas, quebras e fragmentos foram consideradas aberrações cromossômicas estruturais e os micronúcleos como eventos genotóxicos, pois podem originar-se de danos cromossômicos ou falhas de segregação mitótica, que significaria origem aneugênica.

A média das aberrações cromossômicas encontradas nos indivíduos expostos em relação aos controles foi significativa ($P = 0,001$). Essas alterações podem ter sido provocadas pela exposição ocupacional aos vapores dos combustíveis, liberados durante o processamento de análise da qualidade das amostras.

De acordo com o laudo técnico pericial de condições ambientais de trabalho, publicado anualmente pela ANP, a periculosidade do local de trabalho dos funcionários do CEPAT é de 10%, e a insalubridade das atividades diárias laborais atingem grau máximo (ANP, 2006). Portanto a exposição ocupacional aos agentes químicos é reconhecida pelo órgão regulador, devido à presença de substâncias químicas voláteis, conhecidamente prejudiciais à saúde humana.

Como nós encontramos uma correlação direta estatisticamente significativa ($P = 0,000$) entre o número de aberrações cromossômicas estruturais nos linfócitos com o número de micronúcleos nas células esfoliadas da bexiga urinária, provavelmente, a maioria dos micronúcleos observados seja de origem clastogênica, isto é, proveniente de danos estruturais nos cromossomos. Isso foi demonstrado através das análises usando o coeficiente de correlação de Spearman com $r = 0,74$, sendo que esse valor indica que a relação encontrada é dita forte.

Pode-se observar que são poucos os estudos relatando avaliações de genotoxicidade em indivíduos expostos ocupacionalmente, em ambientes fechados, aos

compostos derivados do petróleo. Nossos dados vão de encontro aos obtidos por Laffon *et al* (2006), por Martino-Roth (2002) e Kim *et al* (2003), mostrando que em ambientes fechados, mesmo com o uso de equipamentos de proteção recomendados por lei, ainda há o risco de genotoxicidade. No nosso estudo, os dois bioindicadores acusaram o mesmo efeito de clastogenicidade.

Com o aumento da frequência das aberrações cromossômicas, os grupos expostos ocupacionalmente apresentam maiores riscos de sofrer danos genéticos persistentes e conseqüentemente, aumentam a suscetibilidade ao câncer (Almeida-Santos *et al*, 2005). Mais importante ainda seria a monitorização, através dos exames adequados dos trabalhadores desses laboratórios, e que no elenco de exames que são feitos periodicamente, que se façam também a monitorização da genotoxicidade, pois é bem conhecida a correlação existente entre genotoxicidade e carcinogenicidade.

Neste trabalho, os resultados encontrados nos exames hematológicos realizados pelos indivíduos expostos não apresentaram alterações significantes no eritograma, leucograma e série plaquetária, assim como alterações com os padrões de normalidade.

As exposições crônicas a altas concentrações de benzeno, acima de 10 ppm, estão relacionadas com depressão nas células da medula óssea, e podem levar ao desenvolvimento de anemia aplásica e leucemia mielóide aguda (Badham *et al*, 2007). Indivíduos que passaram por uma exposição podem não apresentar nenhuma anormalidade hematológica significativa, enquanto outros, que sofreram intoxicação, ou que passaram por uma exposição mais severa, apresentam alguma alteração na medula óssea (Ling *et al*, 2007).

Nos indivíduos expostos analisados em nosso trabalho, não foram encontradas nenhuma relação com depressão na medula óssea, possivelmente por que os mesmos não estão sujeitos a altas concentrações de benzeno.

Não foi possível fazer uma correlação entre o número de aberrações cromossômicas, com o tempo de exposição ou tempo de trabalho, devido o tamanho da amostra. Turkel (1994) analisou citogeneticamente linfócitos do sangue periférico de 30 trabalhadores expostos ao benzeno em uma fábrica de sapatos. Observou um aumento significativo nas frequências de aberrações cromossômicas, mas nenhuma correlação desta com o tempo de exposição ou período de trabalho foram observadas.

Infante *et al* (1983) compararam as idades dos indivíduos expostos ao benzeno e dos indivíduos controles, com o número de aberrações cromossômicas encontradas. Os resultados mostraram que os danos citogenéticos não estavam relacionados com a idade dos trabalhadores. A associação entre idade e o índice de aberrações cromossômicas não foi possível correlacionar em nosso trabalho, devido o tamanho limitado de nossa amostra. Da mesma forma, não foi possível estabelecer uma correlação com o gênero masculino e feminino.

Cronkite *et al* (1984) analisaram o índice de linfomas em camundongos machos e fêmeas induzidos pelo benzeno, mas não encontrou prevalência entre os gêneros. Demonstraram que o efeito dose-resposta foi altamente significativa para camundongos expostos ao benzeno, em relação à indução das aberrações cromossômicas.

O número de aberrações cromossômicas encontradas em indivíduos expostos às substâncias químicas podem ser um indicador de risco para o desenvolvimento de câncer em estudos populacionais, mas não a nível individual (Forni, 1996).

Dentre as aberrações cromossômicas encontradas em nosso trabalho, a maioria foram observadas nos trabalhadores empregados desde 1999/2000. Da mesma forma observou-se maior quantidade de micronúcleos na urina dos funcionários empregados há mais tempo.

Atualmente o principal interesse dos estudos com o benzeno é avaliar a baixa exposição contínua e prolongada, em exposições ambientais e ocupacionais (Roma-Torres *et al*, 2005).

Mesmo sob uma exposição ocupacional de baixo nível ao benzeno, trabalhadores podem apresentar risco de genotoxicidade, principalmente aqueles que apresentam decréscimo na capacidade de reparo de danos no DNA. Dessa forma, a associação com a carcinogenicidade pode depender da susceptibilidade genética e com o nível de exposição. A avaliação da capacidade de reparo do DNA pode ser utilizada como biomarcador de efeito, necessário para complementação das avaliações do risco à saúde ocupacional (Chanvaivit *et al*, 2006).

Surrallés *et al* (1997) sugeriram que o nível de exposição ao benzeno em até 1 ppm, não induz efeito genotóxico estatisticamente importante. Estudos realizados em células expostas ao benzeno a menos de 1 ppm, não apresentaram um resultado confiável. Assim, nenhum limite de exposição ocupacional pode ser estabelecido até o presente momento, em relação às atividades genotóxicas do benzeno, observado em exposições de baixa, média e alta intensidade. Portanto, não existem limites seguros de exposição aos derivados do petróleo.

A metodologia aplicada neste trabalho foi a citogenética clássica de colocação com Giemsa. Está foi escolhida, pois é uma técnica capaz de observar os danos

cromossômicos causados pela exposição ocupacional aos vapores liberados durante as análises da qualidade dos combustíveis. A técnica de FISH dá resultados com acurácia em relação aos danos cromossômicos, no entanto, não faz parte das metodologias de rotina do nosso laboratório.

No Laboratório de Referência para controle de qualidade dos combustíveis, a exposição aos derivados do petróleo ocorre em ambiente fechado. Essa característica pode contribuir para aumento da concentração dos compostos químicos no ambiente. Mesmo com o laboratório equipado, com recursos para saída dos vapores, uso de materiais de proteção individual, os valores encontrados foram importantes. Portanto, sugerimos o controle mais rígido da concentração e quantidade das substâncias voláteis no ambiente ocupacional, através de medidas que detectam alteração na quantidade permitida por lei.

O fato de a amostra ser relativamente pequena, de 21 indivíduos expostos, não prejudicou esse estudo, pois procuramos controlar com segurança o maior número de variáveis possíveis que poderiam descaracterizar o estudo, como: um questionário bastante minucioso sobre os hábitos de vida e exposição a fatores de interferência, a solicitação dos exames hematológicos, a coleta simultânea de sangue e urina e a certificação de que o grupo controle não sofreu exposição a agentes clastogênicos. Os nossos resultados mostraram claramente que os danos cromossômicos estão associados ao local de trabalho.

Finalmente, ainda temos armazenado em freezer alíquotas do plasma de todos os indivíduos para a análise de resíduos, que serão analisados posteriormente, devido à aquisição recente do equipamento apropriado. Tais dados estarão inclusos em uma futura publicação desse trabalho.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a exposição aos produtos derivados do petróleo, em ambientes fechados, como dos laboratórios de controle de qualidade dos combustíveis, apresentaram riscos de genotoxicidade, mesmo com a utilização de todos os instrumentos de proteção individual e coletivos.

Nossos resultados mostraram também a importância de se monitorar constantemente os compostos aromáticos provenientes dos derivados do petróleo no ambiente, com o uso de detectores apropriados, para reduzir ao mínimo possível os níveis de exposição, e o uso sistemático dos EPI. O monitoramento citogenético dos trabalhadores expostos podem complementar os dados clínicos e laboratoriais, uma vez que esses só sofreram alterações, em episódios de intoxicação.

A análise de 21 indivíduos em uma população de 30 funcionários pode ser utilizada como uma indicação de exposição desta população.

8. RECOMENDAÇÕES

Recomendações:

- Que as fiscalizações sobre o uso dos equipamentos de proteção individual sejam mais rigorosas, e que os trabalhadores adquiram um hábito de uso rotineiro, durante todo o expediente de trabalho de análise dos combustíveis.
- Que seja criada dentro da instituição com comissão interna de prevenção contra a exposição a esses gases.
- Que sejam realizados monitoramentos biológico e ambiental com mais frequência, usando-se equipamentos com alta capacidade de detecção.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACGIH, 2001; Threshold limit values: benzene. American Conference for Governmental Industrial Hygienists.
- ALMEIDA-SANTOS, M.F.M.; FERRARI, I.; LUNA, H.; Chromosomal aberration analysis in workers exposed to chemical and biological hazards in research laboratories. **Environmental Research**, vol. 97: 330-334, 2005.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D.; Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation research**, vol. 343: 121-135. 1995.
- AMES, B.N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E.; Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, vol. 31: 247-364, 1975.
- ANDERSON, H.R.; MACNAIR, R.S.; RAMSEY, J.D. Deaths from abuse of volatile substances: a national epidemiological study. **BMJ**, vol. 290:304-7, 1985.
- ANP, Agência Nacional do Petróleo; { [HYPERLINK "http://www.anp.gov.br"](http://www.anp.gov.br) } (acesso em novembro de 2005 e março de 2008).
- ANP, 2005; Laudo técnico pericial de condições ambientais de trabalho. Arquivo, Agência Nacional de Petróleo.
- ANP, 2006; Laudo técnico pericial de condições ambientais de trabalho. Arquivo, Agência Nacional de Petróleo.
- ATSDR, 2003; Toxicological profile information sheet. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Department of Health and Human Services, Public Health Service, USA.
- BADHAM, H.J.; WINN, L.M.; Investigating the role of the aryl hydrocarbon receptor in benzene-initiated toxicity *in vitro*. **Toxicology**, vol. 229: 177-185 2007.

BERMONG D.M.; TOSE H. Alcohol use: interactions with benzene and other substances at the workplace. **Revista de Psiquiatria Clínica**, vol.27: issue 2, 2000.

{ HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Bolognesi%20C%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Merlo%20F%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Rabboni%20R%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Valerio%20F%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Abbondandolo%20A%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; {

Cytogenetic biomonitoring in traffic police workers: micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. { **HYPERLINK**

"javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'Environ%20Mol%20Mutagen.');" },
vol.30: (4):396-402, 1997.

BOLOGNESE, A.;CORREALE, G.; MANFRA, M.; LAVECCHIA, A.; NOVELLINO, E.; PEPE, S.; Antitumor agents. 5. Synthesis, structure – activity relationships, and biological evaluation of dimethyl-5H-pyridophenoxazin-5-ones, tetrahydro-5H-benzopyridophenoxazin-5-ones, and 5H-benzopyridophenoxazin-5-ones with potent antiproliferative activity. **J. Med. Chem.**, vol. 49: 5110-5118, 2006.

BOOGAARD, P.J.; ROCCHI, P.S.; van SITTERT, N.J.; Biomonitoring of exposure to ethylene oxide and propylene oxide by determination of hemoglobin adducts: correlation between airborne exposure and adducts levels. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, vol. 72: 142-150, 1999.

BRIEF, R.S.; LYNCH, J.; BERNARTH, T.; SCALA, R. A.; Benzene in the workplace. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, vol. 41: 616-623, 1980.

CELIK, A.; ÇAVAS, T.; E ERGENE-GÖZÜKARA, S.; Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis**, vol. 18: 417-421, 2003.

CHANVAIVIT, S.; NAVASUMRIT, P.; HUNSONTI, P.; AUTRUP, H.; RUCHIRAWAT, M.; Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. **Mutation Research**, vol. 626: 79-87, 2007.

CHITRA, C.K.; VISHWANATHAN, H.; DEEPA, E.; USHA RANI, M.V.; Cytogenetic monitoring of men occupationally exposed to airborne pollutants. **Environmental Pollution**, vol. 112: 391-393, 2001.

CLANFERO, E.; NARDINI, B.; MARCHIORO, M.; BORDIN, A.; GABBANI, G.;
Mutagenicity and contents of polycicli aromatic hydrocarbons in used and
recycled motor oils. **Mutation Research**, vol. 368: 283-291, 1996.

CRONKITE, E.P.; BULLIS, J.; INOUE, T.; DREW, T.; Benzene inhalation produces
leukemia in mice. **Toxicology Applied. Pharmacology**, vol. 75: 358-361, 1984.

EPA - United States Environmental Protection Agency
<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/benzene.html> (acesso em 10/11/2007).

EPA - United States Environmental Protection Agency
<http://www.epa.gov/ncea/iris/toxreviews/0271-tr.pdf> (acesso em 10/11/2007).

EPA - United States Environmental Protection Agency { HYPERLINK
"<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=20552>" } (acesso em
10/11/2007).

FARMER, P.B.; LAUDER, I.; O' CONNOR, S.R.; Benzene and non-Hodgkin's
lymphoma. **Pathol**, vol. 189: 448-453, 1999.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdan v.
455: 81-95. 2000.

FORNI, A.; Benzene-induced chromosome aberrations: a follow-up study. **Envirnm.**
Health Perspectives, vol. 104, supplement 6, 1996.

GOWANS, I.D.; LARIMORE, S.A.; MCILRATH, J.M.; WRIGHT, G.; Genotype-
dependent induction of transmissible chromosomal instability by γ -radiation and
the benzene metabolite hydroquinone. **Cancer Research**, vol. 65: (9), 2005.

{ HYPERLINK
"<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Grandjean%20P%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.P>"

ubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }.;
Individual susceptibility to toxicity. { **HYPERLINK**
"javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'Toxicol%20Lett.');" }, vol.64-65:
Spec No:43-51.

HINWOOD, A.L.; RODRIGUEZ, C.; RUNNION, T.; FARRAR, D.; MURRAY, F.;
HORTON, A.; GLASS, D.; SHEPPEARD, V.; EDWARDS, J.W.; DENISON, L.;
WHITWORTH, T.; EISER, E.; BULSARA, M.; GILLETT, R.W.; POWELL, J.;
LAWSON, S.; WEEKS, I.; GALBALLY, I.; Risky factors for increased BTEX
exposure in four Australian cities. **Chemosphere**, vol. 66: 533-541, 2007.

HOLECKOVÁ, B.; PIESOVA, E.; SIVIKOVA, K.; DIANOVSKY, D.; Chromosomal
aberrations in humans induced by benzene. **Ann. Agric. Environ. Med.**, vol. 11:
175-179, 2004.

IARC, 1982; Some industrial chemicals and dyestuffs. Benzene. In: IARC Monographs
on the evolution of carcinogenic risk to humans, vol. 29. IARC, Lyon, pp.93-148.

IARC, 1987; Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.
Supplement 7. Overall Evaluation of Carcinogenicity. An updating of IARC
Monographs Volumes 1 to 42. IARC, Lyon, France, pp. 120-122.

INFANTE, P.F.; WHITE, M.C.; Benzene: epidemiologic observations of leukemia by
cell type and adverse health effects associated with low-level exposure. **Environ.**
Health Perspectives, vol. 52: 75-82, 1983.

KIM, J.K.; SHIN, H.S.; LEE, J.H.; LEE, J.J.; Genotoxic effects of volatile organic
compounds in a chemical factory as evaluated by the *Tradescantia* micronucleus
assay and by chemical analysis. **Mutation Research**, vol. 541: 55-61, 2003.

KIRKELEIT, J.; RIISE, T.; BRATVEIT, M.; PEKARI, K.; MIKKOLA, J.; MOEN, B.E.; Biological monitoring of benzene exposure during maintenance work in crude oil cargo tanks. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 164: 60-67, 2006.

LAFFON, B.; FRAGA-IRISO, R.; PÉREZ-CADAHÍA, B.; MÉNDEZ, J.; Genotoxicity associated to exposure to Prestige oil during autopsies and cleaning of oil-contaminated birds. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 44: 1714-1723, 2006.

LI, G.X.; HIRABAYASHI, Y.; YONN, B.; KAWASAKI, Y.; TSUBOI, I., KODAMA, Y.; KUROKAWA, Y.; YODOI, J.; KANNO, J.; INOUE, T.; Thioredoxin overexpression in mice, model of attenuation of oxidative stress, prevent benzene-induced hemato-lymphoid toxicity and thymic lymphoma. **Experimental hematology**, vol. 34: 1687-1697, 2006.

LING, L.C.; BUTTERY, R.G.; SEIFERT, R.M.; Characterization of some volatile constituents of dry red beans. **L Agric. Food Chem.**, vol. 23: 516-519, 1975.

MANN WHITNEY-U - Programa Estatístico: { [HYPERLINK "http://en.wikipedia.org/wikimann-whitney_u"](http://en.wikipedia.org/wikimann-whitney_u) }.

MARCON, F.; ZIJNO, R.; CREBELLI, R.; CARERE, A.; VEIDEBAUM, T.; PELTONEN, K.; PARKS, R.; SCHULER, M.; EASTMOND, D.; Chromosome damage and aneuploidy detected by interphase multicolor FISH in benzene-exposed shale oil workers. **Mutation Research**, vol. 445: 155-166, 1999.

MARTINO-ROTH, M.G.; VIÉGAS, J.; AMARAL, M.; OLIVEIRA, L.; FERREIRA, F.L.S.; ERDTMANN, B.; Evaluation of genotoxicity through micronuclei test in workers of car and battery repair garages. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 25(4): 495-500, 2002.

{ [HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2)

2Micillino%20JC%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.P
ubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2
2Coulais%20C%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pub
med_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2
2Binet%20S%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubme
d_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2
2Bottin%20MC%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pub
med_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2
2Keith%20G%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubm
ed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2
2Moulin%20D%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pub
med_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2
2Rihn%20BH%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubm

ed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }; Lack of genotoxicity of bitumen fumes in transgenic mouse lung. { **HYPERLINK** "javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'Toxicology.');" }, vol. 170(1-2):11-20, 2002.

Ministério do Trabalho e Emprego –

http://www.mte.gov.br/legislação/portarias/2004/p_20040428-775.asp

MINITAB – Programa Estatístico { **HYPERLINK** <http://www.minitabbrasil.com.br> }.

NTP, 1999. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ethylbenzene (CAS No. 100-41-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). **Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser**, vol. 466:1–231.

OLIVEIRA-MARTINS, C.R.; GRISOLIA, C.K.; Determination of micronucleus frequency by acridina orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated topically with different lubricant oils and cyclophosphamide. **Genetics and Molecular Research**, 6 (3): 566-574, 2007.

RABELLO-GAY, M. N. Teste de micronúcleo em medula óssea. In: Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. **Sociedade Brasileira de Genética** (ed) pp 83- 90. 1991.

ROMA-TORRES, J.; TEIXEIRA, J.P.; SILVA, S.; LAFFON, B.; CUNHA, L.M.; MÉNDEZ, J.; MAYAN, O.; Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. **Mutation Research**, vol.604: 19-27, 2006.

SANTOS-MELO, R.; E CALVACANTI, B.; Cytogenetic studies on gas station attendants. **Mutation Research**, vol.280: 285-290, 1992.

SASIADEK M.; Nonrandom distribution of breakpoints in the karyotypes of workers occupationally exposed to benzene. **Environ Health Persp**, vol. 97, 255-257, 1992.

SCHNATTER, R.; Petroleum worker studies and benzene risk assessment. **J. Toxicol. Environ. Health, Part A**, vol. 61: 433-437, 2000.

SHAHAM, J.; GURVICH, R.; KAUFMAN, Z.; Sister chromatid exchange in pathology staff occupationally exposed to formaldehyde. **Mutation Research**, vol. 15: 115-123, 2002.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, 31: 9-15. 1975.

SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. **McGraw-Hill**, Rio de Janeiro, 1975.

SOLOMONS & FRYHLE. Organic Chemistry. 8º Edição, 2003.

SOUZA, T. DA S.; FONTANELLI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluents. **Mutation Research**, 605:87-93. 2006.

SPSS/PC-V4.0. Base Manual, SPSS, Chicago, IL, 1990.

SURRALLES, J.; AUTIO, K.; NYLUND, L.; JARVENTAUS, H.; NORPPA, H.; VEIDEBAUM, T.; SORSA, M.; PELTONEN, K.; Molecular cytogenetic analyses of bucal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. **Carcinogenesis**, nº 4, vol. 18:817-823, 1997.

{ HYPERLINK
"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%20Testa%20A%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }, {
HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2Ranaldi%20R%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }, {
HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2Carpineto%20L%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }, {
HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2Pacchierotti%20F%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }, {
HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2Tirindelli%20D%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }, {
HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2Fabiani%20L%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }, {
HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2Giuliani%20AR%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }, {
HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2

2Urso%20M%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }, {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2

2Rossini%20A%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }, {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2

2Materazzo%20F%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }, {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2

2Petyx%20M%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }, {

HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%2

2Leoni%20V%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus" }.

Cytogenetic biomonitoring of workers from laboratories of clinical analyses occupationally exposed to chemicals. { **HYPERLINK**

"javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'Mutat%20Res.');" }, vol. 26: 520(1-2):73-82, 2002.

TICE, R.R.; COSTA, D.L.; DREW, R.T.; Cytogenetic effects of inhaled benzene in murine bone marrow: induction of sister chromatid exchanges, chromosomal

aberrations, and cellular proliferation inhibition in DBA/2 mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n° 4, vol. 77:2148-2152, 1980.

TURKEL, B.; E EGELI, U.; Analysis of chromosomal aberrations in shoe workers exposed long term to benzene. **Occupational and Environmental Medicine**, vol. 51: 50-53, 1994.

USEPA, 2004. Integrated Risk Information System (IRIS) Substance List Website. United States Environmental Protection Agency, Office of research and development, National Center for Environmental Assessment, USA.

VERMEULEN, R.; LAN, Q.; LI, G.; RAPPAPORT, S.M.; KIM, S.; JOODE, B. W.; SHEN, M.; BOHONG, X.; SMITH, M.T.; ZHANG, L.; YIN, S.; ROTHMAN, N.; Assessment of dermal exposure to benzene and toluene in shoe manufacturing by activated carbon cloth patches. **J. Environ. Monit.**, vol. 8: 1143-1148, 2006.

ZHANG, L.; VENKATESH, P.; CREEK, M.L.; SMITH, M.T.; Detection of 1,2,4-benzenetriol induced aneuploidy and microtubule disruption by fluorescence *in situ* hybridization and immunocytochemistry. **Mutation Research**, vol.320: 315-327, 1996.

ZHANG, L.; ROTHAMAM, N.; WANG, Y.; HAYES, R.B.; YIN, S.; TITENKO-HOLLAND, N.; DOSEMECI, M.; WANG, Y.Z.; KOLACHANA, P.; LU, W.; XI, L.; LI, G.L.; SMITH, M.T.; Benzene increase aneuploidy in the lymphocytes of exposed workers: a comparison of data obtained by fluorescence *in situ* hybridization in interphase and metaphase cells. **Environ. Mol. Mutagen.**, vol. 34: 260-268, 1999.

WAN, J.X.; ZHANG, Z.B.; GUAN, J.R.; CAO, D.Z.; YE, R.; JIN, X.P.; Genetic polymorphism of toxicant-metabolizing enzymes and prognosis of Chinese

workers with chronic benzene poisoning. **Ann. N.Y.Acad. Sci.**, vol. 1076: 129-136, 2006.

WEBCALC – { HYPERLINK "<http://www.webcalc.com.br>" } – acesso em 25/11/2007.

WHO, Environmental Health Criteria 52: Toluene, World Health Organization, Geneva, 1986.

WHO, Environmental Health Criteria 150: Benzene, World Health Organization, Geneva, 1993.

WHO, Environmental Health Criteria 190: Xylenes, World Health Organization, Geneva, 1997.

WHO, Environmental Health Criteria 202: Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. World Health Organization, Geneva, 1998.

WHO, Benzene in: WHO (Eds.), Air quality guidelines, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, 2000.

YOON, B.; HIRABAYASH, Y.; KAWASAKI, Y.; KODAMA, Y.; KANEKO, T.; KANNO, J.; KIM, D.; FUJII-KURIYAMA, Y.; INOUE, Y.; Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity. **Toxicol. Sci.**, vol. 70: 150-156, 2002.

10. ANEXOS

Anexo 1.

Tabela 01: Instituições conveniadas com ANP para realização do controle de qualidade dos combustíveis.

UF	Número de Postos (*)	Instituição	Amostras/ano
AC	118	UNIR	358
AL	401	(1)	1.765
AM	436	UFAM	1.962
AP	92	UFPA	358
BA	1.909	(1)	11.463
CE	1.073	(1)	6.687
DF	306	CPT	2.105
ES	610	(1)	3.929
GO	1.290	CPT	5.761
MA	763	UFMA	3.786
MG	4.047	CETEC UFMG	20.565
MS	568	(1)	4.165
MT	881	UFMT	5.217
PA	766	UFPA	3.096
PB	609	UFRN	3.950
PE	1.216	(1)	6.154
PI	584	(1)	2.779
PR	2.688	UFPR	15.883
RJ	2.075	UFRJ	8.807
RN	529	UFRN	3.961
RO	401	UNIR	2.051
RR	93	UFAM	560
RS	2.891	UFRGS	15.035
SC	1.966	FURB/IPTB	8.361
SE	232	(1)	999
SP	8.317	IPT/SP UFSCar UNESP UNICAMP	48.974
TO	294	CPT	1.179
TOTAL	35.155		189.910

(*) Atualizado em 14/01/2007

(1) UF sem contrato de monitoramento vigente em Janeiro de 2007.

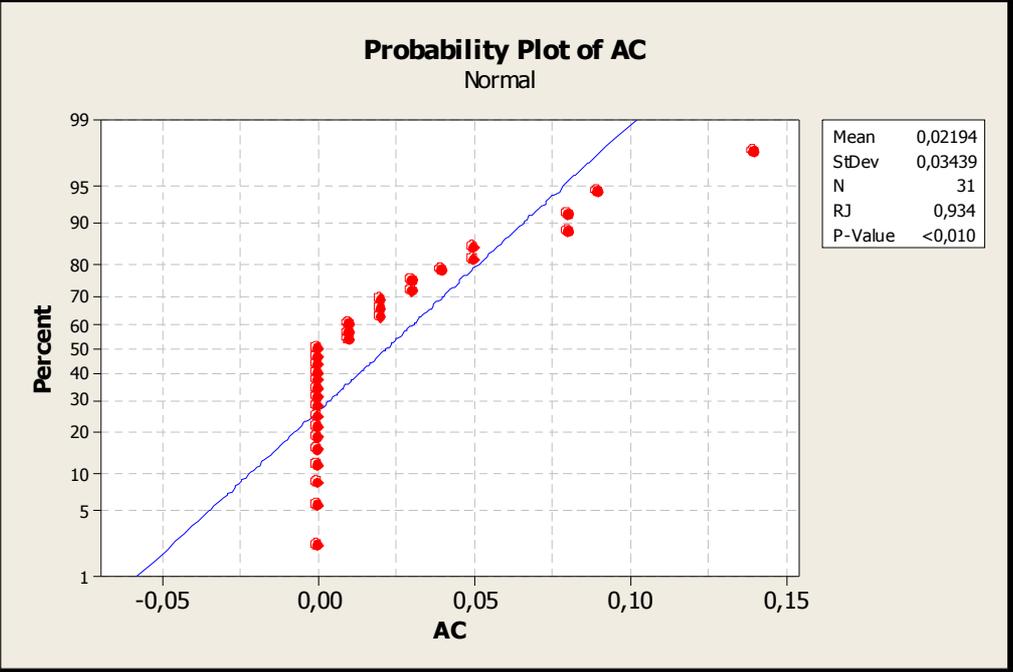
Anexo 2. Modelo do questionário preenchido pelos funcionários da ANP e pelos controles.

Questionário

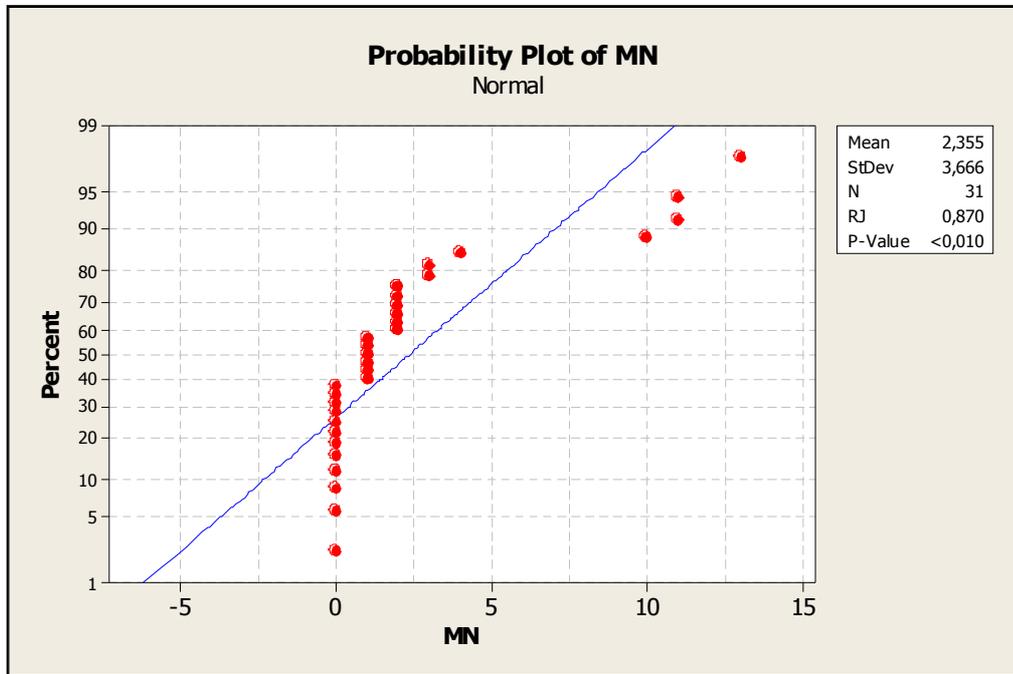
Este questionário visa o conhecimento sobre alguns aspectos do estilo de vida e condições de saúde, que podem influenciar nos resultados do nosso estudo. As informações aqui presentes **serão mantidas em sigilo** e visam unicamente ao suporte para a metodologia empregada no estudo e para a análise dos resultados obtidos. Estas informações não serão usadas, em hipótese alguma com outros objetivos, além daqueles mencionados no projeto, ficando a sua guarda sob a inteira responsabilidade do coordenador.

1. **Nome:** _____
 2. Profissão: _____
 3. Idade: _____
 4. Naturalidade: _____
 5. Sexo: _____
 6. Profissão atual: _____
 7. Estado civil: _____
 8. Grau de instrução: _____
 9. **Endereço completo:** _____
 10. Tabagismo: () sim () não, número de cigarros/dia _____
Duração _____ (anos)
Parou de fumar há _____ (anos)
 11. Etilismo: () sim () não, frequência _____ (anos)
 12. Uso de medicamentos _____ (especificar)
- Submeteu-se a algum tipo de exame radiológico nos últimos 6 meses (radio X, radioterapias ou exames com isótopo radioativo). **Especifique:** _____
13. Episódio de exposição acidental a substâncias químicas.
Especifique: _____
 14. Exposição ocupacional a substâncias químicas. Se sim, quanto tempo e quantas horas semanais?
Especifique: _____
 15. Antecedentes familiares com algum tipo de doença crônica degenerativa.
Especifique: _____
 16. Antecedentes familiares com doença genética.
Especifique: _____
 17. Tempo de trabalho na ANP: _____
Data de início: _____
(caso necessário, use o verso dessa folha para melhor especificar sua resposta)

Anexo 3. Gráfico com o Teste de Normalidade com os dados de aberrações cromossômicas entre indivíduos expostos e controles.



Anexo 4. Gráfico com o Teste de Normalidade com os dados de micronúcleos entre indivíduos expostos e controles.



Brasília, fevereiro de 2008.

Prof.º Cesar Koppe Grisolia

Ana Elizabeth Oliveira de Araújo