



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – CSHNB
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - MODALIDADE LICENCIATURA

Lourran Paula Lacerda

**ESTUDO DE TOXICOLOGIA OCUPACIONAL COM ÊNFASE A ATIVIDADE
CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA EM TRABALHADORES COM EXPOSIÇÃO À
GASOLINA**

**Picos
2014**

LOURRAN PAULA LACERDA

**ESTUDO DE TOXICOLOGIA OCUPACIONAL COM ÊNFASE A ATIVIDADE
CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA EM TRABALHADORES COM EXPOSIÇÃO À
GASOLINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para obtenção do Grau de Graduado em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Msc. João Marcelo de Castro e Sousa

**Picos
2014**

Eu, **Lourran Paula Lacerda**, abaixo identificado(a) como autor(a), autorizo a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação abaixo discriminada, de minha autoria, em seu site, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, a partir da data de hoje.

Picos-PI, 14 de agosto de 2014.


Assinatura

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca José Albano de Macêdo

L131e Lacerda, Lourran Paula
Estudo de toxicologia ocupacional com ênfase a
atividade citotóxica e mutagênica em trabalhadores com
exposição à gasolina / Lourran Paula Lacerda – 2014
CD-ROM il. 4 ¼ pol. (35 p.)

Monografia(Licenciatura em Ciências Biológicas) –
Universidade Federal do Piauí Picos-PI. 2014.
Orientador(A) Prof. MSC. João Marcelo de Castro e Sousa

1 Exposição Ocupacional 2 Genotoxicidade 3 Morte
Celular 4 Toxicologia I Título

CDD 615.9

Lourran Paula Lacerda


**ESTUDO DE TOXICOLOGIA OCUPACIONAL COM ÊNFASE A ATIVIDADE
CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA EM TRABALHADORES COM EXPOSIÇÃO
À GASOLINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para obtenção do Grau de Graduado em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Msc. João Marcelo de Castro e Sousa

Aprovado em 01/08/14

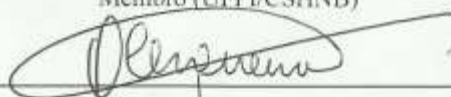
BANCA EXAMINADORA:



Prof.º Msc. João Marcelo de Castro e Sousa.
Orientador (UFPI/CSHNB)



Prof.º Dr.º Ana Paula Peron
Membro (UFPI/CSHNB)



Prof.º Dr. Gilberto Santos Cerqueira
Membro (UFPI/CSHNB)

A toda minha família amada, em especial meus pais, Marinho e Lígia, pelo exemplo de amor, dedicação, apoio, incentivo e confiança. Com todo o carinho e imensurável gratidão, dedico-lhes esse trabalho de valor inestimável em minha jornada profissional.

AGRADECIMENTOS

Saber agradecer é uma atitude de reconhecimento e carinho por todos aqueles que de alguma maneira contribuíram à realização desta obra. A gratidão é uma dívida emocional impagável. A sincera gratidão é respeito e consideração, que reforça laços que se eternizam.

Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu tudo isso, ao longo de toda a minha vida, por ter me dado condições de lutar e alcançar os objetivos pretendidos. É a Ele que dirijo minha maior gratidão.

Aos meus pais, Marinho e Lígia que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, em especial a minha mãe, minha rainha, que nunca mediu esforços em detrimento da minha educação. Aos meus irmãos John, Marina e Maria Paula por todo amor e compreensão que tiveram comigo nesta jornada.

Aos meus tios José de Anchieta, Wilson, Ciro Jr e Rogério, pela contribuição e incentivo. Às minhas amadas primas Rhanna, Sibéria e Drielle pelas alegrias e apoio. E ao meu primo Israel.

Ao meu orientador Msc. João Marcelo, por todo o aprendizado que me concedeu, pela compreensão, dedicação, mérito, paciência e boa vontade, sempre estando disponível a contribuir com minha aprendizagem. Muito Obrigada!

À Prof^ª. Dr. Ana Paula Peron, pelas conquistas e oportunidades de crescimento pessoal e profissional que me foram dados durante o curso com o NUPBSAM e também pela confiança. A você sou muito grata!

À Iago Araújo, por sempre ter me apoiado, motivado e ajudado na realização dessa etapa tão importante.

À Ellifran Dantas, que ajudou durante todo o trabalho e pelo companheirismo nesses cinco anos, pois amizade é tudo!

Ao PIBID pela concessão da bolsa de iniciação a docência, que muito contribuiu na minha formação. E aos Frentistas que aceitaram participar desse estudo. Muito Obrigada!

Aos meus tantos amigos pelas alegrias, parcerias, apoio, compreensão, pelos ótimos momentos: Bia, Susana, Eliane, Aninha, Ícaro, Danylo Leite, Laís, Ronielsom, Terthu. Especialmente aos Amigos da minha turma, que estiveram mais próximos nesse período da minha vida, que me proporcionaram tantos risos, momentos inesquecíveis, carinho e amizade: Laianny, Ykaro, Geiz, Aline, Walquíria, Paulo Henrique, Gleuvania, tempo nenhum apagará o que juntos passamos, o que juntos vivemos!

Enfim, a todos que contribuíram direto ou indiretamente para a realização desta obra!

“O segredo da felicidade está em olhar todas as maravilhas do mundo e nunca se esquecer da sua missão ou do seu objetivo.”

(Paulo Coelho)

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	8
1.1 Câncer de boca.....	8
1.2 Exposição Ocupacional.....	9
1.3 Postos Revendedores de Combustíveis.....	10
1.4 Exposição aos Derivados do Petróleo.....	11
1.5 Técnicas citogenéticas para estudo de mutagênese	12
2. DESENVOLVIMENTO (Anexação do Artigo)	14
2.1 INTRODUÇÃO	15
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.2.1 Tipo do estudo e População-Alvo.....	16
2.2.2 Amostra.....	16
2.2.3 Teste de micronúcleo e análise dos dados	17
2.2.4 Análise Estatística.....	17
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	24
Anexo – Questionário	29

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Câncer de boca

O câncer é uma doença genética uma vez que é desencadeado por alterações no DNA da célula. No entanto, ao contrário das demais síndromes genéticas humanas, o câncer não é uma doença necessariamente hereditária. Na sua grande maioria, os cânceres humanos são de origem somática resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais (QUEIROGA; PERNAMBUCO, 2006; MONTEIRO et al., 2009).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer no Brasil (INCA, 2014), a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, reforçando assim, a magnitude do problema do câncer no país. Estimam-se 395 mil casos novos de câncer, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para sexo feminino. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e câncer de boca; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide.

Assim como as demais neoplasias malignas, o câncer de boca define-se como uma doença crônica multifatorial, resultante da interação dos fatores etiológicos que afetam os processos de controle da proliferação e crescimento celular. Esse processo está aliado às alterações nas interações entre as células e seu meio ambiente. O câncer de boca é considerado o câncer mais comum da região de cabeça e pescoço, excluindo o câncer de pele (DEDIVITIS et al., 2008). A grande maioria dos casos é detectada em estágios avançados. Isto aumenta a gravidade da seqüela do tratamento e diminui a sobrevida e a possibilidade de cura dos pacientes (PARTRIDGE, 2000; GUERRA et al., 2005).

O câncer de boca é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo. Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer bucal em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres. Ocupa o quinto lugar geral entre a população masculina (INCA, 2014).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014), os fatores de risco do câncer podem ser encontrados no meio ambiente ou podem ser herdados. A maioria dos casos de câncer (80%) está relacionada ao meio ambiente, no qual encontra-se um grande número de fatores de risco. A má qualidade do ar no ambiente de trabalho é um fator importante para o câncer ocupacional. Durante pelo menos oito horas por dia os trabalhadores estão expostos

ao ar poluído, pondo seriamente em risco a saúde. Algumas substâncias como o benzeno, que pode ser encontrado como contaminante na produção de carvão, postos de combustíveis, e é usado como solvente de tintas e colas atinge principalmente a medula óssea, podendo provocar leucemia, entre outros danos a saúde, especificamente relacionados a essa exposição ocupacional.

No que se refere à exposição ocupacional, esta acontece quando o trabalhador, em sua atividade, entra em contato com substâncias que podem causar algum dano em seu organismo, sendo os efeitos imediatos ou tardios, e determinantes ainda o manuseio da substância, o ambiente e as condições de trabalho. Os trabalhadores de postos de combustíveis são exemplos de exposição diária a essas substâncias (OGA, 2008).

Deve-se considerar, ainda, que as neoplasias malignas podem ter origem em todos os tecidos que compõem a boca, porém, aquelas originárias do tecido epitelial de revestimento são as mais comuns, por sua maior exposição à ação de agentes potencialmente carcinogênicos, presentes muitas vezes no ambiente de trabalho. Os tecidos epiteliais entram em contato direto com substâncias genotóxicas inaladas, esta condição caracteriza que a maioria dos tumores é iniciada especificamente por células epiteliais (FENECH et al., 1999). De acordo com ATSDR (2003) a exposição humana a essas substâncias ocorre principalmente através da inalação do ar contaminado.

1.2 Exposição Ocupacional

A Toxicologia Ocupacional estuda os efeitos nocivos causados por substâncias químicas presentes no ambiente de trabalho, prevenindo prejuízos a longo prazo e procurando entender as relações causais entre exposição e efeito para que se possa atuar nas etapas iniciais do processo, quando os danos fisiopatológicos ainda são reversíveis (BULCÃO et al., 2008).

Segundo Câmara e Galvão (1995) a exposição ocupacional é o período em que o ser humano se encontra suscetível à contaminação por xenobióticos que estão presentes no ambiente de trabalho. Em que essas substâncias podem ser absorvidas através das vias respiratória, cutânea e digestiva, sendo que no caso dos solventes orgânicos, a absorção ocorre pela via respiratória e/ou cutânea, sendo predominantemente pela via respiratória (BERTONCELLO, 1999).

A exposição a agentes químicos faz parte da vida do homem moderno, onde cerca de 100.000 substâncias são usadas nas mais diversas atividades, sendo que muitas delas só

tiveram sua toxicidade determinada após algum tempo de sua utilização (MILITÃO; RAFAELI, 2007; ARAÚJO, 2008).

A utilização de substâncias químicas como, solventes orgânicos, no meio ocupacional representa significativo risco à saúde do trabalhador, sendo que o uso desses compostos é bastante amplo em pequenas, médias e grandes indústrias, no meio rural e laboratorial (OGA et al., 2003).

A presença de contaminantes no ar ambiente de trabalho causa uma preocupação particular devido à natureza contínua da exposição (PIRES; CARVALHO, 1999). Desta forma os produtos derivados do petróleo, como a gasolina e o óleo diesel representam uma importante fonte de contaminação do ar nos grandes centros urbanos e principalmente um risco a trabalhadores que estão em contato frequente com essas substâncias. Trabalhadores de postos revendedores de combustíveis são potencialmente expostos a hidrocarbonetos voláteis, seja derivado de petróleo, como a gasolina, ou de outros componentes orgânicos, como o caso do álcool (ABRANTESA et al ., 2005).

1.3 Postos Revendedores de Combustíveis

Os postos revendedores de combustíveis são instalações que praticam a atividade de revenda varejista de combustíveis líquidos derivados do petróleo, álcool combustível e outros combustíveis automotivos (CONAMA, 2000).

No Brasil, o transporte rodoviário predomina, e o petróleo além de ser a maior fonte de energia fóssil é também o mais importante e indispensável fonte dos combustíveis utilizados nesse tipo de transporte. Nesse sentido, é de vital importância para a economia do país a existência da cadeia de postos de abastecimento de combustíveis, estrategicamente, disposta em todo território nacional (LORENZETT; ROSSATO, 2010).

As atividades de um posto de revenda de combustível são bastante diversificadas e envolvem não só o abastecimento, mas também a troca de óleo, lavagem de veículo, entre outras. Portanto, pode-se denominá-lo posto revendedor de combustíveis derivados de petróleo, álcool e prestação de serviços (BARROS et al ., 2008). Segundo o Sindicom (2010) a cada ano mais de 500 postos revendedores de combustíveis legais e ilegais surgem no país e esse número só aumenta.

As atividades de revenda e abastecimento de veículos são importantes fontes de emissão de compostos orgânicos voláteis, dentre estes destacam-se o grupo de componentes

aromáticos da gasolina constituída por benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), os quais constituem um risco potencial para frentistas e usuários (CRUZ-NUNES et al., 2003).

Estes compostos, com facilidade são inalados pelos frentistas que ficam expostos a esses derivados do petróleo durante o processo de abastecimento dos veículos e exaustão dos carros sendo considerados como poderosos depressores da saúde humana, mesmo em baixas concentrações (BUCZYNSKA et al., 2009).

1.4 Exposição aos Derivados do Petróleo

Dentre os principais produtos derivados do petróleo, a gasolina é um dos combustíveis de maior consumo no país e no mundo. A gasolina automotiva consiste na mistura complexa de hidrocarbonetos voláteis e inflamáveis. As frações benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno (BTEX) além de outros compostos orgânicos voláteis, são encontrados na gasolina comercial. Entretanto, a composição dos combustíveis comercializados altera de acordo com a utilização, a origem, os processos de refino de petróleo e o uso de aditivos específicos, onde a fração BTEX é a principal responsável pelos danos à saúde e apresentam toxicidade crônica mesmo em pequenas concentrações, podendo levar à lesões do sistema nervoso central (BRITO et al., 2005; GOUVEIA; NARDOCCI, 2007; SILVA et al., 2009)

A ação do benzeno em organismos vivos é conhecida e os efeitos deletérios a exposições agudas estão bem descritas. Estudos demonstram desde o início do século XX o efeito leucemogênico do benzeno, onde alterações cancerígenas foram observadas, a partir de estudos experimentais em animais (CAZARIN, 2005; ARAÚJO, 2008). Segundo os critérios do Programa das Nações Unidas de Segurança Química o benzeno é considerado a quinta substância de maior risco por ser reconhecido como agente nocivo à saúde humana, sendo que a sua principal fonte de exposição se dá no ambiente ocupacional, em especial, por meio da via respiratória. A exposição humana a esta substância é capaz de causar intoxicação aguda ou crônica, com efeitos imunotóxico, genotóxico e carcinogénico, mesmo em doses baixas, o que impede o reconhecimento ou a recomendação de um limite seguro de exposição (GONÇALVES et al., 2005; GRACIANI et al., 2008)

Os sinais neurológicos em seres humanos associados ao benzeno incluem tontura, cefaleia e até perda de consciência. Em forma de vapor o benzeno pode irritar a pele, os olhos e o trato respiratório superior. Nas intoxicações por benzeno as alterações na medula óssea são imediatas. Sendo muito volátil e reconhecidamente tóxico ao homem, por mais que se

cumpram as normas de segurança, como o uso de equipamento de proteção individual, o risco da exposição é permanente (ARAÚJO, 2008).

O xileno em forma de vapor pode provocar irritação nos olhos, nariz e garganta. Se inalado, pode causar tontura, dificuldade respiratória ou perda da consciência (ROMA-TORRES et al., 2006). No que se diz a respeito sobre a exposição ocupacional ao tolueno, estudos indicam que sua principal ação tóxica ocorre no sistema nervoso central, sendo bem conhecida sua neurotoxicidade. Em exposições crônicas induz também hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (GRACIANI et al., 2008).

O monitoramento citogenético é utilizado para avaliar os riscos ocupacionais que não são observados nos exames clínicos rotineiros e de laboratório. Em casos de exposições 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 frequentes exposições são importantes para determinar riscos possíveis de carcinogenicidade, antes que os danos no DNA se tornem irreversíveis. Sabe-se que há uma associação entre o aumento de danos no DNA com o aumento do risco para o câncer e dessa forma torna-se importante o monitoramento citogenético em indivíduos expostos ocupacionalmente às substâncias tóxicas que apresentem riscos de carcinogenicidade (LI et al., 2006)

1.5 Técnicas citogenéticas para estudo de mutagênese

Os testes citogenéticos para avaliação de mutagenicidade são importantes biomarcadores de exposição, pois correspondem à expressão de um agente ambiental. Por isso, vêm sendo utilizados no monitoramento biológico de populações expostas a substâncias genotóxicas (KOHATSU et al., 2007).

O estudo de biomarcadores de exposição, também considerados por alguns autores como biomarcadores de efeito precoce, inclui a detecção direta, ao microscópio, de danos no DNA. Vários testes citogenéticos podem ser aplicados para esse fim, como trocas entre cromátides irmãs (SCE-sister chromatid exchange), teste do Cometa, também conhecido como teste de célula única em gel de agarose (SCGE – Single Cell Gel Electrophoresis), teste de aberrações cromossômicas (CA) e o teste do micronúcleo (MN) (AU et al., 2005).

Os testes de mutagenicidade visam identificar aumento na incidência de mutações em populações de risco, comparadas com grupos-controle (HAGMAR et al., 2001). O teste do micronúcleo vem sendo utilizado no monitoramento biológico de populações humanas, expostas aos agentes mutagênicos e carcinogênicos. Os Micronúcleos são estruturas

extranucleares compostas por cromossomos ou fragmentos do mesmo que, durante a mitose não foram incorporados ao núcleo principal. Durante a telófase, um envoltório nuclear forma-se em todos os cromossomos perdidos e/ou fragmentos de cromossomos, os quais se desespiralizam e gradualmente assumem a morfologia de um núcleo interfásico, com exceção do tamanho, sendo esse menor que o núcleo principal, surgindo daí o nome micronúcleo. O teste do micronúcleo é considerado, por vários autores, como um teste auxiliar rápido e econômico na análise de aberrações cromossômicas (FENCH, 2000).

Os micronúcleos são observados somente em células que apresentam capacidade de divisão, sendo que a frequência destes depende da cinética celular e do tecido em estudo. Dentre os tipos celulares utilizados para o teste do micronúcleo incluem-se os linfócitos de sangue periférico, cultivados *in vitro* e tratados com citocalasina-B, células epiteliais da mucosa bucal, entre outros. A análise de células epiteliais é um método não invasivo que permite coletas sucessivas, e um estudo direto das células da camada basal que sofreram mutação, em média, até 20 dias após a exposição. Além disso, o estudo de micronúcleos em linfócitos necessita de estímulo para que estes entrem em divisão, ao contrário das células epiteliais, que estão em constante renovação (KATO et al., 2002; GALIOTTE, 2006).

As células da mucosa bucal tem capacidade metabolizadora e, por se tratar da primeira barreira contra substâncias tóxicas e mutagênicas, ingeridas ou inaladas, são consideradas sistemas importantes para a avaliação de danos no DNA. A análise citogenética utilizando células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal confere diversas vantagens, pois, além de ser alvo primário de exposição, a obtenção minimamente invasiva possibilita o monitoramento de populações expostas a agentes genotóxicos (HOLLAND et al., 2008).

Nesse sentido, alguns pesquisadores tem utilizado o teste do micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral para a identificação de indivíduos com displasia e, portanto, com risco aumentado para a transformação maligna (SARAN et al, 2008).

2. DESENVOLVIMENTO (Anexação do Artigo)

Estudo de toxicologia ocupacional com ênfase a atividade citotóxica e mutagênica em trabalhadores com exposição à gasolina

Lourran Paula Lacerda¹; Ellifran Bezerra de Siqueira Dantas¹; Gilberto Santos Cerqueira², Ana Paula Peron³, João Marcelo de Castro e Sousa³

1. Graduandos do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, CSHNB. CEP: 64.607.670. Picos-PI, Brasil.

2. Professor do Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, CSHNB- Picos. CEP: 64.607.670. Picos-PI, Brasil.

3. Professores do Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, CSHNB- Picos. CEP: 64.607.670. Picos-PI, Brasil.

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo analisar os efeitos citotóxicos e mutagênicos do benzeno e seus derivados em células esfoliadas da mucosa bucal de frentistas de postos de combustíveis expostos diariamente à gasolina que em sua composição contém benzeno, etilbenzeno, tolueno e xileno (chamados BTEX). O estudo foi realizado através do levantamento de dados, aplicação de questionários de saúde e análise citogenética, através da aplicação do teste de micronúcleo em células da mucosa oral. A população estudada foi composta de um Grupo Teste, constituída de 20 frentistas, expostos ao benzeno e seus derivados da cidade de Picos-PI/Brasil e um Grupo Controle, composto por 20 indivíduos previamente selecionados, após análise dos dados de saúde e estilo de vida. Os resultados deste estudo mostraram que a frequência de micronúcleos dos pacientes expostos à gasolina foi significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo não exposto. Indicativos de apoptose também foram observados pelos mecanismos de fragmentação e de dissolução nuclear em todos os pacientes expostos da amostra. Os dados foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$) pelo aumento de cariorrexe e de cariólise, quando comparado aos indivíduos não expostos. Os BTEX também induziram citotoxicidade em epitélio bucal de indivíduos expostos ($p < 0,001$) pelo aumento da frequência de células binucleadas. Resultados estes semelhantes aos reportados na literatura, com relação ao efeito mutagênico e citotóxico desses compostos. Além disso, observou-se que nenhum dos indivíduos do grupo teste utiliza EPIs e nem conhecem a ação tóxica desses compostos. Com a obtenção dos resultados, faz-se necessário um esclarecimento aos trabalhadores que são expostos aos BTEX da ação mutagênica e citotóxica dos mesmos, enfatizando a importância da utilização dos EPIs haja vista o risco para saúde que essa exposição pode trazer.

Palavras-chave: Câncer. Morte celular. Genotoxicidade

Abstract

This study aimed to analyze the genotoxic effects of benzene and its derivatives in exfoliated buccal mucosa cells of the fuel station attendants exposed daily to gasoline that its composition contains benzene, ethylbenzene, toluene and xylene (BTEX called). The study was conducted through survey data, questionnaires and health cytogenetic analysis, by use of the micronucleus test in oral mucosa cells. The study population consisted of a test group

formed of 20 attendants exposed to benzene and its derivatives in City Picos-PI/Brazil, and one control group consisted of 20 individuals previously selected after analysis of health data and lifestyle. The results of this study showed that the frequency of micronuclei of patients exposed to gasoline was significant ($P < 0.001$) compared to the unexposed group. Indicative of apoptosis were also observed in the mechanisms of nuclear fragmentation and dissolution in all patients exposed in sample. The data were statistically significant ($P < 0.001$) by increasing and karyorrhexis karyolysis when compared to individuals not exposed. The BTEX also induced cytotoxicity in oral epithelium of exposed individuals ($P < 0.001$) with an increase in the frequency of binucleated cells. These results were similar to those reported in the literature regarding the mutagenic and cytotoxic effects of these compounds. Moreover, it was observed that none of the test subjects group uses PPE and they don't know the toxic action of these compounds. After obtaining the results, it is necessary clarification of mutagenic and cytotoxic action of BTEX to exposed workers, emphasizing the importance of using PPE considering the risk to health that can bring BTEX.

Key words: Cancer. Cell death. Genotoxicity

2.1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença genética que se manifesta pelo acúmulo de mutações no DNA no decorrer de um espaço de tempo. No ambiente de trabalho podem ser encontrados agentes químicos, físicos e biológicos capazes de causar problemas aos trabalhadores e desencadear vários tipos de câncer como o de boca, pele, laringe, entre outros. Nesse sentido, as exposições ocupacionais podem atuar como agentes silenciosos na indução de danos no DNA, sendo crescente, por exemplo, o número de processos produtivos que são considerados potencialmente cancerígenos (GATTÁS, 2006).

Pode-se citar como exemplo de ambiente de risco postos de combustíveis uma vez que os trabalhadores destes locais estão expostos a diversos compostos altamente tóxicos como, por exemplo, a gasolina que possuem em sua composição benzeno, etil-benzeno, tolueno e xileno (chamados BTEX). Os efeitos tóxicos e mutagênicos de derivados do benzeno podem ser detectados com biomarcadores hematológicos e mutagênicos (TORRES et al., 2006). No Brasil a exposição ocupacional a esses solventes orgânicos é um problema de saúde pública, sem notificação e negligenciados pelos administradores de postos de combustíveis (CERQUEIRA et al., 2010).

Uma maneira de estudar os efeitos em uma população exposta é conduzir estudos de monitoramento, utilizando parâmetros biológicos, tais como ensaios citogenéticos, que podem identificar danos resultantes da exposição. Vários testes de curta duração estão disponíveis para a avaliação de perigo genético (CEBULSKA-WASILEWSKA et al., 2007). Dentre os testes utilizados, o ensaio de micronúcleo tem emergido como um método preferencial para

medir o dano cromossômico, pois pode detectar tanto perda quanto quebra cromossômica, visto que são biomarcadores que se manifestam em curto prazo após exposição e sua frequência encontra-se elevada em tecidos expostos antes que qualquer sinal clínico seja evidente. Assim uma frequência elevada de micronúcleos em células esfoliadas revela a ação genotóxica e pode ser usada para identificar grupos de populações de alto risco para desenvolver câncer (RIBEIRO et al., 2003).

Na literatura há diversos trabalhos que demonstram a problemática da exposição ocupacional, porém pesquisas relatando a exposição ocupacional a gasolina no nordeste brasileiro são escassos (CERQUEIRA et al., 2010). Diante do exposto, este estudo teve por objetivo analisar os efeitos citotóxicos e mutagênicos do benzeno e seus derivados em células esfoliadas da mucosa bucal de frentistas de postos de combustíveis expostos diariamente a essas substâncias através do teste de frequência de micronúcleo.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Tipo do estudo e População-Alvo

Tratou-se de um estudo transversal, explicativo e quantitativo realizado por meio do levantamento de dados, aplicação de questionários de saúde e análise citotóxica e mutagênica realizada através do teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal. Fizeram parte da população estudada, frentistas da cidade de Picos-PI/ Brasil. A cidade de Picos-PI possui o segundo maior entroncamento rodoviário do nordeste ligando o Piauí ao Maranhão, Ceará, Pernambuco e Bahia. Possuindo assim, uma ampla rede de postos revendedores de combustíveis, justificando a realização e a importância do estudo na cidade.

2.2.2 Amostra

A amostra foi constituída por 40 indivíduos divididos em dois grupos: **(1) Grupo Teste**, composto por 20 frentistas expostos ao benzeno e seus derivados na cidade de Picos-PI/Brasil **(2) Grupo Controle**, constituído de 20 indivíduos previamente selecionados após análise dos dados de saúde e estilo de vida. A quantidade de indivíduos da amostra segue os padrões de controle internacional do uso do teste de micronúcleo como biomarcadores de genotoxicidade (SILVA, 2005; UNAL et al., 2005; BAKOPOULOU et al., 2008; LEAL, 2009). Para os indivíduos participantes da pesquisa foram informados os detalhes do estudo. Em seguida todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e responderam ao questionário de saúde pessoal, questionários estes confeccionados de acordo

com as exigências da International Commission for Protection against Environment Mutagens and Carcinogens (ICPEMC) Mutation Research, 204:379-406. 1998).

No questionário foram solicitados os dados de saúde e estilo de vida, como: idade, etnia, tempo de trabalho como frentista, carga horária de trabalho semanal, hábito de fumar, consumo de bebidas alcoólicas e alimentos e uso de EPI's. A partir desse questionário selecionou-se o grupo teste.

2.2.3 Teste de micronúcleo e análise dos dados

O teste de micronúcleo é atualmente usado como padrão de teste de mutagenicidade cromossômica e segue a norma OECD – “Guidelines for the Testing of Chemicals/section 4: Health Effects – Mammalian Erythrocytes. Micronúcleos Test: nº - 474 e a recomendação do Gene – Toxprogram, Environmental Protection Agency – EPA/US”. A análise das alterações nucleares pode ser feita através da quantificação de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal. O teste de micronúcleos pode ser usado para evidenciar a ação mutagênica de agentes físicos, tanto em estudos *in vivo* como em estudos *in vitro* (FENECH et al. 2000).

O protocolo foi padronizado segundo Cerqueira et al., (2004), com algumas modificações. Realizou-se raspagem na mucosa bucal com espátulas descartáveis. O material coletado de cada indivíduo foi depositado em 5 ml de solução salina (0,9% NaCl). Após este procedimento, o material foi centrifugado por dez minutos (1500 RPM) e lavado três vezes, com solução salina. Depois da última lavagem colocou-se 50 a 100 µL da suspensão celular sobre as lâminas (pré-aquecidas à 37 °C) em forma de gotas, secando o material sobre a lâmina por 15 minutos em placa quente. A fixação se deu com metanol: ácido acético (3:1), por 15 minutos e secas em temperatura ambiente. Após esta última etapa, as lâminas foram imersas em água destilada por 1 minuto e coradas com Giemsa a 2% por 15 minutos. Cerca de 3.000 células por indivíduos (1.000 células por lâminas) foram observadas em microscopia óptica, com o aumento de 100 X e as frequências de micronúcleos, células binucleadas, cariólise e cariorrexe analisadas e calculadas.

2.2.4 Análise Estatística

As diferenças entre os dois grupos em estudo foram comparadas por ANOVA unifatorial, seguida da aplicação do Pós-teste de Fisher LSD, adotando um nível de significância de $p < 0,01$. O software utilizado foi o STATISTIC, versão 8.0.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de saúde e estilo de vida, como: idade, etnia, tempo de exposição, carga horária de trabalho semanal, hábitos de fumar, consumo de bebidas alcoólicas e alimentos e EPI'S, caracterizaram a população de estudo a partir das informações obtidas pelos frentistas através do questionário de saúde (Tabela 1). Verificou-se que os frentistas apresentaram uma faixa etária entre 21 a 46 anos, com média de idade de 34 anos, apresentando, em sua maioria, a etnia caucasiana (45%). Em relação aos hábitos dos trabalhadores, (75%) não fumavam; (65%) consumiam álcool, havendo um consumo de medicamentos não prescritos em 45% e prevaleceu também o consumo de carne em detrimento do uso de vegetais na dieta. Os trabalhadores expostos ao benzeno e seus derivados informaram que estão expostos em média ao ambiente de trabalho durante 03 anos, cumprindo carga horária semanal de 48 horas e excluindo o uso de EPI'S em sua totalidade.

Tabela 1 Características da população de frentistas de posto de gasolina do município de Picos-PI/Brasil. ano 2014.

Características da população	Expostos aos derivados de benzeno (N=20)	Não expostos (N=20)
Idade^a	34 ± 7,55 (21-46)	24 ± 5,82 (19-39)
Grupo étnico		
• Branco	20%	20%
• Negro	35%	25%
• Caucasiano	45%	55%
Tempo de trabalho no local (anos)	3,35 ± 3,42 (1-16)	-
Uso de EPI's		
• Sim	-	-
• Não	100%	-
Carga horária semanal	48 ± 0	
Hábito de fumar		
• Sim	25%	-
• Não	75%	100%
Consumo de álcool semanal		
• Sim	65%	45%
• Não	35%	55%
Consumo de medicamentos por dia		
• Prescritos	-	15%
• Não prescritos	45%	50%
Consumo de carne em dias da semana	100%	100%
Consumo apenas de vegetais		
• Sim		
• Não	100%	100%

^aMédia ± Desvio padrão FONTE: Pesquisa Direta

Estes dados corroboram com o de outros estudos, que demonstram baixa utilização de equipamento de proteção individual entre trabalhadores (CERQUEIRA et al., 2010; MARTINS et al., 2012). Outra recomendação para minimizar a exposição ocupacional é promover o uso de EPIs adequados à situação de risco, assim como ações educacionais que ajudem os trabalhadores locais a desenvolverem habilidades para a percepção do risco com potencial dano à sua saúde. Segundo Mota et al., (2011) essas medidas de saúde pública teriam como finalidade diminuir a incidência de casos de intoxicação e problemas decorrentes e também prevenir surtos ocasionados por exposição a substâncias químicas, como as investigadas neste estudo.

No presente estudo, os motivos alegados pelos trabalhadores para a não utilização dos EPIs são de incômodo, dificuldade de movimentação e por não serem necessários, já que o tempo de abastecimento é relativamente curto. Esses mesmos motivos foram descritos em outros trabalhos como de Leite et al., 2005.

Os resultados do teste de micronúcleos da mucosa dos frentistas de posto de gasolina da cidade de Picos-PI/Brasil está apresentado na Tabela 2. A frequência de micronúcleos nesses trabalhadores apresentou-se aumentada de forma estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação aos indivíduos não expostos a esses agentes químicos relacionando assim a uma possível mutagenicidade. Indicativos de apoptose também foram observados pelos mecanismos de fragmentação e de dissolução nuclear em todos os indivíduos expostos da amostra. (Tabela 2, Figura 01, Figura 02).

Tabela 2 – Avaliação de mutagenicidade e de anormalidades nucleares indicativas de apoptose e de citotoxicidade, em epitélio bucal de frentistas expostos aos derivados do benzeno.

Grupos	MN em 3000 células	Cariorrexe em 3000 células	Cariólise em 3000 células	BN em 3000 células
Pacientes expostos (n= 20)	60,65 ± 31,62 ***	14,30 ± 9,98 ***	124,75 ± 65,47 ***	12,70 ± 7,75 ***
Não expostos (n= 20)	1,35 ± 2,21	0,05 ± 0,22	7,25 ± 5,43	0,70 ± 0,85

MN (micronúcleos), BN (células binucleadas). Dados significantes para *** $p < 0,001$ em relação ao grupo não exposto. ANOVA unifatorial com Pós-Teste de Fisher LSD.

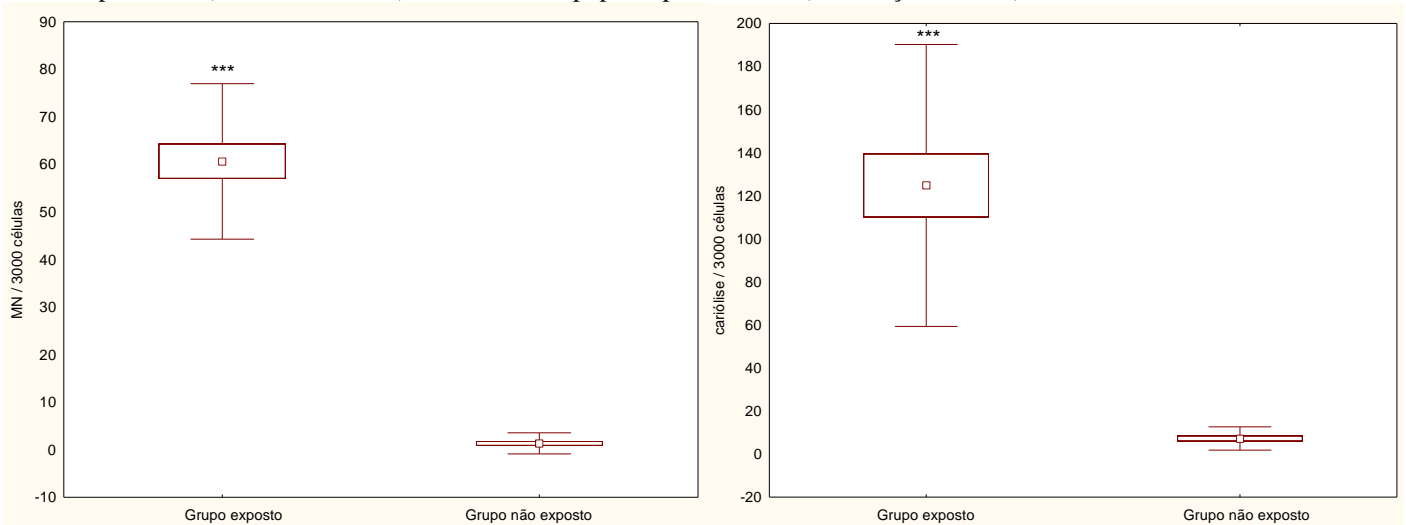
Os resultados do presente estudo estão de acordo com o estudo realizado por Celik et al., (2003) com trabalhadores de postos de gasolina, que verificaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal, em relação aos indivíduos não expostos. De forma similar a frequência de células binucleadas, de cariólise e cariorrexe nesses indivíduos expostos, também se apresentou de forma aumentada. Hogstedt et al., (1991), observaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em

linfócitos de trabalhadores expostos a gasolina. Um aumento no nível de deleções cromossômicas em um estudo citogenético com frentistas também foi evidenciado por santos-mello e Cavalcante (1992). Da mesma forma, Andreoli et al., (1997), também relataram danos no DNA de linfócitos periféricos de forma aumentada nesses trabalhadores.

Em outros trabalhos descritos na literatura, foram mencionadas alterações metabólicas e funcionais ocasionados pela exposição à gasolina e seus derivados, em diferentes sistemas biológicos apresentados ao organismo, podendo até a levar ao câncer e a morte. Quando o contato é via dérmica, os danos observados foram às dermatites, escamação e hepáticos, enquanto que por via respiratória, os efeitos se mostram mais prejudiciais à saúde, podendo gerar efeitos respiratórios, hematológicos, musculoesqueléticos, oculares, imunológicos, neurológicos, reprodutivos, de desenvolvimento, genotóxicos, câncer e morte (DAMBROS, 2012). Outros estudos sugerem que a exposição à gasolina pode causar danos na porção central do sistema auditivo ou no tronco encefálico, induzidos por solventes orgânicos presentes na gasolina (TOCHETTO et al., 2012).

Ramadan et al. (2000), investigaram as consequências imunológicas e toxicológicas à exposição ocupacional pela gasolina, este estudo mostrou que a exposição ocupacional à gasolina aumentou o risco de imunotoxicidade e genotoxicidade. Estudos de Gonçalves e Oliveira (2008), em trabalhadores com intoxicação crônica por benzeno, os mesmos apresentaram em suas células, quebras e perdas cromossômicas. Relacionando assim o dano cromossômico com o excesso de exposição ao Benzeno. Santos (2012), utilizando o ensaio de Micronúcleo por CBMN em células de trabalhadores intoxicados por Benzeno, observou valores significantes de MN e Pontes nucleoplasmáticas três vezes maior do que no grupo controle. Todos esses estudos corroboram com os resultados do presente trabalho em relação ao poder genotóxico da gasolina e de seus compostos.

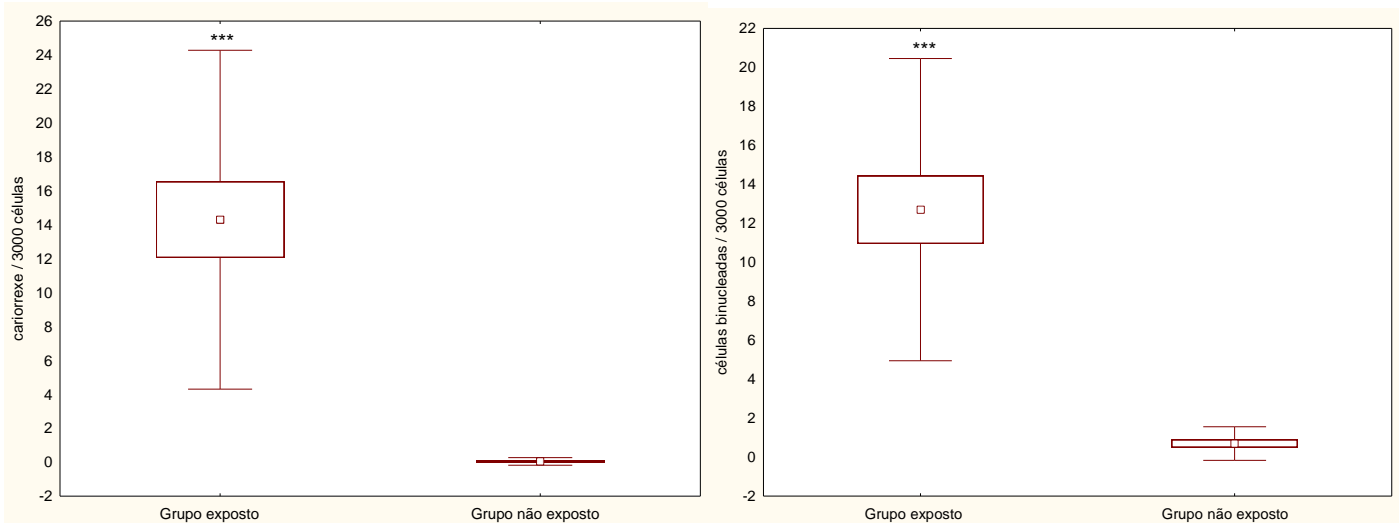
Figura 1 - Dados significantes para $p < 0,001$ em células do epitélio bucal dos indivíduos expostos aos derivados do petróleo. a) micronúcleo e b) Indicativo de apoptose por cariólise (Dissolução nuclear).



MN (micronúcleos). Dados significantes para $***p < 0,001$ em relação ao grupo não exposto. ANOVA unifatorial com Pós-Teste de Fisher LSD.

Neste trabalho, também foi observado que os BTEX induziram citotoxicidade ao epitélio bucal dos indivíduos expostos pelo significante ($p < 0,001$) aumento da frequência de células binucleadas ocasionadas pela não citocinese ao final da divisão celular. (Figura 02). Em estudos de Gonçalves e Oliveira (2008), em trabalhadores com intoxicação crônica por benzeno, os mesmos não obtiveram valores significantes de diminuição de Índice mitótico quando comparados com o Grupo controle, porém, observaram uma tendência para essa diminuição.

Figura 2 - Dados significantes para $p < 0,001$ em células do epitélio bucal dos indivíduos expostos aos derivados do petróleo. a) Indicativo de apoptose por cariorrexe (fragmentação nuclear) e b) células binucleadas.



Dados significantes para *** $p < 0,001$ em relação ao grupo não exposto. ANOVA unifatorial com Pós-Teste de Fisher LSD.

Análise de células esfoliadas da mucosa bucal também fornece evidências de outras alterações nucleares, tais como células binucleadas (presença de dois núcleos dentro de uma célula), cariorrexe (fragmentação nuclear) e Cariólise (dissolução nuclear) (TOLBERT et al., 1992). A formação de células binucleadas é considerada como indicador de citotoxicidade, enquanto cariorrexe e cariólise e são considerados como indicadores de apoptose. As alterações nucleares indicativas de apoptose observadas neste estudo foram significativamente mais frequentes no grupo exposto. Resultado similar aos observados no estudo realizado por Revazova et al., (2001) que relataram um aumento em anormalidades nucleares em células bucais das mulheres que vivem em uma área contaminada por dioxinas.

O teste de micronúcleos em células epiteliais esfoliadas tem sido um biomarcador útil de exposição ocupacional a produtos químicos genotóxicos (CELIK et al., 2003). Como demonstrado neste estudo, outras alterações nucleares, tais como células binucleadas, cariólise e cariorrexe, também são indicadores úteis da exposição a substâncias químicas e resposta tóxica. Com isso, uma combinação de micronúcleos e alterações nucleares, podem aumentar a sensibilidade da técnica de micronúcleos na avaliação de genotoxicidade.

Todas as alterações citotóxicas e mutagênicas observadas no estudo devem está relacionadas ao poder que a gasolina e seus compostos, principalmente o benzeno, tem de se relacionar com o DNA causando pequenas e grandes alterações na estrutura do mesmo. Outros estudos, com técnicas como o Ensaio Cometa bem como valores de Índices mitóticos, devem ser adicionados a este trabalho para se conhecer outros tipos de danos que podem está sendo formados por esses compostos mais que o mecanismo de reparo das células deve está corrigindo ou eliminando com o processo de morte celular programada (apoptose).

3 CONCLUSÃO

Diante dos resultados verificou-se que variáveis referentes aos dados ocupacionais dos expostos a gasolina apresentaram efeitos significativos na presença de micronúcleos e anormalidades nucleares sobre o grupo controle. Constatou-se também que há um padrão de exposição ocupacional relacionado ao não uso de equipamentos de proteção individual (EPI's).

Assim, há a necessidade de realização de campanha de segurança no trabalho com objetivo de esclarecer aos trabalhadores que estão expostos aos BTEX da ação mutagênica e citotóxica dos mesmos, enfatizando a importância da utilização dos EPIs haja vista o risco

para saúde que os BTEX podem trazer. Podendo assim, contribuir para o desenvolvimento de pesquisas futuras na área de exposição ocupacional em nosso estado e na região Nordeste.

REFERÊNCIAS

- ABRANTESA, R.; ASSUNÇÃO, J.V.; HIRAIA, E. Y. Caracterização das emissões de aldeídos de veículos do ciclo diesel. **Rev Saúde Pública**, 2005.
- ANDREOLI, C.; LEOPARDI, P.; CREBELLI, R. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis, after exposure to benzene and benzene metabolites. **Mutat. Res.**, 1997.
- ARAÚJO, A. E. O. **Avaliação da genotoxicidade dos gases derivados de petróleo em trabalhadores expostos ocupacionalmente em ambiente fechado**. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular – Universidade de Brasília, 2008.
- ATSDR Toxicologia profile information sheet. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Department of Health and Human Services, Public Health Service, USA, 2003.
- AU W.W.; LEE, E.; CHRISTIANI D.C. Biomarker research in occupational health. **J Occup Environ Med**. 2005.
- BAKOPOULOU, A; MOURELATOS, D; TSIFTSOGLU, A. S; GIASSIN, N. P; MIOGLOU, E; GAREFIS, P. Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. **Mutation Research** , 2008.
- BERTONCELLO, I.; **Monografia de especialização em Audiologia Clínica**, Centro de Especialização em Audiologia Clínica: Porto Alegre, 1999.
- BULCÃO, R.; MARIA, L. S.; CHARÃO, M.; MORO, A.; ROEHRS, M.; GARCIA, S. C.; LIMBERGUE, L. P. Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia gasosa. **Revista Química Nova**, 2008.
- BRITO, F. V.; OLIVEIRA, A. S.; NEVES, H. C.; AZEVEDO, J. A. T.; BHERING, D. L.; REIS, S. M.; MACHADO, M. C. S.; AZEVEDO, G. C.; CARVALHAES, G. K. Estudos da Contaminação de Águas Subterrâneas por BTEX oriundos dos postos de distribuição no Brasil. *In: Anais do 3º Congresso Brasileiro de PeD em Petróleo e Gás*, Salvador-Brasil, 2005.
- BUCZYNSKA, A. J.; KRATA, A.; STRANGER, M.; GODOI, A. F. L.; KONTOZOVA, V. D.; BENCS, L.; NAVEAU, I.; ROEKENS, E.; GRIEKEN, R. V. Atmospheric BTEX-concentrations in an areawithintensivestreettraffic. **Atmospheric Environment**, 2009.
- BURGAZ, S.; CAKMAK, G. D.; KARAHALIL, B.; KARAKAYA, A. E. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of traffic policemen and taxi drivers exposed to urban air pollution. **Chemosphere**, 2002.
- CÂMARA, V. M.; GALVÃO, L. A. C.; **Patologia do trabalho**, Atheneu: Rio de Janeiro, 1995.

- CAZARIN, G. **Doenças Hematológicas e ambiente: estudo do registo de condições de risco em serviços especializados**. Dissertação-Mestrado em Saúde Pública, Recife, 2005.
- CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; PAWLYK, I.; PANEK, A.; WIECHEC, C. A. Exposure to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons: Influences on cellular susceptibility to DNA damage (sampling Kosice and Sofia). **Mutation Research**, 2007.
- CELIK, A.; CAVAS T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis**. 2003
- CERQUEIRA, G.S.; FREITAS, A.P.F.; PINTO, R.H.; LIMA, T.A.J.; VASCONCELOS, T.C e MARIZ, S.R. Exposição ocupacional de trabalhadores de postos de combustíveis do sertão Paraibano. **Rev. Ciência e Saúde**, 2010.
- CERQUEIRA, G.S.; ARRUDA, V.R.; FREITAS, A.P.F.; OLIVEIRA, T.L.; VASCONCELOS, T.C e MARIZ, S.R. Dados da exposição ocupacional aos agrotóxicos em um grupo assistido por uma unidade básica de saúde na cidade de Cajazeiras, PB. **Rev. Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, 2010.
- CERQUEIRA, E.; GOMES-FILHO, S.; LOPES, M.; PASSOS, J.; MACHADO-SANTELLI. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. **Mutat Res**, 2004.
- CONAMA. Resoluções: resolução n° 273 de 29 de novembro de 2000. [s.l.]: CONAMA, 2000.
- CRUZ-NÚÑEZ, X.; HERNÁNDEZ-SOLÍS, J. M.; RUIZ-SUÁREZ, L. G. Evaluation of vapor recovery systems efficiency and personal exposure in service stations in Mexico City. **Science of Total Environment**, 2003.
- DAMBROS D. **Os efeitos dos combustíveis na saúde dos trabalhadores de postos de abastecimento** <http://www.dambros.com.br/HTML/artigos5.asp> Acesso em 25 de jun. 2014.
- DEDIVITIS, A.R.; FRANÇA, C.M.; MAFRA, A.C.B; GUIMARÃES, F.T.; GUIMARÃES, A.V. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe **Rev. Bras. Otorrinolaringologia**, 2008.
- FENECH M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res**, 2000.
- FENECH, M. et al. The Human Micronucleus Project - an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat Res**, 1999.
- GALIOTTE, M.P. **Avaliação de mutagenicidade em profissionais de institutos de beleza por meio de testes citogenéticos** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.
- GALIC, N.; PRPIC-MEHIIC, G. ; PRESTER, L. J. ; KRNIC, Z. ; BLANUSA, M. ; ERCEG, D. Elimination of mercury from amalgam in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2001.

GATTÁS, G.J.F. **Biomarcadores moleculares**. In: Tratado de clínica médica. São Paulo: Roca; 2006.

GONÇALVES, R. O.; MELO, N. A.; FERNANDO MARTINS CARVALHO, F. M.; ROBERTO CHARLES GÓES, R. C. Efeitos genotóxicos e alterações de enzimas hepáticas em trabalhadores do refino de petróleo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2005.

GONÇALVES, R.O. **Estudos de alterações cromossômicas estruturais e numéricas em trabalhadores com intoxicação por benzeno**. Dissertação de mestrado, Centro de Pesquisas Gonçalves Muniz, 2008.

GOUVEIA, J. L. N.; NARDOCCI, A. C. Acidentes em postos e sistemas retalhistas de combustíveis: subsídios para a vigilância em saúde ambiental. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2007.

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

GUERRA, M.R.; MOURA GALLO, C.V.; MENDONÇA, G.A.S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2005.

HAGMAR, L.; STROMBERG, U.; TINNERBERG, H.; MIKOCZY, Z. The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. **Int J Hyg Environ Health**. 2001.

HIRVONEN, A. Genetic factors in individual response to environmental exposures. **Journal Occupational Environmental Medicine**, 1995.

HOGSTEDT, B.; HOLMEN, A.; KARLSON, A.; RAIHLE, G.; NILLUS, K AND VESTLUND, K. Gasoline pump mechanics had increased frequencies and sizes of micronuclei in lymphocytes stimulated by pokeweed mitogen. **Mutat. Res**, 1991.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S AND FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutat Res.**, 2008.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em 20 jun. 2014.

KATO, M.; LOOMIS, D.; DEMARINI, D.; BROOKS, L.; GOMES, L.; CARVALHO A.B. Occupational risks of charcoal production in Bahia State, Brazil. In: **XVI EPICOH**, Barcelona, Espanha; 2002

KOHATSU, A.G.S.; SHIMABUKURO, F.; GATTÁS, G.J.F. Utilização dos testes de mutagenicidade para a avaliação de exposição ocupacional. **Saúde, Ética & Justiça**. 2007.

LEAL, L. S. **Avaliação Da Mutagenicidade Induzida Por Raios X Periapical Em Células De Mucosa Bucal De Pacientes Em Tratamento Odontológico**. Universidade Luterana do Brasil Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada. Canoas, 2009.

LEITE, J. A.; MOARIS, A. R.; VIVANCO, M. J. F. Valores de referencia de bioindicadores: avaliação estatística no caso do ácido hipúrico. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, São Paulo, 2005.

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, modelo f attenuation of oxidative stress, prevent benzene-induced hemo-lymphoid toxicity and thymic lymphoma. **Experimental hematology**, 2006.

LORENZETT, D. B.; ROSSATO, M. V. A gestão de resíduos em postos de abastecimento de combustíveis. **Revista Gestão Industrial**, Ponta Grossa, PR, 2010.

MARTINS, M.K.S.; CERQUEIRA, G.S.; SAMPAIO, A.M.; LOPES, A.A e FREITAS R.M. Exposição Ocupacional aos Agrotóxicos: Um Estudo Transversal. **Revinter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, 2012.

MILITÃO, A. G.; RAFAELI, E. A. **Neuropatia por intoxicação ocupacional**. Tese de Pós-Graduação em Engenharia de Produção da UFSC – Florianópolis, Santa Catarina, 2007.

MONTEIRO, N. M. L. et al. Câncer de esôfago: Perfil das manifestações clínicas, histologia, localização e comportamento metastático em pacientes submetidos a tratamento oncológico em um centro de referência em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Minas Gerais, 2009.

MOTA, D.M. Intoxicação por exposição à rapadura em três municípios do Rio Grande do Norte, Brasil: uma investigação de epidemiologia de campo. **Saúde soc.**, São Paulo, 2011.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. **O Fundamentos de Toxicologia**, 3 ed., Ateneu: São Paulo, 2003.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Etheneu, 2008.

OLIVEIRA, E. **Contaminação de Aquíferos por Hidrocarbonetos Provenientes de Vazamentos de Tanques de Armazenamento Subterrâneo**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Geociências, USP, 1992.

PARTRIDGE M. Oral cancer: 2. **Clinical presentation and use of new knowledge about the biology of cancer to establish why tumours may recur**. Dent Update, 2000.

PIRES, M. E.; CARVALHO, L. R. F. Presença de compostos carbonílicos no ar em ambientes internos na cidade de São Paulo. **Química Nova**, 1999.

POPP, W.; SCHELL, C.; KRAUS, R.; VAHRENHOLZ, C.; WOLF, R.; RADTKE, J.; BIERWIRTH, K.; NORPOTH, K. DNA strand breakage and DNA adducts in lymphocytes of oral cancer patients. **Carcinogenesis**, 1993.

QUEIROGA, R; PERNAMBUCO, A. P. Câncer de esôfago: epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, RJ, 2006.

RAMADAN, M. M., H. S. OSMAN & M. E. K. MOUSSA. Chronic exposure to gasoline: evaluation of immunological and genotoxic effects among filling station workers. **Mansoura Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology**, 2000.

REVAZOVA, J.; YURCHENKO, V.; KATOSOVA, L.; PLATONOVA, V.; SYCHEVA, L.; KHRIPACH, L.; INGEL, F.; TSUTSMAN, T. AND ZHURKOV, V. Cytogenetic investigation of women exposed to different levels of dioxins in Chapaevsk town. **Chemosphere**, 2001.

RIBEIRO, D. A; BAZO, A. P; DA SILVA FRANCHI, C. A; MARQUES, M. E. A; SALVADORI D. M. F. Chlorthalidone induces DNA damage in rat peripheral leukocytes oral mucosal cells. **J Periodont Res**, 2003.

ROBERTS, D. M. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. **Acta Cytol**, 1997.

ROMA-TORRES, J.; TEXEIRA, J.P.; SILVA, S.; LAFFON, B.; CUNNHA, L.M.; MENDEZ, J.; MAYAN, O.; Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. **Mutation Research**, 2006.

SANTOS-MELLO, R.; CAVALCANTE, B. Cytogenetics studies on gas station attendants. **Mutation Research**, 1992.

SANTOS, D.N.C. **Avaliação citogenética e molecular de trabalhadores intoxicados pelo benzeno**. Tese de Doutorado. USP. 2012.

SARAN, R.; TIWARI, R.K.; REDDY, P.P.; AHUJA, Y.R. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. **Oral Oncology**, 2008.

SILVA, F. L. N.; SANTOS JR, J. R.; MOITA NETO, J.M.; SILVA, R. L. G. N. P. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos de estado do Piauí. **Revista Química Nova**, 2009.

SILVA, E. A. da. **Quantificação de Alterações Nucleares nas Células Epiteliais Esfoliadas da Mucosa da Língua Associadas à Radiografia Panorâmica e Análise do Padrão de Qualidade deste Exame**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, 2005.

TOCHETTO, T.M.; QUEVEDO, L.S. e SIQUEIRA, M.A.L. Condição auditiva de frentistas. **Rev. CEFAC**, São Paulo, 2012.

TORRES-BURGARÍN, O.; VENTURA-AGUILAR, A.; ZAMORA-PILAR, A.; GOMEZ-MEDA, B.C.; RAMOS-IBARRA, M.L.; MORGAN-VILELLA, G., GUTIERREZ-

FRANCO,A.; ZUNIGA-GONZALEZ, G.; The rolle of Double-strand break repair – insights from human genetcs. **Nature**, 2006.

UNAL, M; CELIK, A; ATEŞ, N. A; MICOZKADIOĞLU, D; DERICI, E; PATA, Y. S; AKBAS. Y. Cytogenetic biomonitoring in children with chronic tonsillitis: Micronucleus frequency in exfoliated buccal epithelium cells. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, 2005.

Anexo – Questionário

QUESTIONÁRIO DE SAUDE PESSOAL

(De acordo com o modelo recomendado por: International Commission for Protection against Environment Mutagens and Carcinogens (ICPEMC) Mutation Research, 204:379-406, 1998)

Este questionário, assim como o estudo a ele relacionado, deve ser de seu interesse. A participação é espontânea e constará destas informações gerais sobre a sua saúde e dieta, mais uma coleta de material para estudo citogenético. O estudo consiste em uma avaliação de mutações nas células de cada participante. Mutações ocorrem normalmente nas células de todas as pessoas em nível bastante baixo, e são apontadas, entre outros efeitos, nos processos de envelhecimento e do câncer.

Trabalhadores em atividades de risco (por exemplo, radiologia, quimioterapia, uso de óxido de etileno e outras), se não seguirem normas adequadas de segurança, podem aumentar a frequência de mutações cromossômicas em suas células. Este estudo poderá servir como sinal de alerta para prevenir e melhorar as condições de segurança. Caso não se encontre diferenças entre trabalhadores de atividades de risco e outros de atividade diversas, poderemos concluir tomando cuidados com a ida no local de trabalho.

Leia e responda cuidadosamente as seguintes questões. A informação dada por você não será associada com seu nome, sendo conhecida apenas pelos pesquisadores associados a este estudo. As respostas deste questionário poderão ter influência direta na interpretação de nossos resultados. Por isso, contamos com sua cooperação em fornecer informações corretas. Obrigada pelo seu interesse.

1. Nome
2. Para ser preenchido pelo pesquisador: código nº

Data:

Esta folha será destacada das demais do questionário e arquivada. Apenas o número do código será usado como identificação nas próximas páginas. Se espaços adicionais forem necessários para completar a resposta, por favor, escreva atrás da página e identifique o complemento da resposta com o número da questão.

HISTÓRIA PESSOAL

3. Data de hoje: _____ Qual sua idade?
4. Sexo: () Masculino () Feminino
5. A qual grupo étnico você pertence:
() Caucasiano () Negro () Chinês () Japonês
() Outro. Qual?
6. Qual o seu estado civil?
() Casado () Solteiro () Separado () Divorciado () Viúvo
7. De quantos filhos você é pai natural? (Isto é, não inclua filhos adotados e de criação, e inclua filhos que moram separadamente).
8. Qual é a renda mensal de sua família? _____ salários

HISTORIA OCUPACIONAL

9. Qual o seu local de trabalho?
10. Há quanto tempo você trabalha neste local?
Se há menos de dez anos, onde você trabalhou previamente e por quanto tempo?
11. Que tipo de trabalho você faz?
12. Qual é a carga horária semanal?

EXPOSIÇÃO

13. Liste agentes químicos (por exemplo, gases tóxicos, benzeno, chumbo, fármacos, agrotóxicos, etc.) ou físicos (radiação) a que você se expôs nos últimos dez anos em seu trabalho.
Nos últimos 10 anos: quantas vezes por mês:
Nos últimos 12 meses:
14. Você usa algum tipo de proteção? () Sim () Não
15. Liste os agentes químicos (agrotóxicos e outros que julgar necessário) ou físicos a que você se expôs nos últimos dez anos fora do seu trabalho.
Nos últimos 10 anos:
Quantas vezes por mês nos últimos 12 meses.

HISTORIA DE FUMO

16. Alguma vez você fumou? () Sim () Não
Se não, passe para a questão 19, se sim, continue:

- a) Quanto tempo você fumou? (em anos)
- b) Você fuma atualmente? () Sim () Não
Se sim, passe para 18. C)
- c) Você fuma cigarros? () Sim () Não
Se sim, quantas carteiras por dia? () Menos de meia carteira
() Meia carteira a uma
() Mais de uma carteira? Quantas?
Você fuma cigarros com filtro? () Sim () Não
Qual a sua marca usual?
- d) Você fuma charutos? () Sim () Não
Se sim, quantos charutos por dia? () 1 charuto
() 2 a 3 charutos
() 4 ou mais charutos. Quantos?
- e) Você fuma cachimbo? () Sim () Não
Se sim, quantas vezes por dia? () 1 vez
() 2 a 3 vezes
() 4 ou mais vezes. Quantas?
- f) O que você fumava no passado? () Cigarros () Charutos () Cachimbo
- g) Você mastiga tabaco? () Sim () Não

MEDICAMENTOS E DOENÇAS

17. Você tem tomado algum medicamento prescrito pelo médico, no último ano (por exemplo, comprimidos para pressão, insulina, tranquilizantes, relaxantes musculares, etc.)? () Sim () Não
Se sim, por favor, indique:
Período:
Tipo de medicamento: dose: quantos por dia: início(mês): término(mês)
18. Você tem tomado algum medicamento não prescrito pelo médico no último ano? (por exemplo, aspirina, anti-ácidos, anti-histamínicos, sedativos ou outras drogas)?
() Sim () Não
Se sim, por favor, indique:
Período:
Tipo de medicamento: dose: quantos por dia: início(mês): término(mês)
19. Você tomou alguma vitamina nos últimos 6 meses? () Sim () Não

Tipo de vitamina: dose: quantas vezes por semana.

20. A) você teve ou tem alguma dessas doenças?

Câncer () Sim () Não

Hepatite () Sim () Não

Mononucleose () Sim () Não

Herpes () Sim () Não

AIDS () Sim () Não

Meningite () Sim () Não

Infecção bacteriana ou viral () Sim () Não

Doenças cardiovasculares () Sim () Não

Diabete () Sim () Não

Outras doenças importantes () Sim () Não

Se sim, indique abaixo.

Doença: período da doença: tratamento

B) liste os raios-X diagnósticos e terapêuticos, recebidos nos últimos 10 anos.

Razão para o raio-X; data(ano)

Você fez alguma cirurgia facial ou dentaria durante o ultimo ano?

Data: Razão:

C) dê as datas de quando você teve febre nos últimos 12 meses.

Data(mês): doença associada: medicamento tomado:

21. Você come apenas vegetais? () Sim () Não

22. Você come carne? () Sim () Não

a) Se sim, com que frequência você come o seguinte:

Dias por semana

	Todos os dias	1 a 2 dias	3 a 4 dias	5 a 6 dias
Carne bovina	()	()	()	()
Peixe	()	()	()	()
Porco	()	()	()	()
Outras	()	()	()	()

b) Como você prefere sua carne? () mal passada () no ponto () bem passada

23. Você usa adoçantes? () Sim () Não; Quantas vezes por dia

24. Você bebe refrigerantes? () Sim () Não

25. Comente sobre sua dieta, caso ela tenha algo de especial (por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos, etc.)
26. Você bebe café? () Sim () Não; Quantas xícaras pequenas por dia;
27. Você bebe chá? () Sim () Não; Quantas xícaras por dia;
28. Você toma chimarrão? () Sim () Não ; Com que frequência;
29. Você bebe cerveja? () Sim () Não Se sim, por favor, indique sua média de consumo semanal:
- () 1 a 6 garrafas por semana
 - () 7 a 12 garrafas por semana
 - () 13 a 24 garrafas por semana
 - () mais de 24 garrafas por semana. Quantas?
30. Você bebe vinho? () Sim () Não Se sim, por favor, indique sua média de consumo semanal:
- () 1 a 4 copos por semana ou menos () 5 a 8 copos por semana
 - () 9 a 16 copos por semana () Mais de 16 copos por semana. Quantos?
31. Você bebe outras bebidas alcoólicas? (excluindo cerveja e vinho) () Sim () Não
- Se sim, qual ou quais?
- Por favor, indique a média de consumo semanal
- () 1 a 4 copos por semana () 5 a 8 copos por semana
 - () 9 a 16 copos por semana () Mais de 16 copos por semana. Quantos?

HISTÓRIA GENÉTICA

Você tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra desordem genética ou doença hereditária que tenha afetado seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos?

- () Sim () Não Se sim, por favor, especifique: