



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



Instituto Superior de Engenharia de Lisboa
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Estudo da exposição ocupacional à mistura de solventes orgânicos e dos efeitos para a saúde – Estudo de caso numa Indústria Química Portuguesa

MÁRCIA FILIPA DA SILVA MENESES

(Licenciada em Saúde Ambiental)

Trabalho Final de Mestrado para a obtenção do grau de Mestre em Análise e
Controlo de Riscos Ambientais para a Saúde

Orientadores

Doutora Susana Patrícia Costa Viegas (ESTeSL)

Doutora Carina Alexandra Fernandes Ladeira (ESTeSL)

Lisboa

Dezembro de 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



ISEL
INSTITUTO SUPERIOR DE
ENGENHARIA DE LISBOA



**ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA**
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

Instituto Superior de Engenharia de Lisboa
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

**Estudo da exposição ocupacional à mistura de
solventes orgânicos e dos efeitos para a saúde –
Estudo de caso numa Indústria Química
Portuguesa**

MÁRCIA FILIPA DA SILVA MENESES
(Licenciada em Saúde Ambiental)

Trabalho Final de Mestrado para a obtenção do grau de Mestre em Análise e
Controlo de Riscos Ambientais para a Saúde

Orientadores

Doutora Susana Patrícia Costa Viegas (ESTeSL)
Doutora Carina Alexandra Fernandes Ladeira (ESTeSL)

Lisboa
Dezembro de 2018

Resumo

A presença simultânea de vários agentes químicos em distintos contextos ocupacionais é uma realidade. Os solventes orgânicos, particularmente, estão amplamente difundidos na indústria química e podem provocar efeitos nocivos à saúde humana. O estireno e o xileno são utilizados em grandes quantidades como solventes orgânicos nas mais diversas indústrias. Existem evidências que o estireno provoca efeitos genotóxicos, tais como, a presença de micronúcleos e quebras nos cromossomas. Contrariamente, não existem evidências adequadas dos potenciais efeitos genotóxicos do xileno. Os objetivos deste estudo são avaliar a exposição ocupacional à mistura estireno e xileno através de monitorização ambiental e identificar potenciais efeitos genotóxicos decorrentes dessa exposição através de monitorização biológica. Os resultados obtidos evidenciam uma exposição ocupacional a níveis baixos de estireno e xileno. Adicionalmente, foram observados picos elevados de compostos orgânicos voláteis em várias tarefas desenvolvidas pelos trabalhadores. Os metabolitos urinários (ácido mandélico, ácido fenilglioxílico e ácido metilhipúrico) apresentaram para todos os trabalhadores valores abaixo do limite de deteção do método HPLC utilizado (MA + PGA = 0,16 g/L; MHA = 0,55 g/L). Relativamente aos biomarcadores de efeito, os resultados obtidos fornecem evidência para associação entre a exposição ocupacional ao estireno e xileno e a presença de alterações nucleares. Todos os biomarcadores, exceto pontes nucleoplasmáticas, apresentaram valores médios superiores nos trabalhadores. Verificaram-se associações estatisticamente significativas entre os indivíduos expostos e a presença de protusões nucleares e dano oxidativo ($p < 0,0001$). Os hábitos tabágicos dos indivíduos expostos não exercem efeitos significativos na presença de micronúcleos, protusões nucleares, pontes nucleoplasmáticas, dano no DNA e dano oxidativo ($p > 0,05$).

Palavras-chave: Estireno, xileno, misturas, exposição ocupacional, monitorização ambiental, monitorização biológica, biomarcadores genotóxicos.

Abstract

The simultaneous presence of several chemical substances in different occupational contexts is a reality. Organic solvents are widely diffused in the chemical industry and can have harmful effects on human health. Styrene and xylene are used in large quantities as organic solvents in a variety of industries, including the polymer industry. There is evidence that styrene causes genotoxic effects, such as the presence of micronuclei and breaks in chromosomes. In contrast, there is no adequate evidence of the potential genotoxic effects of xylene. The objectives of this study are to evaluate the occupational exposure to styrene and xylene mixture through environmental monitoring and to identify potential genotoxic effects resulting from this exposure through biological monitoring. The results show an occupational exposure to low levels of styrene and xylene. In addition, high peaks of volatile organic compounds were observed in different tasks performed by workers. The urinary metabolites (mandelic acid, phenylglyoxylic acid and methylhippuric acid) presented values for all workers below the detection limit of the HPLC method (MA + PGA = 0.16 g/L; MHA = 0.55 g/L). Regarding to the effect biomarkers, the results obtained provide evidence for the association between occupational exposure to styrene and xylene and the presence of nuclear alterations. All biomarkers, except nucleoplasmic bridges, had higher mean value in the workers. There were statistically significant associations between exposed individuals and the presence of nuclear buds and oxidative damage ($p < 0.0001$). The smoking habits of exposed individuals do not have significant effects in the presence of micronuclei, nuclear buds, nucleoplasmic bridges, DNA damage and oxidative damage ($p > 0.05$).

Keywords: Styrene, xylene, mixtures, occupational exposure, environmental monitoring, biological monitoring, genotoxic biomarkers.

Lista de Abreviaturas

- ACGIH – *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*
- BAT – Valores biológicos toleráveis (*Biologische Arbeitsstoff*)
- BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
- BTX – Benzeno, Tolueno e Xileno
- CBMN – Micronúcleos em células bloqueadas na citocinese (*Cytokinesis-Block MicroNucleus*)
- CLP – *Classification, Labelling and Packaging*
- CMR – Cancerígenas, Mutagénicas, Tóxicas para a reprodução
- COV – Compostos Orgânicos Voláteis
- DFG – *Deutsche Forschungsgemeinschaft*
- ECHA – *European Chemicals Agency*
- EPA – *United States Environmental Protection Agency*
- EPRS – *European Parliamentary Research Service*
- EUA – Estados Unidos da América
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FPG – Formamidopirimidina DNA glicosilase
- GC/MS – Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massa
- GST – Glutationa S-transferase
- HAP – Hidrocarbonetos Aromáticas Policíclicos
- HI – *Hazard Index*
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High-performance liquid chromatograph*)
- HPLC-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor UV
- IARC – *International Agency for Research on Cancer*
- IBE – Indicadores Biológicos de Exposição
- K_{ow} – Coeficiente de partição
- LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massa de *tandem*
- LoD – Limite de Detecção
- MA – Ácido mandélico (*Mandelic acid*)
- mEH – Epóxido hidrolase microssomal (*Microsomal epoxide hydrolase*)
- MHA – Ácido metil hipúrico (*Methylhippuric acid*)
- MN – Micronúcleo (*Micronucleus*)
- m*-xileno – *meta*-xileno
- NBUD – Pontes Nucleoplásmicas (*Nucleoplasmic Bridges*)
- NIOSH - *National Institute for Occupational Safety and Health*

NPB – Pontes Nucleoplásmicas (*Nucleoplasmic Bridges*)
NRC – *National Research Council*
o-xileno – *ortho-xileno*
PGA – Ácido fenilglioxílico (*Phenilglyoxylic acid*)
PIB – Produto Interno Bruto
PVC – *Polyvinyl chloride*
p-xileno – *para-xileno*
REACH – *Registration, Evaluation, Authorisation of CHemicals*
ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
SCOEL – *Scientific Committee on Occupational Exposure*
SNC – Sistema Nervoso Central
SO – Óxido de estireno (*Styrene oxide*)
TLV-STEL – *Threshold Limit Value – Short Term Exposure Level*
TLV-TWA – *Threshold Limit Value – Time Weighted Average*
TRS – Trato Respiratório Superior
UE – União Europeia
UPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa
VLE – Valor Limite de Exposição
VLE-CD – Valor limite de exposição – Curta Duração
VLE-CM – Valor Limite de Exposição – Concentração Máxima
VLE-MP – Valor Limite de Exposição – Média Ponderada
WHO – *World Health Organization*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, às minhas orientadoras, Professora Doutora Susana Viegas e Professora Doutora Carina Ladeira por terem aceite este desafio. Agradecer-lhes, acima de tudo, pela orientação, pela partilha de saber científico, pela motivação e confiança ao longo destes últimos meses.

Um agradecimento especial aos meus pais, os melhores deste mundo e do outro, por todo o apoio e motivação. O que sou hoje deve-se em muito a vocês.

Agradecer também ao meu namorado, por conseguir manter a minha mente sã durante este processo, mas, principalmente, por todo o apoio para que concluísse mais esta etapa.

Agradeço à Engenheira Hortense Correia pelo carinho e apoio constante e incondicional ao longo deste projeto. Ao Engenheiro Jaime Carvalho por acreditar em mim e permitir que este projeto fosse desenvolvido. À Engenheira Laura Garcia pela sua disponibilidade constante e partilha de ensinamentos. Ao meu colega Miguel Barros pela sua ajuda incansável e disponibilidade na partilha de conhecimento durante todo este processo. Por fim, um grande obrigado a todos os trabalhadores da fábrica de resinas de base solvente, pela partilha de conhecimentos, pela simpatia e disponibilidade.

Agradeço a muitas outras pessoas especiais que contribuíram para a concretização deste trabalho, em diferentes fases, e que sem o seu apoio, incentivo, confiança, disponibilidade e ensinamentos não teria conseguido alcançar este desafio.

Índice Geral

Resumo	ii
Abstract	iii
Lista de Abreviaturas	iv
Agradecimentos	vi
1. Introdução	1
1.1. Problemática de estudo	4
1.2. Questões de partida	5
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivos gerais	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
2. Enquadramento teórico	6
2.1. Indústria química	6
2.2. Estireno	7
2.2.1. Características gerais do estireno	7
2.2.2. Produção e aplicação	9
2.2.3. Presença no ambiente	10
2.2.4. Exposição ocupacional	13
2.2.5. Toxicocinética e toxicodinâmica	17
2.2.6. Efeitos para a saúde	20
2.3. Xileno	25
2.3.1. Características gerais	25
2.3.2. Produção e aplicação	27
2.3.3. Presença no ambiente	28
2.3.4. Exposição ocupacional	29
2.3.5. Toxicocinética e toxicodinâmica	31
2.3.6. Efeitos para a saúde	33
2.4. Avaliação da exposição humana	38
2.5. Monitorização ambiental	40
2.6. Monitorização biológica	41
2.7. Biomarcadores	43
2.7.1. Biomarcadores de exposição	44
2.7.2. Biomarcadores de efeito	45
2.7.3. Biomarcadores de suscetibilidade	47
2.8. Métodos de avaliação de genotoxicidade	47
3. Metodologia	51
3.1. Tipo de Estudo	51
3.2. Caracterização do local de estudo	51

3.3.	Variáveis em estudo	54
3.4.	Recolha de dados.....	55
3.4.1.	Questionário	55
3.4.2.	Monitorização ambiental.....	55
3.4.3.	Monitorização biológica	56
3.5.	Procedimentos laboratoriais	57
3.5.1.	Determinação de MHA, MA e PGA na urina	57
3.5.2.	Ensaio de micronúcleos por bloqueio da citocinese (CBMN)	57
3.4.3	<i>Comet Assay</i>	58
3.6.	Procedimentos estatísticos	59
3.7.	Considerações ético-legais.....	59
4.	Resultados	61
4.1.	Caracterização das amostras	61
4.2.	Descrição das funções observadas	62
4.3.	Monitorização ambiental	63
4.3.1.	Estireno e xileno	63
4.3.2.	Compostos Orgânicos Voláteis.....	71
4.4.	Monitorização biológica	75
4.4.1.	Determinação MHA, MA e PGA na urina	75
4.4.2.	Ensaio de micronúcleos por bloqueio da citocinese (CBMN) e <i>Comet Assay</i>	75
5.	Discussão	79
6.	Considerações finais.....	89
6.1.	Limitações do estudo	90
6.2.	Perspectivas Futuras	90
7.	Referências bibliográficas	91
8.	Anexos.....	121
	Anexo I – Método NIOSH 1501 (EN)	122
9.	Apêndices	129
	Apêndice I – Questionários aos trabalhadores.....	130
	Apêndice II – Termo de Consentimento Informado	132

Índice de Figuras

Figura 1 Metabolismo do estireno em humanos.....	19
Figura 2 Metabolismo no xileno em humanos.	33
Figura 3 Localização geográfica da indústria em estudo.....	52
Figura 4 Fluxograma dos processos 1 e 2 da fábrica de resinas de base solvente. ...	53
Figura 5 Fluxogramas dos processos 3 e 4 da fábrica de resinas de base solvente, respectivamente.	53
Figura 6 Resultados obtidos para cada trabalhador relativamente aos valores de média ponderada (8h) de estireno e xileno e o seu efeito aditivo.	64
Figura 7 Resultados obtidos para COV totais ao longo de 2 turnos.	72
Figura 8 Resultados obtidos para os COV totais ao longo de 2 turnos de trabalho tendo em conta os VLE-MP do estireno.....	74

Índice de Tabelas

Tabela 1 Propriedades físico-químicas do estireno.	8
Tabela 2. Classificação harmonizada do estireno.....	8
Tabela 3 Estimativa das emissões provenientes de tráfego rodoviário e indústrias químicas em países europeus (milhares toneladas/ano).	12
Tabela 4 Percentagem de estireno perdido durante diferentes tipos de processos. ...	14
Tabela 5 Valores limite para o estireno de diferentes entidades dos EUA.	15
Tabela 6 Valores limite de exposição para o estireno em países europeus.	16
Tabela 7 Propriedades físico-químicas do xileno.....	26
Tabela 8 Classificação harmonizada do xileno.	26
Tabela 9 Valores limite definidos nos EUA.	30
Tabela 10 Valores limite de exposição para o xileno em países europeus.	30
Tabela 11 Efeitos no sistema nervoso decorrentes da exposição ao xileno.	34
Tabela 12 Afetação dos trabalhadores às etapas dos processos.	54
Tabela 13 Classificação das variáveis em estudo.	54
Tabela 14 Caracterização das amostras em estudo (não expostos e expostos).....	61
Tabela 15 Resultados da amostragem pessoal e descrição das funções, atividades, condições operacionais, medidas de gestão de risco.	65
Tabela 16 Descrição dos picos obtidos para os COV totais.....	73
Tabela 17 Resultados dos biomarcadores de efeito das amostras não expostos (controlos) e expostos (casos).	75
Tabela 18 Resultados dos biomarcadores de efeito entre não expostos e expostos. .	76
Tabela 19 Resultados de correlação entre anos de empresa, média ponderada (8h) de estireno e xileno e os picos de COVs, e os biomarcadores genotóxicos.....	77
Tabela 20 Estatística descritiva relativamente às funções desempenhadas pelos indivíduos expostos.	78

1. Introdução

A presença de uma diversidade de agentes químicos no nosso quotidiano é uma realidade (Sellappa *et al.*, 2011). Os humanos estão expostos ambientalmente a um elevado e diversificado número de substâncias e misturas que podem estar presentes no ar, na água, nos alimentos e nos mais distintos produtos de consumo que utilizamos diariamente (Paustenbach & Galbraith, 2006). Em contextos ocupacionais, particularmente, é reconhecido que os indivíduos podem estar expostos simultaneamente a mais do que um agente químico ou físico potencialmente perigoso para a saúde (Ikeda, 1995; Prasher *et al.*, 2002). Sendo que um indivíduo gasta, em média, um terço da sua vida no seu local de trabalho, o ambiente onde este desenvolve as suas tarefas pode ser um fator importante na determinação da saúde (Palanikumar & Panneerselvam, 2011). Impreterivelmente, nestes contextos quanto maior for o grupo de fatores de risco de natureza profissional, maior vai ser a preocupação com os seus potenciais efeitos na saúde humana. Nesse sentido, é primordial a existência de técnicas e metodologias que permitam adquirir e desenvolver capacidades que possam incrementar os níveis de prevenção (Prista & Uva, 2006).

A Indústria química está profundamente relacionada com todos os setores da economia, sendo os seus principais utilizadores a indústria da borracha, plásticos, construção, celulose e papel, e a indústria automóvel. Na União Europeia (UE) existem aproximadamente 28 mil empresas químicas e mais de 1 milhão de trabalhadores diretamente ligados a estas empresas (Cefic, 2018).

O uso de solventes nas mais diversas indústrias químicas é extremamente importante, uma vez que, vários processos químicos e técnicos dependem das suas propriedades específicas, nomeadamente, processos de extração na indústria química e farmacêutica ou técnicas de laminação (Dick, 2006; Viaene *et al.*, 2009). Os solventes são, geralmente, definidos como um líquido, que pode ser composto por uma ou várias substâncias químicas, e que apresenta a capacidade de dissolver, suspender ou extrair outros materiais, sem que haja alteração do material ou do solvente (Dick, 2006; Viaene *et al.*, 2009; EPA, 2016). Os solventes podem, usualmente, ser classificados em duas categorias principais: orgânicos e inorgânicos. Especificamente os solventes orgânicos são caracterizados por serem moléculas que contém carbono e que pertencem a um grupo heterogéneo de compostos químicos, em que a sua estrutura e propriedades físico-químicas são variáveis (Boman & Maibach, 2000; Barragán-Martínez *et al.*, 2012). Estes estão amplamente difundidos na indústria química, e são caracterizados por ser altamente voláteis e solúveis em lípidos, o que permite a sua absorção nos tecidos e a

ligação a lípidos (Sułkowski *et al.*, 2002). Alguacil *et al.*, (2002), refere inclusive que a principal fonte de exposição a solventes orgânicos é o local de trabalho. Nesse sentido, existe uma preocupação crescente por parte das equipas de medicina do trabalho e de segurança e higiene industrial (Sułkowski *et al.*, 2002).

O Homem pode estar exposto no seu local de trabalho a uma diversidade de misturas de solventes por múltiplas vias de exposição (Mumtaz, 2010). De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008, uma mistura é definida como uma solução composta por duas ou mais substâncias. As misturas podem ainda ser caracterizadas por ser simples ou complexas, consoante o conhecimento da sua composição (Silins & Högberg, 2011). Uma mistura simples contém um número bem definido de substâncias, ao contrário de uma mistura complexa em que a composição, geralmente, não é totalmente caracterizada (Silins & Högberg, 2011). Os efeitos combinados de várias substâncias químicas são usualmente referenciados através de dois modos de ação distintos: ação semelhante (“*simple similar action*”) e ação dissimilar (“*simple dissimilar action*”). A ação semelhante descreve o modo de ação quando todos os compostos químicos presentes numa mistura atuam da mesma forma, isto é, pelo mesmo modo de ação. Por sua vez, ação dissimilar ocorre quando a combinação de substâncias químicas produz um efeito comum através de diferentes modos de ação, ou em locais distintos (EFSA, 2008).

O estireno e o xileno são exemplos de agentes químicos amplamente utilizados como solventes orgânicos nas indústrias de polímeros, do plástico, da borracha e farmacêutica (Szúcs *et al.*, 2002). Os principais efeitos para a saúde decorrentes da exposição ao estireno e xileno estão associados ao sistema nervoso central, nomeadamente, náuseas, dores de cabeça, vômitos, problemas de concentração, cansaço e alteração na visão das cores (ATSDR, 2010; Kandyala *et al.*, 2010).

De acordo com *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, o estireno passou recentemente a ser classificado como possivelmente carcinogénico para humanos (Grupo 2A), esta classificação baseia-se em evidências limitadas em humanos e suficientes evidências em animais. A existência de fortes evidências do mecanismo deste composto em humanos suporta igualmente a sua classificação no grupo supracitado (IARC, *in press*; Kogevinas *et al.*, 2018). Existem alguns estudos que demonstram os efeitos genotóxicos do estireno, nomeadamente, alterações nos cromátídeos-irmãos, a presença de micronúcleos e quebras nos cromossomas em diferentes sistemas *in vitro* (Barale, 1991; Norppa & Sorsa, 1993; Scott & Preston, 1994; IARC, 2002; Laffon *et al.*, 2002). Contrariamente, não existem evidências adequadas que provem a classificação do xileno como genotóxico ou carcinogénico (WHO, 1997; Roma-Torres *et al.*, 2006).

A exposição a longo prazo aos vapores de solventes ocorre frequentemente a misturas e não a um único solvente, o que conduz a efeitos no sistema nervoso em casos de concentrações mais elevadas. Todavia, até em concentrações baixas, inclusive abaixo do valor de limite de exposição, a exposição a solventes pode provocar deficiências sensoriais (Szúcs *et al.*, 2002). Nesse sentido, em ambientes ocupacionais e, decorrente de uma estratégia de prevenção de riscos profissionais, especificamente, de natureza química, a vigilância da saúde de trabalhadores expostos, obriga, assim, à planificação e concretização da monitorização ambiental e da monitorização biológica (Prista & Uva, 2006).

A monitorização ambiental é uma ferramenta extremamente importante em contextos ocupacionais, na medida em que pode ser utilizada para identificação e quantificação de um ou mais agentes químicos no ambiente de trabalho (Costa & Costa, 2002; Prista & Uva, 2006). Esta baseia-se, assim, na determinação da concentração de um determinado agente químico num contexto de trabalho utilizando como critério de conformidade referências adequadas, isto é, os valores máximos admissíveis, nomeadamente, os valores limites de exposição (VLE) definidos por disposições legais nacionais e comunitárias (Prista & Uva, 2006).

A monitorização biológica é um instrumento igualmente bastante útil na avaliação da exposição humana a substâncias químicas, especialmente, em contextos ocupacionais. Esta envolve a medição da substância em si inalterada, do seu metabolito ou de outros produtos de reação em matrizes biológicas, tais como, o sangue e a urina. A exposição interna a uma determinada substância tendo em consideração a absorção, a distribuição, o metabolismo e a eliminação é refletida através da monitorização biológica (Bevan *et al.*, 2017).

Os biomarcadores podem ser definidos como uma alteração em componentes, processos, estrutura ou funções celulares ou bioquímicas mensuráveis num sistema biológico ou amostra (NRC, 1987). A utilização de biomarcadores, também como método de monitorização biológica, é fundamental para a toxicologia e para a saúde humana. Neste sentido, verifica-se um interesse crescente no uso e aplicação de biomarcadores para identificar a exposição a químicos em contextos ocupacionais (Watson & Mutti, 2004).

Os biomarcadores genotóxicos são definidos como biomarcadores de efeitos carcinogénicos iniciais e são utilizados com o objetivo de avaliar potenciais efeitos cancerígenos em ambientes ocupacionais e não-ocupacionais, de forma a prever o risco de doenças ou monitorizar a eficácia de programas de prevenção e controlo da exposição as agentes genotóxicos (Amorim, 2003; Manno *et al.*, 2010; WHO, 2015; Ladeira & Viegas, 2016). Nesse sentido, existe uma variedade de métodos de avaliação

da genotoxicidade que permitem avaliar o risco de cancro, tais como, o ensaio de micronúcleos por bloqueio da citocinese (CBMN), *comet assay*, teste de aberração cromossômica ou o teste de Ames (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2013). Em contextos ocupacionais, nomeadamente, na indústria do calçado e na indústria mineira, já foram utilizados simultaneamente o *comet assay* e o CBMN, com o objetivo de avaliar potenciais efeitos genotóxicos em linfócitos do sangue periférico (Heuser *et al.*, 2005; León-Mejía *et al.*, 2011; Ladeira & Smajdova, 2017).

Na Europa, em particular, está a decorrer até 2021, o projeto HBM4EU, que pretende utilizar a biomonitorização humana para avaliar a exposição humana a substâncias químicas, nomeadamente, em contextos ocupacionais, com o objetivo de assegurar que os produtos químicos são utilizados de forma a não prejudicar a saúde nem o meio ambiente. Esta Iniciativa pretende estabelecer uma ponte entre a ciência e a política, e para tal, serão investigadas questões atuais no que concerne à avaliação e gestão dos riscos químicos, permitindo desta forma dar respostas que ajudem na tomada de decisões por parte dos decisores políticos em relação à proteção da saúde (HBM4EU, 2017).

Devido aos efeitos para a saúde decorrentes da exposição ao estireno e xileno e à dimensão da exposição na indústria química torna-se pertinente o estudo da avaliação da exposição no contexto ocupacional supracitado a misturas, que utilizam como monómeros e solventes, o estireno e o xileno. Sendo conhecidos os efeitos genotóxicos que vários solventes orgânicos podem ter, incluindo o estireno, tornou-se igualmente adequado a utilização de biomarcadores de efeito, particularmente, de genotoxicidade como método de monitorização biológica.

1.1. Problemática de estudo

A exposição, especificamente, a solventes orgânicos em contextos ocupacionais é um facto, e vários são os perigos para a saúde humana relatados devido a exposição a estes solventes no local de trabalho. Os solventes orgânicos são profundamente tóxicos para o sistema nervoso, fígado, rins e coração, podendo igualmente interagir com os ácidos nucleicos, produzindo efeitos genéticos a curto e a longo prazo (Baker, 1994; Cárdenas-Bustamante *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2013). No caso particular da exposição crónica ao estireno e xileno são referidos efeitos no sistema nervoso central (SNC) e no sistema renal (Bonanni *et al.*, 2015; Niaz *et al.*, 2015). A exposição ocupacional ao estireno tem sido igualmente associada a efeitos genotóxicos, tais como, o aumento da frequência de alterações nos cromatídeos-irmãos e micronúcleos, assim como danos no DNA (Laffon *et al.*, 2002). Devido às razões

supracitadas aliadas a obrigatoriedade de a entidade patronal avaliar os riscos e de verificar a existência de agentes químicos perigosos no ambiente de trabalho de acordo com o Decreto-Lei n.º 24/2012, de 6 de fevereiro, torna-se fundamental a avaliação da exposição ocupacional, a nível ambiental e biológico, com objetivo primordial de assegurar a proteção da saúde dos trabalhadores no ambiente de trabalho.

1.2. Questões de partida

- Qual a exposição ocupacional à mistura de estireno e xileno numa indústria química de produção de resinas?
- A exposição à mistura de estireno e xileno pode implicar efeitos para a saúde dos trabalhadores expostos?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivos gerais

- Avaliar a exposição ocupacional à mistura de estireno e xileno, em trabalhadores de uma indústria química produtora de polímeros através de monitorização ambiental.
- Identificar potenciais efeitos genotóxicos da exposição ocupacional à mistura de estireno e xileno, nos trabalhadores de uma indústria química produtora de polímeros através de monitorização biológica.

1.3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar, através dos resultados obtidos na monitorização ambiental, a exposição à mistura de estireno e xileno dos trabalhadores.
- Identificar as atividades ou grupos profissionais que impliquem maior carga de exposição.
- Investigar quais as variáveis – função desempenhada e anos de exposição – que condicionam a exposição à mistura de estireno e xileno.
- Avaliar efeitos genotóxicos nos trabalhadores expostos à mistura estireno e xileno através do ensaio dos micronúcleos por bloqueio da citocinese - micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e protusões nucleares; e do *comet assay* – dano no DNA e dano oxidativo no DNA.
- Verificar se existe relação entre os resultados obtidos através da monitorização ambiental com os resultados da monitorização biológica, incluindo, os obtidos através dos biomarcadores de genotoxicidade.
- Relacionar a frequência de alterações nucleares com a exposição ocupacional ao estireno e xileno.

2. Enquadramento teórico

2.1. Indústria química

A evolução da indústria química assim como nós a conhecemos iniciou-se com a Revolução Industrial, em 1880, e desenvolveu-se com o objetivo de fornecer químicos para outras indústrias. Desde os anos 90 que a indústria química é um setor diversificado de indústrias, dentro do qual desempenha um papel central (Heaton, 1994). Este tipo de indústrias é essencial para economia mundial, transformando matérias-primas em mais de 70 mil produtos diferentes para dezenas de setores (AEP, 2011).

A indústria química envolve a utilização de processos que permitam obter reações químicas com o objetivo de produzir uma diversidade de materiais sólidos, líquidos e gasosos. A grande generalidade destes produtos é usada na fabricação de outros artigos, porém podem existir alguns produtos químicos que sejam utilizados diretamente por consumidores finais, nomeadamente, solventes, pesticidas ou massas betuminosas. Esta indústria inclui fabricantes de químicos inorgânicos e orgânicos, produtos químicos industriais, tintas, produtos agroquímicos, polímeros e borracha, óleos, gorduras, entre outros (AEP, 2011).

Nos países da UE a produção industrial de produtos químicos começou há mais de 150 anos e desde então a indústria química cresceu e produziu uma enorme e variada gama de substâncias que são utilizadas e necessárias na nossa economia (Cefic, 2014).

A UE e outros países europeus são uns dos maiores produtores de produtos químicos a nível mundial, atingindo valores de vendas de 597 biliões de euros, e ficando somente atrás da China. Na UE, existem, sensivelmente, 28,329 indústrias químicas que empregam diretamente mais de 1 milhão de pessoas (Cefic, 2018).

Em 2016, na UE foram produzidas mais 200 milhões de toneladas de produtos químicos perigosos para a saúde humana, das quais, aproximadamente, 32 milhões toneladas eram classificadas como cancerígenos, mutagénicos ou tóxicos para a reprodução (CMR). Por sua vez, para o mesmo período, foram consumidos mais de 214 milhões de toneladas de químicos perigosos para a saúde humana, incluindo, 34 milhões de toneladas de químicos CMR (Eurostat, 2017).

No caso particular de Portugal, a indústria química representa 5% do Produto Interno Bruto (PIB) total da indústria portuguesa, existindo 790 empresas químicas e mais de 12 mil trabalhadores diretos (Cefic, 2018). Geograficamente, a indústria química está maioritariamente localizada em Estarreja e Sines, e nas áreas industrializadas de Lisboa e do Porto (Cefic, 2018).

A indústria química abrange as mais variadas atividades industriais e processos produtivos, que muitas vezes, podem ser problemáticos para o ambiente e segurança e saúde dos seus trabalhadores. Especificamente, nestas indústrias os indivíduos estão expostos a agentes físicos, químicos e ergonômicos existentes no local de trabalho e são passíveis de causar danos à saúde, dependendo do tipo de agente, da sua concentração e intensidade (AEP, 2011).

A indústria dos polímeros, particularmente, beneficiou de um rápido desenvolvimento e atualmente é das maiores indústrias quando comparada com outras, como por exemplo, a do cobre, alumínio e aço (Namazi, 2017). Os polímeros consistem em várias unidades estruturais, os monómeros, que estão geralmente ligadas por ligações covalentes (Namazi, 2017). Os polímeros, sejam eles naturais ou sintéticos, desempenham um papel fundamental no conforto e facilitação da vida humana e podem estar presentes nas mais diversas áreas, nomeadamente, nutrição, comunicação, têxtil, construções, entre outras (Namazi, 2017).

2.2. Estireno

2.2.1. Características gerais do estireno

O estireno é um composto orgânico incolor e com um cheiro doce na sua forma pura, porém quando produzido industrialmente pode conter aldeídos o que lhe confere um odor desagradável. A sua forma física é líquida, à temperatura ambiente, contudo pode evaporar facilmente (ATSDR, 2010; ATSDR, 2012; Nett *et al.*, 2017).


Este hidrocarboneto insaturado polimeriza facilmente à temperatura ambiente na presença oxigénio e oxida quando exposto ao ar e a luz solar (WHO, 1983; IARC, 2002). O estireno pode também polimerizar quando contaminado por agentes oxidantes e haletos, a reação originada é exotérmica e, se contida, pode ser violenta (Cefic, 2007). Relativamente à sua solubilidade, este é pouco solúvel em água, solúvel em etanol e acetona e muito solúvel em benzeno e outros solventes orgânicos (WHO, 1983; WHO, 2000; Lide, 2001). Este apresenta um ponto de inflamação de, aproximadamente, 31-32 °C, o que lhe confere a classificação de líquido e vapor inflamável de acordo com os critérios do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, comumente, designado de Regulamento CLP (Cefic, 2007). Na tabela 1 estão descritas algumas propriedades físico-químicas do estireno.

Tabela 1 Propriedades físico-químicas do estireno (Adaptado: *Cefic, 2007*).

Propriedades físico-químicas	Valores
Estado físico	Líquido
Cor	Incolor
Odor	Desagradável, aromático
Massa molecular	104.14
Densidade (20°C)	906 kg/m ³
Viscosidade cinemática (20°C)	0,8 mm ² /s
Pressão de vapor (20°C)	0,6 kPa
Ponto de ebulição	145 °C
Ponto de inflamação	31-32 °C
Solubilidade em água (20°C)	0,29 kg/m ³

Segundo a *European Chemicals Agency* (ECHA), as classificações e rotulagens harmonizadas estão abrangidas pela parte 3 do anexo VI do Regulamento CLP e são juridicamente vinculativas, isto é, devem aplicadas por todos os fabricantes, importadores ou utilizadores a jusante (ECHA, 2017). O estireno, particularmente, apresenta uma classificação e rotulagem harmonizada de acordo com o Regulamento (UE) n.º 605/2014, que corresponde à 6ª adaptação ao progresso técnico e científico para a classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (tabela 2).

Tabela 2. Classificação harmonizada do estireno (Fonte: *ECHA*).

	Advertências de perigo	Descrição	Pictogramas
Estireno Número CAS: 100-42-5 Número CE: 202-851-5	H226	Líquido e vapor inflamáveis.	
	H315	Provoca irritação cutânea.	
	H319	Provoca irritação ocular grave.	
	H332	Nocivo por inalação.	
	H361d	Suspeito de afetar o nascituro.	
H372	Afeta os órgãos após exposição prolongada ou repetida.		

2.2.2. Produção e aplicação

O estireno foi isolado pela primeira vez no século XIX através de um processo de destilação do bálsamo natural *storax*, proveniente do alburno e da casca de determinadas árvores (Miller *et al.*, 1994). Todavia, o grande desenvolvimento de processos comerciais para a produção de estireno só se deu na década de 1930, devido à necessidade de borracha sintética durante a Segunda Guerra Mundial (Miller *et al.*, 1994; Rueff *et al.*, 2009).

Atualmente, o estireno pode ser obtido à escala comercial através de vários processos de produção, sendo que o principal método a desidrogenação catalítica do etilbenzeno (Equação 1) (IARC, 2002; Sánchez *et al.*, 2017). Neste processo, o estireno é produzido por desidrogenação a temperaturas elevadas, aproximadamente, 630°C, utilizando vários óxidos metálicos como catalisadores, tais como, crómio, ferro e óxidos de zinco (Speight, 2002; Sánchez *et al.*, 2017). O fracionamento do produto resulta na separação de estireno, etilbenzeno não convertido e subprodutos secundários, particularmente, o tolueno e o benzeno (IARC, 2002).



Equação 1 Desidrogenação catalítica do etilbenzeno para formar estireno (Fonte: Sánchez *et al.*, 2017).

Outro método utilizado para a produção é a oxidação do etilbenzeno, este representa cerca de 15% do estireno produzido (EPA, 1993). Este método consiste na oxidação do etilbenzeno para obter um peróxido, que conseqüentemente reage com o propileno para formar fenilmetilcarbinol e óxido de propileno. Posteriormente, o álcool que é obtido sofre um processo de desidratação para formar estireno a temperaturas entre os 180 e os 400°C utilizando sílica gel acidificada ou um catalisador de dióxido de titânio (EPA, 1993; Speight, 2002; Sánchez *et al.*, 2017). Existem ainda outros métodos que são utilizados para a fabricação de estireno, como por exemplo, a reação direta de benzeno e etileno ou através da pirólise da gasolina (Speight, 2002).

Em todo o mundo são produzidos todos os anos mais de 25×10^6 toneladas de estireno (Ba *et al.*, 2014). No caso particular da UE, são produzidas, aproximadamente, 5×10^6 toneladas de estireno por ano (Eurostat, 2016).

As indústrias de fabricação de barcos, automóveis, plásticos, embalagens de alimentos e energia eólica, são algumas das indústrias que incluem no seu processo o estireno (Nett *et al.*, 2017). O estireno é um dos monómeros mais importantes a nível mundial, sendo que a sua utilização é dominada pela química dos polímeros (IARC, 2002;

Speight, 2002; Ba *et al.*, 2014). O seu monómero é utilizado na produção de uma variedade de produtos abrangidos em seis tipos de resina: poliestireno, acrilonitrilo-butadieno-estireno, estireno-acrilonitrilo, borracha de estireno-butadieno, látex de butadieno e estireno e, resinas de poliéster insaturado (Cohen *et al.*, 2002).

A grande maioria, sensivelmente, 46% do estireno produzido globalmente é utilizado na produção de poliestireno (Cefic, 2007). As vantagens do poliestireno são a facilidade com que este é moldável e compatibilidade com uma variedade de corantes, modificadores e enchimentos, o que permite que este seja amplamente utilizado na fabricação de embalagens de plástico, brinquedos e isolamento (IARC, 2002). O poliestireno expansível representa o segundo maior uso do estireno produzido em todo o mundo, aproximadamente, 16% (Cefic, 2007).

A reação entre o acrilonitrilo, o butadieno e o estireno dão origem a um polímero termoplástico designado de acrilonitrilo-butadieno-estireno, que devido ao seu desempenho, processo e moldagem é utilizado nas mais diversas indústrias, nomeadamente, a eletrónica, a automóvel e a de materiais de construção (Li *et al.*, 2017). Este polímero de estireno representa, aproximadamente, 14% do uso do estireno (Cefic, 2007).

A borracha sintética de estireno-butadieno é um copolímero de borracha sintética de estireno e butadieno, que representa 4% da utilização de estireno e é utilizada para os mais variados produtos, nomeadamente, pneus de carro, mangueiras para aplicações industriais, brinquedos e sapatos (Cefic, 2007; ATSDR, 2010; Alves *et al.*, 2011). Por sua vez o látex de estireno-butadieno, que representa 6% do uso global de estireno, é usado na indústria têxtil na fabricação de carpetes e na indústria do papel (IARC, 2002; Cefic, 2007; ATSDR, 2010).

A somar as aplicações referidas anteriormente, existem uma diversidade de outras aplicações, incluindo, termoplásticos menos comuns, uso em laboratório, colas, adesivos e tinteiros (ATSDR, 2010). É permitido ainda pela *Food and Drug Administration* (FDA), que o estireno seja utilizado como aditivo direto para aromatizantes e aditivo indireto em resinas de poliéster, membranas de troca iónica e em artigos de borracha destinados a alimentos (ATSDR, 2010).

2.2.3. Presença no ambiente

A presença de estireno no ambiente pode advir de fontes naturais ou antropogénicas. Este composto químico pode ocorrer naturalmente de plantas, especificamente, de árvores balsâmicas, tais como, *Liquidambar orientalis* e *Liquidambar styraciflua* (Miller *et al.*, 1994; Steele *et al.*, 1994). No exsudato presente no alburno e casca de troncos

das árvores supracitadas foram identificadas quantidades vestigiais de estireno, provavelmente resultante da degradação natural dos derivados do ácido cinâmico, que ocorrerem em quantidades elevadas nestes exsudatos (Miller *et al.*, 1994; Steele *et al.*, 1994; IARC, 2002). A formação de estireno através de ácidos cinâmicos, inclusive, os ácidos *trans*-cinâmicos ocorre possivelmente via descarboxilação, onde o ácido cinâmico perde um grupo carboxilo na forma de dióxido de carbono para dar origem ao estireno (Takemoto & Achiwa, 2001; Fragnière *et al.*, 2003).

A ocorrência natural do estireno pode também dar-se em produtos agrícolas, tais como, fruta, cereais, grãos de café e carne bovina assim como em alimentos processados, nomeadamente, azeite e cerveja. A formação de estireno nos mais diversos alimentos pode ser explicada através de mecanismos distintos, designadamente, ser um subproduto de leveduras ou bolores naturalmente presentes nos alimentos ou um metabolito intermediário em alimentos (IARC, 2002; Fragnière *et al.*, 2003). Não obstante que a presença de estireno em produtos alimentares é uma realidade, a sua concentração nestes produtos, é geralmente muito baixa, aproximadamente, entre 1 e 60 µg/kg (Fragnière *et al.*, 2003).

Relativamente a fontes antropogénicas, o estireno pode ser emitido para a atmosfera maioritariamente resultante de processos e usos industriais que envolvam a sua utilização e a produção dos seus polímeros e copolímeros (IARC, 2002; ATSDR, 2010). Outras fontes incluem emissões de veículos automóveis, processos de combustão, fumo do tabaco, materiais de construção e produtos de consumo (IARC, 2002; ATSDR, 2010).

Nos Estados Unidos da América (EUA) em 2005 foram reportados à *Environmental Protection Agency* (EPA) 47,3 x 10⁶ kg de emissões estimadas de estireno provenientes de indústrias, dos quais, aproximadamente, 38 x 10⁶ kg foram libertados por fontes pontuais e 10 x 10⁶ kg libertados em emissões difusas, contudo o número de emissões pode ser bastante superior uma vez que somente as indústrias com elevados números de produção ou consumo são obrigadas a reportar à EPA (ATSDR, 2010). Relativamente às emissões provenientes de veículos foram reportados que automóveis movidos a gasolina apresentaram valores entre 6,2 e 7,0 mg/kg, enquanto que automóveis movidos a gasóleo obtiveram 1,4 e 2,1 mg/kg (ATSDR, 2010).

Na Europa, as emissões estimadas de estireno provenientes de fontes industriais e relacionadas com o tráfego rodoviário foram reportadas por Bouscaren *et al.* (1987) (tabela 3).

Tabela 3 Estimativa das emissões provenientes de tráfego rodoviário e indústrias químicas em países europeus (milhares toneladas/ano) (Fonte: WHO, 2000).

País	Fonte	
	Tráfego rodoviário (gasolina)	Indústria Química
Alemanha	2,9	3,4
Bélgica	0,5	0,75
Dinamarca	0,28	NR
França	2,9	3,4
Grã-Bretanha	3,0	3,7
Grécia	0,5	NR
Holanda	0,7	1,45
Irlanda	0,19	NR
Itália	3,0	3,5
Luxemburgo	0,02	0,03*
Portugal	0,5	0,3
Espanha	2,0	1,2
Total	16,0	18,0

*proveniente de outras fontes

NR = Não reportado

Como é possível observar na tabela 3 na maioria dos países europeus a indústria química revelou uma estimativa de emissões de estireno mais elevada que o tráfego rodoviário, com exceção dos países da Península Ibérica. O que corrobora a ideia de que a principal fonte antropogénica deste hidrocarboneto é a produção, o processamento e uso de estireno em contextos industriais.

O estireno é um composto químico comumente reportado em áreas urbanas. As concentrações de estireno no ar em áreas rurais são, sensivelmente, inferiores às reportadas nas áreas urbanas, inferiores a 1 e 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respetivamente (WHO, 2000; ATSDR, 2010).

A libertação de estireno também pode ocorrer para a água, sendo a principal fonte os efluentes industriais. A presença de estireno em efluentes industriais foi detetada em indústrias químicas, têxteis, de látex e gasificação de carvão (ATSDR, 2010).

Ocasionalmente o estireno foi detetado em estuários, águas interiores, nomeadamente, lagos e cursos de água, e água potável. A sua presença é geralmente associada a uma fonte industrial ou a uma descarga accidental. Estudos no Canadá e nos EUA revelaram concentrações de estireno na água potável inferiores a 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ (WHO, 2000).

O estireno evapora rapidamente da água para o ar, sendo o tempo de evaporação a 1 metro de profundidade de, aproximadamente, 6 horas (WHO, 2000). A elevada constante de Henry's indica igualmente perdas significativas da água para o ar. Este é rapidamente biodegradável, tendo um tempo de semivida na água de, sensivelmente, 2 semanas (CSTEE, 2001).

Os solos e sedimentos podem ser igualmente contaminados com estireno através de derrames químicos, presença em aterros de resíduos que contenham estireno e descargas de águas contaminadas. Existe ainda uma pequena quantidade que é produzida naturalmente através de atividades de microrganismos e algumas plantas que podem ser libertadas para os solos. Porém, as quantidades libertadas por processos naturais são pouco significativas quando comparadas com as libertações resultantes das atividades humanas (ATSDR, 2010). Em 2006 foram reportados nos EUA libertações de estireno no solo de aproximadamente $2,44 \times 10^6$ kg, decorrentes de indústrias de produção e processamento (ATSDR, 2010).

2.2.4. Exposição ocupacional

O estireno é uma importante matéria-prima em ambientes industriais, o que conduz a uma extensa e importante exposição ocupacional (Alves *et al.*, 2017). Estima-se que mais 100 mil indivíduos na UE estejam ocupacionalmente expostos a estireno (Teixeira *et al.*, 2004).

Os ambientes de trabalho são os que apresentam as maiores concentrações de estireno no ar, sendo que existe uma variabilidade significativa da concentração consoante os tipos de instalação e os processos de produção (Miller *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 2002). Os trabalhadores podem estar expostos ao estireno nas mais variadas indústrias, incluindo na produção de estireno, produção de poliestireno e outras resinas que contenham estireno, produção de plásticos e produtos de borracha e aplicação profissional de outros produtos que contenham estireno, nomeadamente, ceras, tintas, adesivos, produtos de enchimento, vernizes e produtos de limpeza metálicos (IARC, 2002). Dependendo da técnica de aplicação utilizada, a quantidade de estireno que pode evaporar para o ar ambiente é variável, o que pode influenciar a exposição dos trabalhadores (tabela 4).

Tabela 4 Percentagem de estireno perdido durante diferentes tipos de processos (Fonte: *Cefic*).

Processo	Percentagem (%) de estireno perdido
<i>Gelcoat</i> – aplicação em spray	10-14
<i>Spray-up</i> – aplicação com resinas de poliéster convencionais (<i>non-LSE</i>)	7-10
<i>Gelcoat</i> – aplicação com pincel	6-8
Enrolamento filamentar	5-7
<i>Hand Lay-up</i> - aplicação com resinas de poliéster convencionais (<i>non-LSE</i>)	4-6
<i>Spray-up</i> – aplicação com resinas poliéster de baixa emissão e de baixos teor de estireno (LSE/LSC).	4-6
<i>Topcoat</i> – aplicação em spray	4-5
<i>Topcoat</i> – aplicação com pincel	3-4
<i>Hand Lay-up</i> - aplicação com resinas poliéster de baixa emissão e de baixos teor de estireno (LSE/LSC).	3-4
Pultrusão	1-3
Betão polimérico	1-3
Laminação contínua	1-2
Produção de compostos de moldagem em folhas (SMC) e a granel (BMC)	1-2
Processos de compostos de moldagem em folhas (SMC) e a granel (BMC)	1-2
Processos fechados de moldação por transferência de resina (RTM), RTM-light e infusão	<1

Níveis baixos de estireno foram relatados em contextos ocupacionais distintos, incluindo indústrias nucleares, centros de fotocópias, indústrias petroquímicas, indústrias de impressão, indústrias de madeiras (aplicação de revestimentos), incineração de resíduos, indústrias de produção de filmes de PVC, indústria naval e portagens (Prieto *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Bakoğlu *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2005; Sapkota *et al.*, 2005; Thorud *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; NTP, 2011). Baixos valores de concentração de estireno foram igualmente observados em contextos ocupacionais onde são usadas resinas poliéster, nomeadamente, na produção de botões e durante o combate a incêndios (IARC, 2002). Por sua vez, valores mais elevados de estireno foram relatados durante a produção e utilização de tintas e massas (valores superiores a 20 ppm), para taxidermistas (valores inferiores a 70 ppm)

e durante a fabricação de utensílios de cozinha (valores inferiores a 186 ppm) (IARC, 2002).

Porém, a exposição ocupacional a estireno ocorre majoritariamente por via inalatória durante a produção de produtos de plástico reforçados em fibra de vidro, onde são geralmente utilizadas resinas de poliéster insaturado que contém na sua composição, aproximadamente, 40% de estireno como solvente (Miller *et al.*, 1994; IARC, 2002; Laffon *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2004; Weng *et al.*, 2016). No caso específico destas indústrias, é durante o processo de laminação, uma técnica manual, que até 10% do estireno pode evaporar para o ambiente de trabalho (IARC, 2002; Laffon *et al.*, 2002). Para além da exposição por via inalatória, a exposição ocupacional ao estireno pode ocorrer igualmente por via dérmica a estireno líquido e a resinas com estireno na sua composição, contudo esta via desempenha um papel menor na exposição ocupacional a este composto (Laffon *et al.*, 2002; ATSDR, 2010).

A exposição ocupacional ao estireno em indústrias de plástico reforçados em fibra de vidro têm sido extensivamente estudada ao longo dos anos (IARC, 2002). Um estudo realizado em 28 destas indústrias nos EUA revelou resultados em que a exposição média era três vezes superior em processos de moldagem abertos (24-82 ppm) quando comparados com processos de moldagem por compressão (11-26 ppm). Ainda nos EUA, outro estudo concretizado em 12 indústrias de produção de fibra de vidro demonstrou que 40% das amostras de 8h continham valores superiores de 100 ppm (IARC, 2002).

Nos EUA os limites de exposição ao estireno em ambientes ocupacionais estão definidos, para exposições de curta duração, usualmente, 15 minutos (TLV-STEL) e para médias ponderadas, geralmente, de um período de 8 horas (TLV-TWA), podendo variar consoante a entidade que o define (tabela 5).

Tabela 5 Valores limite para o estireno de diferentes entidades dos EUA (Fonte: *GESTIS International Limit Values*).

	TLV-TWA (ppm)	TLV-STEL (ppm)
ACGIH American Conference of Governmental Industrial Hygienists	20	40
OSHA Occupational Safety and Health Administration	100	ND
NIOSH National Institute for Occupational Safety and Health	50	100

ND = Não definido

Os valores limites de exposição (VLE) ocupacional estão igualmente bem definidos na maioria dos países europeus (tabela 6). Em Portugal, é definido no Anexo I da Norma

Portuguesa 1796 de 2014, relativa à Segurança e Saúde do Trabalho – Valores limite de exposição profissional a agentes químicos, o valor limite de exposição média (VLE-MP) e o valor limite de exposição de curta duração (VLE-CD), 20 e 40 ppm, respetivamente. No sentido de cumprimento legal por parte das indústrias é fundamental que os níveis de estireno sejam regularmente monitorizados.

Tabela 6 Valores limite de exposição para o estireno em países europeus (Fonte: *GESTIS International Limit Values*).

Países	Valor limite (8h)		Valor limite (curta duração)	
	ppm	mg/m ³	ppm	mg/m ³
Alemanha	20	86	40 (15 min.)	172 (15 min.)
Áustria	20	85	80	340
Bélgica	50	216	100	432
Dinamarca	25	105	25	105
Espanha	20	86	40	172
Finlândia	20	86	100 (15 min.)	430 (15 min.)
França	23,3	100	46,6 (15 min.)	200 (15 min.)
Hungria	--	50	--	50
Inglaterra	100	430	250	1080
Irlanda	20	85	40 (15 min.)	150 (15 min.)
Polónia	--	50	--	200
Suécia	10	43	20 (15 min.)	86 (15 min.)
Suíça	20	85	40	170

No que concerne a Indicadores Biológicos de Exposição (IBE), o ácido mandélico (MA) e ácido fenilgloxílico (PGA) são referenciados em vários estudos como indicadores biológicos de exposição a estireno (Teixeira *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Wongvijitsuk *et al.*, 2011; Bonanni *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2017), apesar de serem considerados biomarcadores não específicos, uma vez que são metabolitos de outros compostos de estrutura semelhante e do etilbenzeno (Tranfo *et al.*, 2012; Bonanni *et al.*, 2015). Estes metabolitos também são propostos pela *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) como IBE a estireno na urina. Este organismo propõe um IBE de 400 mg/g de creatinina de MA + PGA, o correspondente a um VLE (8h) de 20 ppm (Bonanni *et al.*, 2015; ACGIH, 2017). A Norma Portuguesa 1796 de 2014, à semelhança de outros Estados-membros da EU, tais como, a Espanha, adota os IBE propostos pela ACGIH. Por outro lado, o *Scientific Committee on Occupational Exposure Limits* (SCOEL) não define qualquer valor-limite biológico para o estireno na UE

(SCOEL, 2014). A *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (DFG), uma organização autônoma dedicada a ciência e investigação, estabelece o indicador biológico a medir, bem como valores biológicos toleráveis (*Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte* - BAT) para o estireno. Este organismo alemão propõe igualmente os MA + PGA na urina como os metabolitos a quantificar e um BAT de 600mg/L (após o turno de trabalho) (DFG, 2014).

2.2.5. Toxicocinética e toxicodinâmica

O estireno é um hidrocarboneto solúvel em lípidos e por esse motivo é altamente expectável que seja absorvido após exposição por via inalatória, digestiva e dérmica (NRC, 2014). Este penetra no organismo principalmente por inalação, uma consequência da sua elevada volatilidade, enquanto que a absorção por via cutânea desempenha um papel menor (WHO, 2000; Laffon *et al.*, 2001; Morata & Campo, 2002). Em humanos a absorção do estireno após exposição por via inalatória é rápida (ATSDR, 2010), assim que os vapores entram nos pulmões difundem-se através das membranas respiratórias e entram na corrente sanguínea (Morata & Campo, 2002). Após absorção entre 60 a 70% da dose inalada é retida nos pulmões (IARC, 2002). Por outro lado, o estireno presente no ar e absorvido pela pele representam somente entre 2 a 5% da dose absorvida pelo trato respiratório. Na forma física líquida, o estireno penetra na pele a uma taxa de 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ por minuto (WHO, 2000). Segundo Limasset *et al.*, (1999), a absorção por via dérmica não é particularmente importante no estudo da exposição ao estireno quando comparada com a via inalatória, uma vez que, os níveis de excreção urinária de um grupo de trabalhadores com equipamento de proteção individual total não é significativamente diferente de um grupo de trabalhadores unicamente com proteção respiratória (Sartorelli, 2002).

A exposição por via oral é menos comum e a absorção parece ocorrer mais lentamente quando comparada com a do trato respiratório (Morata & Campo, 2002). Porém estudos em animais revelam que a absorção do estireno através do trato gastrointestinal é rápida e completa quando administrado por via oral numa solução aquosa, tendo sido atingido um pico de estireno no sangue em poucos minutos (ATSDR, 2010).

Após a absorção no organismo o estireno é distribuído por todo o corpo (WHO, 2000; Rueff *et al.*, 2009). Estudos realizados em humanos e animais revelam que após exposição por via inalatória, o estireno concentra-se maioritariamente no tecido adiposo, onde o tempo de semivida é entre 2 a 5 dias (ATSDR, 2010). Concentrações mais elevadas de estireno no tecido adiposo estão profundamente relacionadas com exposições mais elevadas a este composto (ATSDR, 2010). O facto de o estireno ser

distribuído e retido no tecido adiposo e conseqüentemente apresentar uma eliminação lenta indicam um potencial de acumulação em exposições a longo prazo (Rueff *et al.*, 2009). Em animais foram encontradas concentrações de estireno no coração, fígado, rins, baço, cérebro e gordura perirrenal, a distribuição nestes órgãos apresenta diferentes padrões consoante o aumento da dose. Porém, a concentração na gordura perirrenal pode ser até 10 vezes superior quando comparada com os outros órgãos (ATSDR, 2010).

O metabolismo do estireno em humanos está bem descrito (Rueff *et al.*, 2009; Bonanni *et al.*, 2015) (figura 1), e é caracterizado por ser um metabolismo por oxidação mediado por CYP (Andersen *et al.*, 2017). Após absorção o estireno é metabolicamente ativado por enzimas do citocromo P450 (CYP450) para que seja iniciada a oxidação do estireno para formar um metabolito reativo, o 7,8-óxido de estireno (SO) (WHO, 2000; IARC, 2002; NTP, 2011). As principais isoenzimas responsáveis por este processo são o CYP2E1, CYP2B6, CYP1A2 e CYP2C8, e outras isoenzimas com menor atividade para o estireno (WHO, 2000; Wenker *et al.*, 2001). Aproximadamente 90% do estireno inalado é absorvido pelos pulmões e sofre biotransformação a SO através do CYP450, principalmente o CYP2E1 (Teixeira *et al.*, 2004). O SO é um intermediário com capacidade para ligar-se covalentemente a macromoléculas e é considerado diretamente responsável pelos efeitos genotóxicos do estireno, as reações que dão origem a sua formação ocorrem principalmente no fígado e em poucos casos nos pulmões (Rueff *et al.*, 2009).

Em humanos, a enzima predominante para o metabolismo do estireno no fígado é a CYP2E1, enquanto que no pulmão para que ocorra toxicidade é necessária a ativação da enzima CYP2F1. Porém, esta enzima parece não metabolizar o estireno em humanos (Rhombert *et al.*, 2013). Segundo Rhombert *et al.*, (2013), em camundongos as células de Clara presentes no pulmão metabolizam o estireno em SO após exposição por via inalatória. Em ratos, a quantidade de células de Clara é bastante inferior, especialmente nos bronquíolos terminais, por sua vez em humanos estas células são igualmente raras, podendo ser encontradas nos bronquíolos distais (Rhombert *et al.*, 2013). Sabe-se ainda que as células de Clara de camundongos produzem cinco vezes mais SO que as células de Clara de rato. Assim sendo, as células que metabolizam o estireno no pulmão diferem em número, localização e especificidade entre espécies, particularmente, camundongos, ratos e humanos (Hynes *et al.*, 1999; Rhombert *et al.*, 2013). Após a formação do SO, este é metabolizado pela enzima epóxido hidrólase microsomal (mEH) e sofre um processo de hidrólise enzimática para produzir feniletilenoglicol que é posteriormente oxidado em MA e PGA (WHO, 2000; Viaene *et al.*, 2001; IARC, 2002). Os metabolitos MA e PGA, são considerados os principais

metabolitos urinários do estireno, representam respectivamente 85% e 10% dos seus metabolitos urinários (Bonanni *et al.*, 2015). O SO pode ainda ser conjugado com glutationa dando origem à produção de ácido mercaptúrico, um metabolito urinário menor que representa somente 1% do estireno absorvido (WHO, 2000; Rueff *et al.*, 2009). Existem ainda vias metabólicas adicionais que incluem a hidroxilação do anel de benzeno, contudo em humanos são vias menor importância (IARC, 2002). Uma pequena quantidade do estireno que é absorvido pelo organismo não é biotransformado e é eliminado inalterado através da urina (Prieto *et al.*, 2002; Bonanni *et al.*, 2015).

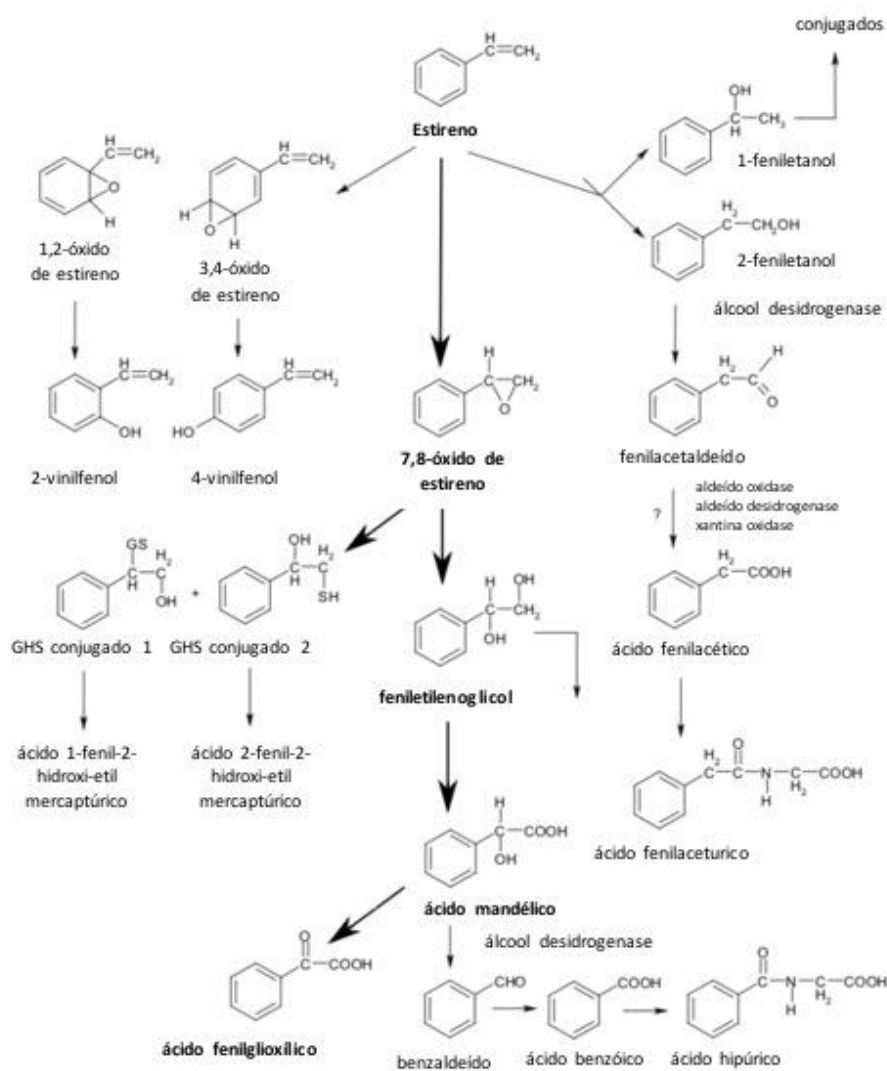


Figura 1 Metabolismo do estireno em humanos (Adaptado: ATSDR, 2010).

Segundo Johanson *et al.*, (2000), um grupo de voluntários do sexo masculino expostos a 50 ppm de estireno num período de 2 horas, apresentaram picos de MA e PGA na urina 2 horas após terminar a exposição. Após a exposição ao estireno o padrão de excreção urinária dos metabolitos MA e PGA é distinto, sendo o tempo de semi-vida do

PGA superior ao do MA. Um estudo realizado numa indústria naval em que os trabalhadores estiveram expostos a concentrações de estireno de 11 ppm durante 4h, o tempo de semi-vida para o MA e PGA foi de, sensivelmente, 2 e 5 horas, respetivamente (Lauwerys & Hoet, 2001). A excreção urinária de MA e PGA é ainda caracterizada por ser bifásica, com uma fase mais rápida e outra mais lenta, muito provavelmente devido à sua formação contínua proveniente da libertação de estireno que fica retido no tecido adiposo (Lauwerys & Hoet, 2001; ATSDR, 2010).

2.2.6. Efeitos para a saúde

Os principais efeitos resultantes da exposição aguda ao estireno em humanos incluem irritação cutânea e do trato respiratórios e depressão do sistema nervoso central (Laffon *et al.*, 2001a). Exposição a longo prazo, tal como outros compostos orgânicos voláteis, está associada a *deficit* neurológico e comportamental, nomeadamente, o aumento do tempo de reação, distúrbios visuais e alterações neurofisiológicas (Kishi *et al.*, 2000; Benignus *et al.*, 2005). A exposição crónica em ambientes ocupacionais também está associada a alteração na qualidade do sémen e na estrutura espermática, ao aumento da frequência de mutações em vários locais e à elevada incidência de quebras de cadeia simples, trocas de cromátídeos-irmãos e aberrações cromossómicas em linfócitos periféricos (Laffon *et al.*, 2001b).

2.2.6.1 Efeitos neurológicos

Dados de estudos em humanos relativos à exposição ao estireno sugerem que o sistema nervoso é o alvo mais sensível após a exposição crónica por via inalatória, e muito provavelmente, o alvo mais sensível em exposições agudas, contudo as exposições de curta duração ainda não foram extensivamente estudadas (ATSDR, 2010). O sistema nervoso efetivamente, parece ser o primeiro alvo para a toxicidade do estireno, sendo que sintomas associados a desordens neurológicas envolvendo o sistema nervoso central e periférico foram reportados em indivíduos expostos no local de trabalho a este agente químico (Kim, 2015).

Estudos realizados em ambientes ocupacionais, com níveis de exposição superiores a 100 ppm, revelaram vários sintomas, incluindo, sonolência, tonturas, dores de cabeça, cansaço e distúrbios no equilíbrio (Rueff *et al.*, 2009).

Porém, ainda é desconhecido se estes sintomas permanecem após o fim da exposição ou com a redução dos níveis dos mesmos (Viaene *et al.*, 2001). A análise de casos clínicos revela ainda que a velocidade psicomotora é a primeira função a deteriorar-se após exposição prolongada ao estireno, seguida da atenção e da memória (Viaene,

2002). Estudos ocupacionais relativos à exposição a misturas de solventes, incluindo o estireno, relataram a persistência de efeitos neurológicos, psiquiátricos e neurocomportamentais (Viaene *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de sintomas e *deficit* neurocomportamental pode ser influenciado por diversos fatores, nomeadamente, a intensidade da exposição, duração da exposição, consumo de álcool, personalidade e inteligência pré-mórbida. Outro fator que pode desempenhar um papel modulador no desenvolvimento de efeitos neurotóxicos é a diferença individual na via metabólica do estireno. Em humanos, a enzima mEH apresenta genótipos polimórficos que alteram substancialmente a sua atividade, a variação competitiva do mEH foi relatado como umas das causas para o a toxicidade do sistema nervoso central, o que sugere que o mEH com diferentes atividades pode ter consequências neurotóxicas associadas à exposição do estireno (Viaene *et al.*, 2001).

2.2.6.2 Efeitos respiratórios

A exposição ao estireno em humanos é suscetível de provocar irritação do trato respiratório, principalmente, garganta e nariz (Polver *et al.*, 2003; ATSDR, 2010). Um número reduzido de casos de irritação da garganta e de aumento de secreções nasais foram relatados em exposições de 800 ppm durante 4 horas, enquanto que um número elevado de casos reportou a ocorrência de irritação nasal após 60 minutos com concentrações de 376 ppm. Alterações pulmonares obstrutivas também foram observadas em trabalhadores expostos ao estireno durante 10 anos (ATSDR, 2010).

Em animais, particularmente, roedores, o estireno é um agente tóxico para o trato respiratório (Sarangapani *et al.*, 2002; Rueff *et al.*, 2009; Carlson, 2011). Um estudo observou que tecidos nasais expostos a concentrações de 40 e 160 ppm de estireno ao longo de 6 horas/dia durante um período de 3 dias apresentaram algumas alterações degenerativas, especialmente, atrofia da mucosa olfatória e perda da organização celular normal (Green *et al.*, 2001). A exposição por via inalatória deste composto químico apresenta efeitos tóxicos para o epitélio olfativo nasal de ratos e camundongos, porém os camundongos parecem ser mais sensíveis à toxicidade respiratória deste composto (Green *et al.*, 2001; ATSDR, 2010). As diferenças observadas entre espécies podem ser explicadas através das alterações no metabolismo do estireno no epitélio nasal. As taxas de biotransformação do estireno em óxido de estireno pelos CYP2E1 e CYP2F2 é semelhante entre as duas espécies, porém o óxido de estireno é metabolizado de forma mais eficiente pela mEH e glutatona S-transferases em ratos do que em camundongos (Green *et al.*, 2001; ATSDR, 2010). A exposição crónica ao

estireno em camundongos, aproximadamente, 20 ppm durante 2 anos, resultou em metaplasia respiratória do epitélio nasal olfatório e dilatação, metaplasia respiratória e hiperplasia epitelial da glândula de Bowman (Cruzan *et al.*, 2001).

2.2.7.3 Efeitos hepáticos e renais

O principal motivo de preocupação associado a efeitos hepáticos decorrentes da exposição ao estireno deve-se ao papel crítico que o fígado desempenha no metabolismo do estireno. O SO tem a habilidade de ligar-se de forma covalente a macromoléculas hepáticas e membranas lipídicas podendo causar lesões hepatocelulares. A ocorrência de lesões hepatocelulares foi demonstrada em exposições elevadas ao estireno (Brodkin *et al.*, 2001).

Estudos realizados em humanos relativamente a hepatotoxicidade do estireno produziram resultados variáveis (Brodkin *et al.*, 2001; ATSDR, 2010). Em exposições ocupacionais crônicas a níveis baixos de estireno (<1 ppm) não foram observadas alterações significativas nos níveis de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase ou γ -glutamil transferase, bem como em exposições a concentrações de estireno entre 50 a 120 ppm durante aproximadamente, 5 anos. Em trabalhadores expostos a concentrações entre 5 e 20 ppm até 20 anos revelaram somente um aumento significativo nos níveis de γ -glutamil transferase (ATSDR, 2010).

Estudos realizados em animais evidenciam que o fígado é um tecido alvo para o estireno, todavia a hepatotoxicidade do estireno em camundongos é influenciada pela duração da exposição. Os efeitos hepáticos somente foram observados após exposição aguda ou intermédia, mas não após exposição crônica, inclusive, os efeitos diminuem com a exposição continua ao estireno (ATSDR, 2010). Ratos parecem ser menos sensíveis à toxicidade hepática do estireno, a concentrações de 1000 ppm durante 13 semanas ou 2 anos não foram verificadas alterações histológicas (ATSDR, 2010).

Relativamente a efeitos renais, estudos realizados em contextos ocupacionais e estudos em animais referem que o rim parece não ser um alvo sensível à toxicidade do estireno (ATSDR, 2010). Estudos de exposição ocupacional em trabalhadores expostos a concentrações de estireno inferiores a 53 ppm não demonstraram alterações significativas nos níveis urinários β -microglobulina, proteína transportadora de retinol ou albumina (ATSDR, 2010). Por sua vez, estudos em animais revelam que não foram observadas alterações histológicas após exposição aguda ao estireno a 300 e 500 ppm em ratos e camundongos, respetivamente. Não foram igualmente verificadas alterações histológicas em ambas as espécies após exposição crônica (ATSDR, 2010).

2.2.7.3 Efeitos reprodutivos

A toxicidade reprodutiva do estireno foi estudada em animais e humanos (Brown *et al.*, 2000). Alguns em estudos epidemiológicos realizados em mulheres cuja atividade ocupacional envolve exposição ao estireno, referem a ocorrência de abortos espontâneos e distúrbios menstruais. Porém, uma das limitações destes estudos é o facto de os níveis de estireno não terem sido adequadamente quantificados (ATSDR, 2010). Foram igualmente realizados vários estudos relativos ao potencial do estireno em induzir efeitos no sistema reprodutivo dos homens. Um estudo realizado em 23 trabalhadores numa indústria de estireno revelou um decréscimo da concentração de espermatozoides, da contagem total de espermatozoides, da percentagem de espermatozoides viáveis e um aumento da velocidade espermática entre a primeira semana de trabalho e após seis meses (Kolstad *et al.*, 1999a; Kolstad *et al.*, 1999b; ATSDR, 2010). Outro estudo realizado em 70 trabalhadores na produção de plástico reforçado em fibra relataram um aumento de quebras na cadeia do DNA no esperma, porém, não encontraram nenhuma associação entre a extensão dos danos no DNA e os anos de exposição ou a concentração de metabolitos na urina (Migliore *et al.*, 2002). Em animais estudos deste âmbito já foram realizados em ratos, camundongos, coelhos e hamsters (Brown *et al.*, 2000). Resultados destes estudos indicam pouco ou nenhum potencial para a exposição ao estireno induzir efeitos tóxicos no sistema reprodutor. Alguns atrasos no desenvolvimento e crescimento foram observados em crias de ratos antes e após o nascimento. Foi igualmente demonstrado que o estireno pode atravessar a placenta tanto em ratos como camundongos. Em ratos machos foi observada uma diminuição da contagem de espermatozoides quando exposto a estireno por via oral. Por sua vez, em culturas de embriões de ratos, o estireno apresentou efeitos tóxicos mesmo em concentrações baixas (1mmol/L) (WHO, 2000; NTP, 2006; ATSDR, 2010) Na comunidade europeia, o estireno apresenta classificação harmonizada para a classe de perigo toxicidade reprodutiva. De acordo com a 6ª adaptação ao progresso técnico e científico para a classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (Regulamento (UE) n.º 605/2014), o estireno é classificado como suspeito de afetar o nascituro.

2.2.7.5 Efeitos cancerígenos

A evidência limitada do potencial carcinogénico do estireno em humanos é baseado em estudos de trabalhadores expostos a este composto (NTP, 2011). Ao longo dos anos foram realizados vários estudos neste âmbito em distintos contextos ocupacionais, nomeadamente, indústrias de produção e polimerização de estireno, de plástico

reforçado e de estireno-butadieno (ATSDR, 2010). Estudos realizados em indústrias de plástico reforçado são aqueles que fornecem, geralmente, mais informação relacionada com a associação da exposição ao estireno e o desenvolvimento de cancro, principalmente, devido à estimativa relativamente rigorosa destes estudos, à exposição elevada neste contexto, a um tempo de acompanhamento médio, a um nível de detalhe elevado das análises epidemiológicas e a um potencial baixo de exposição a agentes que não o estireno (Collins & Delzell, 2018). Estes fatores são extremamente importantes, uma vez que, são fatores potencialmente confundidores das associações entre a exposição ao estireno e o cancro (Collins & Delzell, 2018). Estudos nos diferentes contextos ocupacionais sugerem um aumento da mortalidade por incidência de cancro no sistema linfohematopoiético, um aumento dos níveis de adutos de DNA e aumento de danos genéticos nos linfócitos. Particularmente, o risco de cancro linfohematopoiético foi encontrado em trabalhadores expostos a níveis elevados de estireno após algum tempo decorrente da primeira exposição (NTP, 2011). No total foram reportados 16 casos de leucemia e 9 casos de linfomas (IARC, 2002). Alguns estudos referem que o risco de cancro pode incrementar devido à exposição média, a exposição cumulativa ou ao número de anos de exposição (NTP, 2011). Apesar de existirem vários estudos epidemiológicos que sugerem uma associação entre a exposição ao estireno e o aumento do risco de leucemia e linfomas, as evidências são, geralmente, inconclusivas devido a exposição múltipla a agentes químicos e a inexistência de documentação referente aos níveis e a duração da exposição (ATSDR, 2010). Em animais, particularmente, camundongos o estireno provocou cancro nos pulmões por duas vias de exposição, a inalatória e a oral. Por sua vez, em ratos houve evidências insuficientes relativamente a carcinogenicidade do estireno, uma vez que, cancro nos pulmões não foi observado e resultados relativos ao cancro na glândula mamária foram ambíguos (NTP, 2011).

O mecanismo de carcinogenicidade do estireno ainda não é totalmente compreendido, sabe-se, no entanto, que de acordo com a IARC o seu metabolito SO está classificado como provavelmente cancerígeno para humanos (Grupo 2A) (Vineis, & Zeise, 2010; NTP, 2011). Existem evidências inadequadas do seu potencial cancerígeno em humanos, porém evidências suficientes em animais. O SO é capaz de formar adutos com o DNA em humanos, ratos e camundongos, de induzir mutações genéticas em bactérias e células de roedores *in vitro* e induzir aberrações cromossómicas e troca de cromátídeos-irmãos *in vitro* e *in vivo* em células humanas e camundongos, respetivamente (Vineis, & Zeise, 2010). Os possíveis modos de ação que explicam o potencial carcinogénico do estireno envolvem genotoxicidade, relevante para todos os tipos de cancro, efeitos citotóxicos de metabolitos no pulmão de camundongos e

imunossupressão, particularmente relevante para câncros do sistema linfohematopoéticos (NTP, 2011).

A *National Research Council* (NRC) realizou uma avaliação independente para determinar evidências do potencial carcinogénico do estireno, e revelou que existem evidências epidemiológicas que classificam este composto como um fator de risco para o desenvolvimento do linfoma não Hodgkin, leucemia e dos câncros do esófago, pâncreas e rim. Porém, não existem evidências credíveis para o cancro do pulmão e da mama (NRC, 2014). Nos últimos anos, a IARC reviu várias vezes a classificação do estireno, e recentemente, passou a classificar o estireno como provavelmente cancerígeno para humanos (grupo 2A), classificação que está em concordância com a do seu metabolito SO (IARC, *in press*).

2.3. Xileno

2.3.1. Características gerais

O xileno (C₈H₁₀) é caracterizado por ser um hidrocarboneto aromático, que consoante a posição do grupo metilo no anel de benzeno pode apresentar 3 formas isoméricas distintas: *meta*-xileno (*m*-xileno), *ortho*-xileno (*o*-xileno), e *para*-xileno (*p*-xileno). Esta substância química pode ser comercializada numa das formas isoméricas mencionadas anteriormente, ou mais comumente, como uma mistura das três formas isoméricas, normalmente, denominada de xilol (Langman, 1994; ATSDR, 2007; Kandyala *et al.*, 2010; Rajan & Malathi, 2014; Niaz *et al.*, 2015).

A mistura de xilenos ou xilol, normalmente, contém aproximadamente 40-65% de *m*-xileno, 20% de *o*-xileno, 20% de *p*-xileno, e ainda pequenas quantidades de etilbenzeno e tolueno (Aransiola *et al.*, 2013)


É uma substância que, em condições ambientais normais, é líquida, geralmente, incolor e com um odor doce. É inflamável, pouco solúvel em água e miscível em alguns solventes orgânicos, nomeadamente, o álcool e o éter (ATDSR, 2007; Kandyala *et al.*, 2010; Mohammadyan & Baharfar, 2015). Na tabela 7 estão descritas algumas propriedades físico-químicas do xileno. Este hidrocarboneto é volátil (ATDSR, 2007) e a sua forma gasosa é mais densa que ar e por isso pode dispersar para pontos longínquos. Neste estado físico é igualmente inflamável, podendo formar misturas explosivas com o ar (IPCS, 1992).

Tabela 7 Propriedades físico-químicas do xileno (Fonte: ATSDR, 2007).

Propriedades físico-químicas	Valores
Estado físico	Líquido
Cor	Incolor
Odor	Doce
Massa molecular	106.16
Densidade (20°C)	864 kg/m ³
Pressão de vapor (21°C)	≈ 0,9 kPa
Ponto de ebulição	137-140 °C
Ponto de inflamação	29 °C
Solubilidade em água (25°C)	106 mg/L

Segundo a ECHA, o xileno pode ser identificado com o número CAS 1330-20-7 e o número CE 215-535-7 ou com distintos *list numbers* iniciados com o número 9. O xileno é representado por diferentes números identificadores devido, principalmente, à sua composição, podendo ser uma substância de composição variável, em que variabilidade da composição é grande ou pouco previsível, ou uma substância multi-constituente, onde a composição e quantidade de cada um dos isômeros de xileno e etilbenzeno está bem definida e determinada. O xileno identificado com o número CAS 1330-20-7 e os isômeros de xileno apresentam classificação harmonizada de acordo com o anexo VI do Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (tabela 8).

Tabela 8 Classificação harmonizada do xileno (Fonte: ECHA).

	Advertências de perigo	Descrição	Pictogramas
Xileno	H226	Líquido e vapor inflamáveis.	
Número CAS: 1330-20-7	H315	Provoca irritação cutânea.	
Número CE: 215-535-7	H312	Nocivo em contacto com a pele.	
	H332	Nocivo por inalação.	

2.3.2. Produção e aplicação

O xileno, designação atribuída em 1851, foi descoberto como constituinte do alcatrão vegetal (Aransiola *et al.*, 2013). Este composto químico ocorre naturalmente do petróleo e do alcatrão, sendo formado também durante incêndios florestais (EPA, 1994; Aransiola *et al.*, 2013). O xileno representa, aproximadamente, 0,5 a 1% do petróleo bruto, e por isso, dependendo da fonte, pode ser encontrado em pequenas quantidades em combustíveis (Aransiola *et al.*, 2013). Este hidrocarboneto aromático é essencialmente um químico sintético que tradicionalmente é comercializado na forma de mistura dos três isómeros, sendo que cada um tem dois grupos metil ligados ao anel de benzeno (Aransiola *et al.*, 2013).

Industrialmente, aproximadamente, 95% do xileno é produzido através do processo de reforma catalítica da nafta que consiste na desidrogenação catalítica da nafta na presença de hidrogénio, de forma a reduzir a formação de coque, para produzir uma mistura com elevados teores de hidrocarbonetos aromáticos, particularmente, xileno. (Antos *et al.*, 2004; Aransiola *et al.*, 2013). Neste processo é recuperado, sensivelmente, 18% de xileno, que é composto, 15% de etilbenzeno e 1% de outros hidrocarbonetos (EPA, 1994; Aransiola *et al.*, 2013). Outros processos podem ser utilizados para a sua produção, nomeadamente, a pirólise da gasolina que representa 4% da produção total de xileno, o desproporcionamento do tolueno que representa, aproximadamente, 0,4% e a produção de óleo leve através de fornos de coque de carvão, que contém na sua composição 3 a 6% de xilenos e representa 0,2% da produção deste composto (EPA, 1994; Aransiola *et al.*, 2013).

A Europa, em 2015, era um dos maiores produtores de aromáticos, sobretudo, benzeno, tolueno e xilenos, representando um quarto da produção mundial. Particularmente nesse ano foram produzidas mais de 2,6 milhões de toneladas de xileno (APA, 2018). No caso particular dos EUA, o xileno é um dos 30 produtos químicos mais produzidos em termos de volume, tendo sido estimado em 2006 uma capacidade anual de produção de 18 milhões de toneladas (ASTDR, 2007; Rajan & Malathi, 2014). Especialistas referem que a procura de xileno vai incrementar 3,2% entre 2015 e 2020, o que pode levar conseqüentemente, a um aumento da produção e uso deste agente químico (Mohammadyan & Baharfa, 2015).

O xileno é um importante agente químico amplamente utilizado como solvente em variadas indústrias, tais como, de borracha, impressão, couro, tintas, vernizes e adesivos (Jacobson & McLean, 2003; Aransiola *et al.*, 2013; Rajan & Malathi, 2014). O maior consumo de xileno como solvente, sensivelmente, entre 65 a 70%, corresponde às indústrias de tintas e revestimentos (Aransiola *et al.*, 2013). Este composto pode

ainda ter a função de matéria-prima na indústria de plásticos e têxteis e ser um constituinte em lacas, corantes e detergentes de limpeza (Jacobson & McLean, 2003). O xileno pode ser utilizado em laboratórios, particularmente, na histologia para limpar tecidos para posterior análise microscópica (Aquino *et al.*, 2016). É usado no laboratório também para fazer banhos com gelo seco para arrefecer os vasos de reação, e como solvente para remover o óleo de imersão da objetiva do microscópio (Aransiola *et al.*, 2013). Tal como em outras indústrias o xileno pode ter a função de matéria-prima na produção de gasolina, sendo que mais de 90% da mistura de isómeros é utilizada para a produção da mistura de gasolina (Aransiola *et al.*, 2013).

2.3.3. Presença no ambiente

O xileno é um poluente ambiental libertado, maioritariamente, através de emissões fugitivas de fontes industriais, nomeadamente, refinarias de petróleo e fábricas de produção de produtos químicos. Outras fontes de xileno para o ambiente são a exaustão de automóveis e a sua volatilização durante o uso como solvente (ATSDR, 2007; Niaz *et al.*, 2015). É esperado que as emissões de xileno para o meio ambiente sejam na sua grande maioria para o ar devido a sua volatilidade. Estima-se que, aproximadamente, 99% do xileno seja distribuído no ar (WHO, 2003). A água e os solos também são suscetíveis de sofrer contaminação por parte deste composto devido às descargas/derrames nos cursos de água e derrames em terra resultantes do seu uso, armazenamento e transporte, inclusive, são conhecidos dois derrames acidentais na água, um no rio Mississípi (EUA) e outro no Porto de Zhuhai (China), decorrente do transporte marítimo deste composto químico (ATSDR, 2007; Duan *et al.*, 2017). O xileno presente nas águas é removido, maioritariamente, através da sua volatilização no caso de águas superficiais e de processos de biodegradação em águas subterrâneas (ATSDR, 2007; Cheng *et al.*, 2016; Duan *et al.*, 2017). É expectável que o xileno libertado para a água e para os solos volatilize para a atmosfera e seja rapidamente degradado através da luz solar, uma vez que, o seu tempo de semi-vida na atmosfera é entre 8 e 14 horas (ATSDR, 2007). Estima-se que 0,7% e 0,1% do xileno seja distribuído para a água e solos, respetivamente (WHO, 2003). As quantidades deste composto químico nestes compartimentos ambientais que não sofram volatilização são rapidamente biodegradados. O xileno pode igualmente chegar às águas subterrâneas e neste caso, a duração do seu processo de remoção pode variar dependendo das condições, nomeadamente, da temperatura, presença de oxigénio e presença de retores de eletrões. O tempo de semi-vida do xileno neste compartimento ambiental pode variar entre 25 e 287 dias (ATSDR, 2007).

O xileno também faz parte de um grupo de compostos orgânicos voláteis (COV) prioritários para o meio ambiente, o BTX (Benzeno, Tolueno e Xileno). Este grupo é conhecido por causar poluição no ar, solos e água nas proximidades de locais de produção de petróleo e gás natural, de postos de gasolina e reservatórios de petróleo (Rostami & Jafari, 2014; Morakinyo *et al.*, 2017).

2.3.4. Exposição ocupacional

O xileno é produzido em elevadas quantidades e utilizado num amplo espectro de aplicações, especialmente, como solvente e constituinte da gasolina. Nesse sentido, existe um potencial elevado de exposição em contextos industriais que produzam e utilizem este composto químico (Zailina *et al.*, 2013). A exposição ao xileno no local de trabalho ocorre, principalmente, por 2 vias de exposição, inalatória e dérmica, e é, geralmente, associada a emissões resultantes do processo e armazenamento ou emissões fugitivas de indústrias produtoras de petróleo, tintas e plásticos (ATSDR, 2007). Em pequenas quantidades pode ainda ser utilizada na indústria farmacêutica e cosmética, na impressão, nos detergentes de limpeza e pesticidas (Mohammadyan & Baharfa, 2015). O xileno é considerado um poluente perigoso presente no ar, que devido à sua vasta utilização pode ser amplamente emitido para o ar dos mais diversos locais de trabalho. A exposição aguda e crônica ao xileno pode causar efeitos nefastos à saúde, que são influenciados pela concentração do agente químico e pela duração da exposição (Mohammadyan & Baharfa, 2015).

Vários estudos têm sido desenvolvidos no âmbito da exposição ocupacional ao xileno. Um estudo desenvolvido há vários anos, que envolveu 89 trabalhadores de sete fábricas de aplicação de tintas e colas, maioritariamente, por pulverização, demonstrou que a maioria das atividades de pulverização apresentava uma exposição baixa a moderada de xileno, variando entre 0,7 e 3,7 ppm (ATSDR, 2007). Um estudo realizado em indústrias de tintas na Colômbia revelou níveis de xileno em áreas de produção inferiores a 48,2 ppm e em áreas administrativas inferiores a 9,7 ppm (Cárdenas-Bustamante *et al.*, 2007). Ainda na Colômbia, outro estudo realizado em empresas de pintura de automóveis mediu concentrações de xileno entre 28,92 e 150,15 ppm (Palma *et al.*, 2015). A avaliação da exposição ocupacional em postos de combustível também foi estudada, uma vez que, os trabalhadores estão expostos à mistura BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno). Um estudo realizado neste contexto revelou uma concentração de xileno inferior a 1 ppm (Amaral *et al.*, 2017). Segundo Mohammadyan & Baharfar (2015), a exposição ao xileno pode reduzir significativamente com a instalação de exaustão localizada nos locais trabalho. Neste caso particular, foi obtido

um valor máximo da média de concentrações inferior a 10,4 ppm antes da instalação deste equipamento de proteção coletiva e um valor máximo da média de concentrações inferior a 1,9 ppm após a sua instalação.

No caso particular dos EUA, os limites de exposição em ambientes ocupacionais estão igualmente bem definidos para exposições de 8h e de curta duração, não existindo diferenças entre as principais entidades que os definem (tabela 9).

Tabela 9 Valores limite definidos nos EUA (Fonte: *GESTIS International Limit Values; ACGIH, 2017*).

	TLV-TWA (ppm)	TLV-STEL (ppm)
ACGIH American Conference of Governmental Industrial Hygienists	100	150
OSHA Occupational Safety and Health Administration	100	ND
NIOSH National Institute for Occupational Safety and Health	100	150

ND = Não definido

Tal como para o estireno, estão estabelecidos VLE para o xileno na grande generalidade dos países europeus (tabela 10). No caso específico de Portugal, está definido no Decreto-Lei n.º 24/2012, relativo à proteção dos trabalhadores contra os riscos de exposição a agentes químicos, um VLE-MP de 50 ppm (221 mg/m³) e um VLE-CD de 100 ppm (442 mg/m³). Adicionalmente, está também definido no Anexo I da Norma Portuguesa 1796 de 2014, um VLE-MP e um VLE-CD de, 100 e 150 ppm, respetivamente.

Tabela 10 Valores limite de exposição para o xileno em países europeus (Fonte: *GESTIS International Limit Values*).

Países	Valor limite (8h)		Valor limite (curta duração)	
	ppm	mg/m ³	ppm	mg/m ³
Alemanha	100	440	200	880
Áustria	50	221	100	442
Bélgica	50	221	100	442
Dinamarca	25	109	50	218
Espanha	50	221	100	442
Finlândia	50	220	100 (15min.)	440 (15min.)
Holanda	--	210	--	442
Hungria	--	221	--	442
Irlanda	50	221	100 (15min.)	442 (15min.)

Tabela 11 Valores limite de exposição para o xileno em países europeus (Fonte: *GESTIS International Limit Values*).

Países	Valor limite (8h)		Valor limite (curta duração)	
	ppm	mg/m ³	ppm	mg/m ³
Itália	50	221	100 (15min.)	442 (15min.)
Polónia	--	100	--	--
Reino Unido	50	220	100	441
Suécia	50	221	100 (15min.)	442 (15min.)
Suíça	100	435	200	870

No que concerne aos IBE, o ácido metilhipúrico (MHA) tem sido extensivamente reportado como o principal metabolito urinário resultante da exposição ao xileno. Nesse sentido, vários estudos realizados em distintos contextos ocupacionais utilizaram o MHA como IBE do xileno (Jacobson & McLean, 2003; Roma-Torres *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007; Bahrami *et al.*, 2008). A ACGIH propõe um valor de 1,5 g de MHA/g de creatinina após o fim de turno decorrente de uma exposição de 100 ppm (ACGIH, 2017). Tal como referido anteriormente, a Norma Portuguesa 1796 de 2014, adota os IBE propostos pela ACGIH. O SCOEL não define qualquer valor-limite biológico para o xileno na UE (SCOEL, 2014). Enquanto que a DFG estabelece como IBE de xileno na urina o MHA, e um BAT de 2000mg/L (após o turno de trabalho) (DFG, 2014).

2.3.5. Toxicocinética e toxicodinâmica

A exposição ao xileno pode ocorrer por diversas vias, tais como, inalatória, oral e dérmica (Kandyala *et al.*, 2010). Todavia, as principais vias de absorção do xileno são as vias inalatória e oral (ATSDR, 2007; Rajan & Malathi, 2014). Os vapores de xileno são rapidamente absorvidos pelos pulmões sendo que, aproximadamente, 60% do xileno inspirado é retido e alcança a circulação sistémica (Jacobson & McLean, 2003; ATSDR, 2007). Por sua vez, quando ingerido, sensivelmente, 90% deste composto químico é absorvido (ATSDR, 2007). A absorção de xileno através da via dérmica também pode ocorrer, porém numa extensão inferior quando comparada com as duas vias supracitadas. Na via dérmica, em particular, o xileno líquido ou os seus vapores são absorvidos lentamente através da pele (Langman, 1994; Jacobson & McLean, 2003; ATSDR, 2007; Mohammadyan & Baharfa, 2015).

Após a absorção, o xileno é rapidamente distribuído por todo o corpo através da circulação sistémica (ATSDR, 2007; Rajan & Malathi, 2014). O coeficiente de partição (K_{ow}) do xileno é superior a 3, para todas as suas formas isoméricas, o que indica que

é expectável que a sua distribuição ocorra primeiro em tecidos com quantidades elevadas de lípidos, tais como, tecido adiposo, fígado e cérebro (EPA, 2003; ASTDR, 2007). Espera-se inclusive que entre 10 e 20% do xileno que é absorvido seja distribuído no tecido adiposo, este apresenta a maior concentração de gordura e conseqüentemente maior afinidade com o xileno do que a maioria dos tecidos. Nesse sentido, quando o xileno chega ao tecido adiposo, é expectável que tenha um metabolismo mais lento, que demore até alcançar o sangue e tenha uma maior persistência no organismo (EPA, 2003). Porém, não é expectável que o xileno se acumule no organismo, mas sim que fique brevemente retido no tecido adiposo (ATSDR, 2007). Devido às suas propriedades lipofílicas, o xileno penetra facilmente na placenta até aos tecidos fetais, podendo também ser distribuído no leite materno (ATSDR, 2007).

O metabolismo do xileno, independentemente do isómero ou da via de exposição, inicia-se com reações de fase I, que ocorrem principalmente no fígado, e consistem na oxidação do grupo metilo da cadeia lateral para formar ácidos metilbenzóicos. Posteriormente, ocorrem as reações de fase II, que abrangem a conjugação com glicina para originar o ácido metilhipúrico (MHA) (figura 2) (ATSDR, 2007; Niaz *et al.*, 2015). Na ausência de glicina, outras vias metabólicas podem ser ativadas, nomeadamente, a conjugação com ácido glicurónico ou a hidroxilação aromática para formar xilenóis (ATSDR, 2007). Nos humanos, o CYP2E1 é a enzima mais importante do fígado, e é através da ação desta enzima que é possível o xileno ser biotransformado e, finalmente, formar o seu metabolito primordial, o MHA (Niaz *et al.*, 2015).

Em humanos, aproximadamente, 95% do xileno é metabolizado no fígado e excretado através de metabolitos na urina, quase exclusivamente, MHA (Jacobson & McLean, 2003; ATSDR, 2007). Somente 0,005% dos isómeros de xileno absorvidos são eliminados inalterados na urina e, cerca de 2% é eliminado na forma de xilenóis (ATSDR, 2007).

A excreção de MHA é geralmente rápida podendo surgir na urina após 2 horas de exposição (ATSDR, 2007). Em 24h, sensivelmente, 70 a 80% dos metabolitos são excretados na urina (Jacobson & McLean, 2003). Todavia, o xileno aparenta ter duas fases distintas de eliminação, uma rápida em que o tempo de semi-vida é de 1 hora e corresponde a eliminação nos músculos, e outra fase mais lenta em que o tempo de semi-vida é de 20 horas e corresponde a eliminação no tecido adiposo. Existem ainda fatores que podem influenciar a quantidade de xileno que é absorvida pelo organismo e conseqüentemente a quantidade de ácido metilhipúrico que é excretado pela urina, nomeadamente, a prática de exercício físico e o peso corporal (ATSDR, 2007).

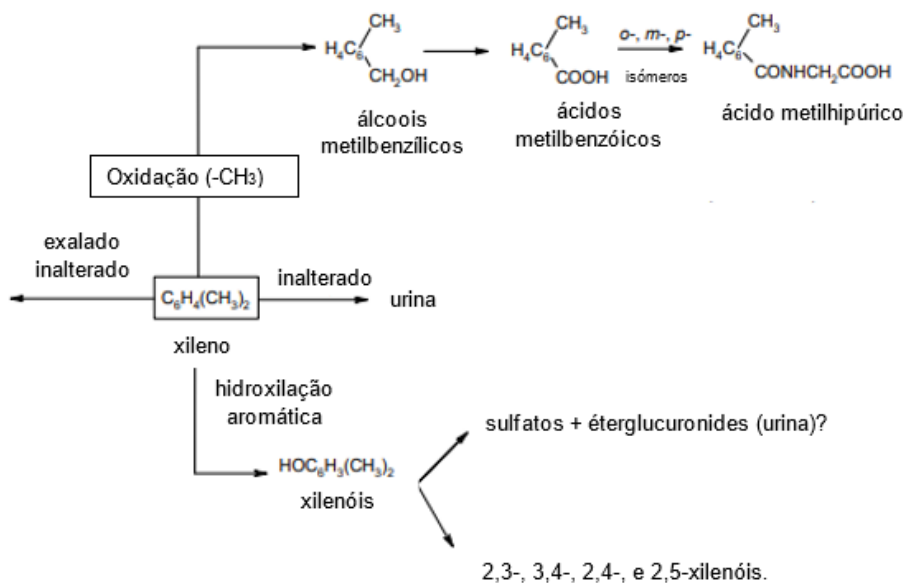


Figura 2 Metabolismo no xileno em humanos (Adaptado: ATSDR, 2007).

Relativamente aos seus mecanismos de toxicidade, o xileno é caracterizado por ser um composto lipofílico, o que permite a sua dissolução em membranas lipídicas provocando efeitos irritantes a nível cutâneo, da mucosa das vias respiratórias, dos olhos e do sistema gastrointestinal (ATSDR, 2007; Niaz *et al.*, 2015). Esta característica permite igualmente induzir propriedades anestésicas e narcóticas, porém o mecanismo ainda não é totalmente compreendido. É descrito que a interação do xileno com a membrana celular consegue mudar a permeabilidade da membrana e a sinalização do impulso nervoso das células mais próximas (Niaz *et al.*, 2015). No caso particular do fígado o xileno pode ser altamente tóxico devido à indução da apoptose através da elevada produção de proteases, especificamente, a caspase-3 e a caspase-9 (Al-Ghamdi *et al.*, 2003; 2004; ATSDR, 2007; Niaz *et al.*, 2015). Segundo Niaz *et al.*, (2015) existem ainda estudos que revelam que a exposição de curta duração a concentrações elevadas de xileno podem levar à produção CYP2E1, promovendo formação de intermediários oxidativos e consequentemente necrose.

2.3.6. Efeitos para a saúde

O xileno, devido a sua afinidade com os lípidos, é rapidamente absorvido por todas as vias de exposição e facilmente distribuído no organismo. Alguns dos efeitos resultantes da exposição a este hidrocarboneto aromático envolvem, dependendo da via de exposição, o sistema nervoso, o trato respiratório, o fígado, os rins e peso corporal (ATSDR, 2007). A exposição aguda ao xileno por via inalatória pode provocar irritação ocular, do nariz e da garganta, bem como efeitos no trato gastrointestinal e neurológicos.

Decorrente de uma exposição crónica podem surgir efeitos no sistema nervoso central, sistema respiratório e sistema renal (Jacobson & McLean, 2003; Kandyala *et al.*, 2010; Rajan & Malathi, 2014; Mohammadyan & Baharfa, 2015).

2.3.6.1. Efeitos neurológicos

Os efeitos primordiais decorrentes da exposição ao xileno envolvem o sistema nervoso, independentemente da via de exposição (ATSDR, 2007). Semelhante a outros solventes orgânicos, a exposição aguda por inalação ao xileno tem efeitos neurológicos rapidamente observáveis, os vapores deste composto químico quando inalados provocam depressão do sistema nervoso central provocando uma diversidade de sintomas, tais como, dor de cabeça, tonturas, náuseas e vômitos (Kandyala *et al.*, 2010; OEHHA, 2012). Os sintomas podem surgir após exposições com concentrações baixas de xileno e são, geralmente, reversíveis, porém, tornam-se mais perceptíveis e graves à medida que o tempo da exposição aumenta (tabela 11) (Kandyala *et al.*, 2010). Em humanos o limite para efeitos neurológicos reversíveis a curto prazo, parece ser, aproximadamente, entre 100 e 200 ppm. Somente foram associados danos ou diminuição da capacidade neurológica resultantes de exposições ao xileno entre os 800 e 10000 ppm (OEHHA, 2012). Estudos de exposição crónica ao isómero *m*-xileno em animais revelam que foram observados efeitos estatisticamente significativos em testes neurocomportamentais realizados 24h após a última exposição ao xileno (OEHHA, 2012).

Os efeitos no sistema nervoso central resultantes da exposição ao xileno são atribuídos à sua lipossolubilidade na membrana neuronal. Este composto químico vai perturbar a ação de proteínas essenciais à função neuronal através da rutura do meio lipídico onde as proteínas da membrana atuam, ou através da interação direta com as proteínas nas membranas (Kandyala *et al.*, 2010).

Tabela 12 Efeitos no sistema nervoso decorrentes da exposição ao xileno (Fonte: Kandyala *et al.*, 2010).

Concentração no ar (ppm)	Sintomas
100 - 200	Náuseas e dores de cabeça
200-500	Sensação de euforia, tonturas, fraqueza, irritabilidade, vômitos, aumento do tempo de reação
800-10000	Vertigens, confusão, imperícia, fala arrastada, perda de equilíbrio e zumbido nos ouvidos
> 10000	Sonolência, perda de consciência e morte

Vários estudos realizados em ambientes ocupacionais evidenciaram que a exposição aguda e crônica ao xileno ou a misturas de solventes que contém na sua composição xileno podem estar associados a efeitos neurológicos. Todavia, a maioria dos estudos revelam que é difícil associar estes efeitos somente ao xileno, uma vez que, usualmente, estão presentes nos locais de trabalho uma variedade de agentes químicos (ATSDR, 2007).

2.3.6.2. Efeitos respiratórios

A exposição ao xileno a concentrações iguais ou superiores a 200 ppm pode causar irritação do nariz, garganta e pulmões, causar dor no peito e dificuldades respiratórias. A exposição extrema a este composto, por exemplo, em espaços confinados e/ou a concentrações muito elevadas pode resultar em edema pulmonar, uma condição médica potencialmente mortal. Todavia, não existem evidências de que a exposição crônica ou a concentrações mais baixas tenham efeitos a longo prazo no pulmão (ATSDR, 2007; Kandyala *et al.*, 2010).

Em contextos ocupacionais, trabalhadores expostos a vapores decorrentes do aquecimento de xileno revelaram dispneia e dores de garganta (Trujillo *et al.*, 2003; Niaz *et al.*, 2015). Um estudo revelou ainda que o aumento significativo de níveis de xileno no local de trabalho pode provocar irritação do nariz e esôfago de indivíduos expostos cronicamente a este composto (Uchida *et al.*, 1993; Niaz *et al.*, 2015).

Vários estudos realizados em animais demonstraram efeitos respiratórios resultantes da exposição, a curto ou médio prazo, ao xileno semelhantes aos detectados em humanos, nomeadamente, irritação do trato respiratório, dificuldade respiratória, diminuição da respiração, hemorragias pulmonares pontuais e células pulmonares danificadas (ATSDR, 2007; Niaz *et al.*, 2015).

2.3.6.3. Efeitos hepáticos e renais

A níveis de exposição altos, o xileno pode provocar efeitos nocivos no sistema hepático e renal, porém é pouco provável que ocorram sem que primeiro sejam perceptíveis efeitos no sistema nervoso. A níveis de exposição mais baixos, geralmente, não são esperados efeitos no fígado e nos rins (Kandyala *et al.*, 2010). Em humanos existem dados limitados sobre os efeitos renais resultantes da exposição ao xileno ou a misturas de solventes que contém xileno (ASTDR, 2007). Alguns estudos referem que a exposição ao xileno pode ser responsável pelo aumento da acidez nos túbulos renais, aumento dos níveis de ureia no sangue, diminuição da creatinina na urina e hematuria (ATSDR, 2007; Niaz *et al.*, 2015). Outros estudos referem que o aumento nos níveis urinários de

β -glicuronidase, ou o aumento na excreção urinária de albumina, eritrócitos e leucócitos podem muitas vezes ser confundidos pela exposição concomitante a quantidades substanciais de tolueno, caracterizado por ser nefrotóxico (ATSDR, 2007). Os efeitos em particular do *m*-xileno ao nível dos rins podem depender da concentração e da dose que levam à agregação deste isómero às gorduras dos rins (Niaz *et al.*, 2015).

Um estudo realizado em contexto ocupacional a níveis relativamente baixos de xileno durante, aproximadamente, 7 anos revelaram a inexistência de efeitos na função renal dos trabalhadores, sugerindo que a exposição ocupacional a concentrações baixas deste composto químico não provoca efeitos nocivos nos rins (Uchida *et al.*, 1993; ATSDR, 2007).

Em animais, foram observados efeitos renais a concentrações de xileno entre 50 a 2000 ppm, incluindo o aumento da atividade enzimática nos rins, aumento do conteúdo renal de citocromo P450 e aumento do peso do rim (ATSDR, 2007).

Relativamente a efeitos hepáticos, em humanos, é no fígado que a principal enzima, CYP2E1, converte o xileno em ácidos metilbenzóicos para formar os ácidos metilhipúricos. Indivíduos expostos no local de trabalho ao xileno por diferentes vias de exposição revelaram quantidades elevadas de ácido D-glucárico na urina, que indica uma redução da atividade enzimática no fígado (Niaz *et al.*, 2015). Um estudo realizado em contexto ocupacional onde os trabalhadores estiveram expostos a xileno a concentrações sensivelmente baixas durante 7 anos, não revelaram alterações nos valores bioquímicos que refletem a função hepática, nomeadamente, na bilirrubina total, no aspartato aminotransferase, entre outros (Uchida *et al.*, 1993; ATSDR, 2007). Estes resultados sugerem que a exposição crónica ao xileno a níveis baixos não tem efeitos hepáticos (ATSDR, 2007).

Estudos em ratos revelam que a exposição ao xileno ou aos seus isómeros pode induzir uma grande variedade de enzimas hepáticas e incrementar o conteúdo hepático do citocromo. Em exposições agudas em ratos e coelhos foram observados uma variedade de efeitos, sobretudo, aumento do peso relativo do fígado, do conteúdo do citocromo P450, de proteínas microssomais, da atividade enzimática microssomal e proliferação do retículo endoplasmático (ATSDR, 2007; Niaz *et al.*, 2015).

2.3.6.4. Efeitos genotóxicos

A exposição crónica ao xileno está associada a efeitos nocivos à saúde humana, porém a *World Health Organization* (WHO) não considera que este composto químico esteja associado a efeitos genotóxicos (WHO, 1996; Aquino *et al.*, 2016). Efetivamente, dados provenientes de testes *in vivo* e *in vitro* indicam que o xileno não é mutagénico e não

induz anomalias cromossômicas. No entanto, alguns estudos referem a possibilidade de ocorrência de fragmentação do DNA se as células estiverem expostas a níveis de xileno que causem citotoxicidade. Esta fragmentação do DNA pode estar associada à atividade das nucleases em células quase mortas (ATSDR, 2007). Existem resultados limitados neste âmbito que indicam ainda que o xileno reduz a viabilidade celular e o aumento de danos no DNA (Al-Ghamdi *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2008, Singh *et al.*, 2011; Aquino *et al.*, 2016).

Resultados obtidos num estudo realizado em 18 trabalhadores de laboratórios de patologia revelou que a exposição ocupacional ao xileno pode causar dano no DNA, e que este dano pode aumentar ao longo da semana de trabalho. Sendo observado uma redução significativa do dano durante o fim-de-semana, muito provavelmente devido ausência de exposição e aos mecanismos de reparação do DNA (Aquino *et al.*, 2016). Resultados obtidos de outros estudos sugerem que a exposição ao xileno por via inalatória em humanos não está associado a trocas de cromátídeos-irmãos ou aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos. Em animais, particularmente, ratos a exposição por inalação a este solvente orgânico também não está associada a aberrações cromossômicas (ATSDR, 2007).

2.3.6.5. Efeitos cancerígenos

Não existem evidências adequadas de que o xileno seja cancerígeno para humanos (Kandyala *et al.*, 2010). E os dados existentes neste âmbito são bastante limitados, inclusive, a IARC e a *United States Environmental Protection Agency* (EPA) referem que as informações existentes são insuficientes para determinar se o xileno é ou não cancerígeno e por isso consideram-no não classificado como cancerígeno para humanos (ATSDR, 2007). Segundo a IARC (1999), devido a múltiplos contextos de exposição, às numerosas interferências e a fraca consistência dos resultados da maioria dos estudos realizados, estes estudos não são fortes o suficiente para estabelecer uma associação com a exposição ao xileno.

Alguns estudos epidemiológicos foram desenvolvidos com o objetivo de procurar associações entre a exposição ao xileno e cancros específicos, porém os resultados não demonstraram associação ou apresentaram um número limitado de casos expostos ao xileno e/ou expostos simultaneamente a múltiplos solventes (ATSDR, 2007). Dois estudos realizados em trabalhadores ocupacionalmente expostos a solventes analisaram o risco de cancro e leucemia, e sugeriram uma possível relação entre a exposição ao xileno e o aparecimento de leucemia. Porém, ambos os estudos apresentaram limitações, sobretudo, o número limitado de participantes, inexistência

das concentrações de exposição e composição do xileno desconhecida, o que impede uma conclusão definitiva sobre a carcinogenicidade deste composto por via inalatória (ATSDR, 2007).

Um estudo de coorte realizado numa instalação de manutenção de aeronaves avaliou 104 trabalhadores que tinham estado expostos ao xileno. Neste estudo, as avaliações de mortes por mieloma múltiplo ou linfoma não-Hodgkin não revelaram casos de trabalhadores expostos ao xileno (Spirtas *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1991; ATSDR, 2007). Outro estudo de caso-controlo estimou que a população exposta ocupacionalmente ao xileno apresentava evidências limitadas de aumento do risco de cancro do colón e reto após uma exposição com níveis elevados. Porém, este estudo apresenta algumas limitações, sobretudo, a falta de informação sobre as concentrações de exposição, a composição do xileno desconhecida, o número reduzido de casos e o facto de a grande maioria dos trabalhadores estar igualmente exposto a outros compostos químicos, tais como, tolueno e benzeno. (ATSDR, 2007).

2.4. Avaliação da exposição humana

A exposição, em contextos ambientais ou ocupacionais, pode ser definido como o processo de contacto entre um indivíduo e uma substância, que pode ocorrer por uma ou várias vias, nomeadamente, inalatória, dérmica, oral e por injeção. Este conceito tende, muitas vezes, a provocar emoções negativas, existindo uma preocupação crescente com a nossa saúde quando sabemos que fomos expostos a um agente químico, físico ou infeccioso (Semple, 2005). A avaliação da exposição, particularmente, é um processo utilizado para a identificação de populações potencialmente expostas, do tipo de exposição e da sua magnitude (Bress, 2009; Sheldon, 2010). As avaliações da exposição identificam a população exposta, descrevendo a sua composição e tamanho, e apresentam a magnitude, a frequência, o tipo e a duração da exposição. Após a sua determinação, os resultados obtidos associados a outras informações toxicológicas devem ser utilizados para caracterizar riscos potenciais (Bress, 2009). Nesse sentido, a avaliação da exposição tem como objetivo primordial a prevenção (Berglund *et al.*, 2001). A fase de avaliação da exposição no processo de avaliação do risco surge após a identificação do perigo e da relação dose-resposta (NRC, 2003). No caso particular da Indústria Química, ao longo do processo de avaliação da exposição, a definição das condições operacionais em que o produto químico é utilizado é fundamental, uma vez que, que estas podem ser influenciadas consoante os níveis de exposição. A avaliação da exposição numa fase inicial de projeto é bastante difícil, uma vez que, requer uma grande quantidade de informação, nomeadamente, o tipo de

ventilação existente e forma como é feito o manuseamento de produtos químicos. Nestas indústrias a avaliação da exposição é uma preocupação crescente, e por esse motivo vários métodos para quantificar a exposição humana têm sido desenvolvidos (Phneah *et al.*, 2017). A exposição a agentes químicos é, geralmente, mais elevada em contextos ocupacionais do que não-ocupacionais. No entanto, as exposições ambientais podem ter uma duração muito superior às exposições no local de trabalho e a via de exposição também pode ser distinta consoante a exposição ambiental ou ocupacional. Diferentes grupos podem estar expostos à mesma substância de forma diferente (Semple, 2005).

A avaliação da exposição deve ter em conta os vários modos de contato possíveis, nomeadamente, salpicos, aerossóis, entre outros (NRC, 2003). A forma como o agente químico entra no organismo, é denominado de via de exposição. As 3 principais vias de exposição em humanos são a inalatória, dérmica e oral (Berglund *et al.*, 2001). Em contextos ocupacionais, a exposição por inalação é mencionada frequentemente como a via mais importante em termos de toxicidade potencial, seguida da via dérmica e oral (Cherrie *et al.*, 2006). A via inalatória tem, tradicionalmente, um foco maior em questões ambientais e ocupacionais, uma vez que, o efeito direto no sistema respiratório decorrente da exposição a vários agentes está bem estudado e descrito. O desenvolvimento de doenças crónicas decorrentes da exposição ocupacional por via inalatória, tais como, silicose e a asbestose, também é reconhecido e está extensivamente documentado (Semple, 2005). A exposição por via dérmica pode ser particularmente importante, quando ocorre exposição a compostos químicos lipofílicos, que são absorvidos diretamente pela pele e chegam facilmente à corrente sanguínea, inclusive, a exposição por esta via a solventes, muitas vezes caracterizados pelas suas propriedades lipofílicas, é reconhecida como um problema significativo em contextos ocupacionais (Semple, 2005). A exposição por via oral, particularmente, a produtos químicos, ainda não é bem compreendida (Semple, 2005). Esta via de exposição tende a ser pouco considerada principalmente devido aos seguintes motivos: (1) crença comum de que a ingestão de substâncias perigosas só pode ocorrer intencionalmente ou por atos de negligência grave, e que por essa razão, pode ser evitada; (2) o reconhecimento de que vários materiais são absorvidos de forma pouco significativa pelo intestino e, como tal, é improvável que produzam efeitos nocivos à saúde quando ingeridos em baixas quantidades e porque podem ser metabolizados no fígado e, conseqüentemente, excretados antes de provocar qualquer efeito tóxico; (3) o pressuposto que, quando um trabalhador é exposto por inalação, contato com a pele e ingestão, a quantidade de material ingerido pela via oral seja relativamente pequena em comparação com as outras vias (Cherrie *et al.*, 2006).

Em ambientes ocupacionais, a maioria dos estudos considera exposições por via inalatória, uma vez que, esta é considerada a principal via de entrada dos contaminantes no organismo. Vários estudos realizaram colheitas de amostras de ar com o objetivo de estimar as concentrações inaladas pelos trabalhadores. Atualmente na nossa sociedade, e devido aos avanços tecnológicos, já é possível realizar colheitas de elevadas quantidades de amostras de ar e, assim, reduzir as incertezas na quantificação dos níveis de exposição (Clerc & Vincent, 2014). Uma das principais ferramentas utilizadas para prevenir efeitos nefastos na saúde dos trabalhadores é a fixação de limites exposição (Swaminathan, 2011). De forma a proteger os trabalhadores expostos, VLE ocupacionais para 8 horas foram definidos com base na toxicidade específica de cada agente químico. Para que seja possível a comparação entre a exposição dos trabalhadores com os VLE de 8h, é necessária uma estratégia de amostragem ambiental (Clerc & Vincent, 2014). Os métodos disponíveis para avaliação da exposição dérmica foram desenvolvidos nas últimas décadas, maioritariamente, em estudos relativos à exposição a pesticidas. Porém, a exposição por via dérmica é pouco compreendida comparativamente com a exposição inalatória, e os seus métodos aplicados em contextos ocupacionais não são padronizados e sofrem de problemas específicos (Semple, 2005). Por fim, a exposição por via oral é difícil de avaliar diretamente, contudo, pode ser realizada indiretamente através de monitorização biológica quando a contribuição das outras vias de exposição é bem compreendida. Modelos farmacocinéticos podem ser utilizados para estimar a quantidade dos contaminantes que é absorvida por esta via de exposição (Semple, 2005). Outro método utilizado para avaliar exposições humanas é a biomonitorização, que lida com a avaliação da exposição individual, efeito e suscetibilidade a uma variedade de fatores de risco ocupacionais, e é uma ferramenta essencial na avaliação de riscos associados a contextos ocupacionais e na prática de saúde ocupacional (Manno *et al.*, 2010).

2.5. Monitorização ambiental

A monitorização ambiental de compostos químicos pode ser definida como a quantificação de um determinado agente químico presente na atmosfera do local de trabalho e a posterior comparação com referenciais legislativos e/ou normativos adequados (DGS, 2018). Baseia-se, assim, na determinação da concentração de um agente químico na atmosfera de trabalho, isto é, de um indicador de dose externa, utilizando como critério de aceitabilidade os valores máximos admissíveis a que a maioria dos trabalhadores pode estar exposto, ao longo do dia de trabalho, sem que daí resulte qualquer efeito nocivo para a sua saúde (Prista & Uva, 2003). Os valores

máximos admissíveis, em Portugal denominados de VLE, representam a maior concentração de uma substância química a que a maioria ou a totalidade dos trabalhadores pode estar exposta, ao longo de um dia de trabalho, sem que daí resulte efeitos nocivos para a sua saúde (Prista & Uva, 2006). Segundo a Norma Portuguesa 1796 de 2014, os VLE podem ser formulados de 3 diferentes tipos: (1) a Concentração-Máxima (VLE-CM) que representa a concentração que nunca deve ser excedida durante qualquer período de exposição; (2) a Concentração de Curta Duração (VLE-CD) definida como máxima concentração que não deve exceder os 15 minutos e não deve ocorrer mais de 4 vezes por dia; (3) a Concentração de Média Ponderada (VLE-MP) que representa a concentração média ponderada para um dia de trabalho de 8 horas e uma semana de 40 horas. Todavia, é importante referir que a exposição a valores de concentração inferiores a VLE não invalida que alguns dos indivíduos expostos não possam apresentar respostas de intensidade acrescida, efeitos adversos ou agravamento de situações pré-existentes (Prista e Uva, 2003).

A avaliação ambiental evidencia a exposição no local de trabalho e no exato contexto das condições em que ela é avaliada. É, por assim dizer, uma avaliação teórica do risco, na medida em que unicamente revela aquilo a que o trabalhador está exposto no momento exato da avaliação (Prista & Uva, 2003). Ao longo dos últimos anos, à medida que a nossa sociedade foi gradualmente avançando, a monitorização ambiental tornou-se mais complexa, não se limitando a uma amostragem aleatória e estando focalizada na avaliação de riscos e no uso de ferramenta de avaliação do risco para determinar os métodos mais adequados para a monitorização ambiental em diferentes contextos (Sandle, 2006). Este tipo de monitorização envolve a recolha de uma ou mais medições com o objetivo de avaliar o *status* de um determinado contexto. No entanto, é fundamental que os objetivos, as estratégias de recolha de dados e os métodos de análise usados durante o processo de monitorização sejam bem definidos com antecedência para que os resultados obtidos sejam robustos e representativos do que se pretende avaliar (Artiola & Warrick, 2004).

2.6. Monitorização biológica

A monitorização biológica consiste na medição repetida e controlada de substâncias químicas ou marcadores bioquímicos em matrizes biológicas em indivíduos expostos a riscos químicos, biológicos ou físicos (Manno *et al.*, 2010; Ladeira & Viegas, 2016). Este tipo de monitorização, em contextos ocupacionais, tem 3 objetivos primordiais: (1) avaliação da exposição individual ou coletiva; (2) proteção da saúde dos trabalhadores; (3) avaliação do risco à saúde ocupacional (Manno *et al.*, 2010). A abordagem da

biomonitorização destina-se a deteção de biomarcadores, que são indicativos, quando comparados com valores referência adequados, tais como, IBE (Manno *et al.*, 2010; Ladeira & Viegas, 2016). Nos últimos anos, o uso de biomarcadores de efeito e suscetibilidade para a avaliação da exposição humana aumentou consideravelmente. Consequentemente, as técnicas de biomonitorização, originalmente limitadas a alguns produtos químicos, são atualmente aplicadas a uma variedade de situações de exposição e tornaram-se uma ferramenta útil na avaliação do risco, principalmente, em contextos ocupacionais (Manno *et al.*, 2014). Os biomarcadores são geralmente mais específicos e sensíveis quando comparados com a maioria dos ensaios clínicos existentes e, portanto, podem ser uma ferramenta mais eficaz na avaliação da relação causal entre efeitos na saúde e a exposição a um determinado composto químico (Valverde & Rojas, 2009a; 2009b; Manno *et al.*, 2010; Ladeira & Viegas, 2016).

Quando comparado com a monitorização ambiental, a biomonitorização fornece informações complementares, nomeadamente, a absorção total integrada do produto químico por diferentes vias de absorção, uma estimativa da exposição atual ou passada, o grau de metabolização, os efeitos biológicos precoces e a capacidade do organismo de suportar e responder a reações químicas. Estas informações podem ser eficazes na melhoria da avaliação de riscos ocupacionais a nível individual e/ou de grupo (Manno *et al.*, 2010). A biomonitorização é o melhor indicador do que efetivamente é absorvido pelo organismo, indicando a verdadeira dose interna ou as reais alterações por esta induzidas e, portanto, um importante avaliador do risco. Outra vantagem da biomonitorização é a sua quantificação prática, rápida e económica relativamente ao recurso a parâmetros ambientais (Prista & Uva, 2006). Contudo, existem alguns aspetos importantes de salientar, nomeadamente, que a biomonitorização só é passível de ser realizada com substâncias químicas que sejam absorvidas. A utilização de técnicas de biomonitorização requer igualmente um adequado conhecimento das características toxicocinéticas e toxicodinâmicas do agente químico bem como os respetivos efeitos (Prista & Uva, 2006).

Um aspeto fundamental em estudos / programas de monitorização biológica são as questões éticas. Estas considerações éticas devem ser sempre levadas em consideração quando é planeado e implementado um programa de biomonitorização em contextos ocupacionais. O objetivo primordial da realização dos programas supracitados é a proteção da saúde dos trabalhadores, e por esse motivo, situações em que os resultados obtidos através dos biomarcadores possam resultar num impacto negativo na qualidade de vida do trabalhador devem ser evitados. Nesse sentido, todas as atividades que envolvam o tratamento, análise, interpretação, comunicação e divulgação dos resultados devem ser cuidadosamente pensadas e planeadas desde o

início do estudo / programa de biomonitorização (Manno *et al.*, 2010; Decker *et al.*, 2013; Ladeira & Viegas, 2016).

2.7. Biomarcadores

Um biomarcador pode ser qualquer substância, estrutura ou processo que possa ser medido numa determinada amostra ou sistema biológico e que provoque algum tipo de alteração em componentes bioquímicos ou celulares, processos, estruturas ou funções (NRC, 1987; Alimonti & Mattei, 2008; Ladeira & Viegas, 2016). Quando ocorre uma situação de stress, seja em ambientes ocupacionais e não-ocupacionais, os biomarcadores permitem determinar as mudanças bioquímicas, genéticas, morfológicas ou fisiológicas que ocorrem no organismo (Alimonti & Mattei, 2008). Nesse sentido, os biomarcadores podem ser considerados uma ferramenta importante para medir o impacto de uma exposição e, conseqüentemente, apoiar a tomada de decisões nas mais diversas questões no âmbito da saúde ou do ambiente.

Os biomarcadores podem trazer um contributo bastante positivo em estudos epidemiológicos e toxicológicos, bem como em avaliações do risco. O uso de biomarcadores, particularmente, em avaliações do risco pode contribuir para a determinação das relações dose-tempo-resposta, avaliação da dose biológica efetiva, identificação de subpopulações em risco, entre outras ações (Schulte & Mazzuckelli, 1991; Ladeira & Viegas, 2016).

Os biomarcadores são tradicionalmente divididos em três classes distintas: (1) biomarcadores de exposição; (2) biomarcadores de efeito; (3) biomarcadores suscetibilidade (Silins & Högberg, 2011).

Os biomarcadores de exposição envolvem a medição de uma substância em si inalterada, do seu metabolito, ou de um produto da interação entre um xenobiótico e uma molécula ou célula alvo num determinado compartimento orgânico, e reflete a dose, que é efetivamente absorvida pelo organismo, isto é, a dose interna (Prista & Uva, 2006; Silins & Högberg, 2011).

Por sua vez os biomarcadores de efeitos são definidos como alterações bioquímicas, fisiológicas, comportamentais, ou de outra natureza, quantificável a nível celular que, dependendo da magnitude, pode ser reconhecida como associado a uma alteração patológica (Prista & Uva, 2006; Silins & Högberg, 2011). Ou seja, traduz a consequência para o individuo da exposição a um determinado composto e são muitas vezes utilizados para definir exposições (Ladeira & Viegas, 2016).

Por último, um indicador de uma capacidade inata ou adquirida de um determinado organismo para responder aos efeitos da exposição a uma substância xenobiótica é

designado de biomarcador de suscetibilidade (Prista & Uva, 2006). Pode-se entender, portanto, que se trata de uma informação sobre como é que um organismo, perante a exposição a uma determinada dose absorvida de um determinado composto, responderá (Prista & Uva, 2006).

Um aspeto fundamental e sobre o qual é importante realçar é que em condições semelhantes de exposição os efeitos demonstrados variam de indivíduo para indivíduo (Prista & Uva, 2006).

A medição de biomarcadores pode ser realizada através de amostras de ar exalado, sangue, urina e em alguns tecidos (Silins & Högberg, 2011). Os biomarcadores têm de apresentar características que consigam ser avaliadas e medidas, e ao mesmo tempo indicadoras de processos biológicos normais ou patogénicos e/ou de exposições ocupacionais ou ambientais. As principais características que um biomarcador ideal deve ter são, nomeadamente, a alta especificidade para um determinado efeito ou substância química, ser suscetível de determinar, refletir o efeito desde o início, o facto de poder ser analisado por uma técnica não invasiva e ter alta sensibilidade na matriz ou fluido biológico escolhido. Sendo que é fundamental que haja uma relação bem estabelecida e documentada entre a concentração do biomarcador e a exposição do agente, a lesão induzida e a suscetibilidade (Valente, 2017).

Atualmente existem uma variedade de estudos e investigações em que a principal preocupação é a procura de biomarcadores que permitam incrementar a capacidade de identificar riscos a longo prazo associados à exposição a uma ou várias substâncias químicas, principalmente, o risco de desenvolver doenças oncológicas. Os avanços em diversas áreas, particularmente, na epidemiologia molecular, vão permitir no futuro o desenvolvimento de biomarcadores a longo prazo. Consequentemente, permitirá que a tomada de decisões, por exemplo no âmbito das avaliações de risco, seja mais precisa e caracterizadora da realidade (Waterfield & Timbrell, 1999; Ladeira & Viegas, 2016).

2.7.1. Biomarcadores de exposição

Entende-se por biomarcador de exposição uma substância exógena ou o seu metabolito, ou o produto da interação entre um xenobiótico e uma molécula-alvo ou célula, que é medido numa matriz biológica (WHO & IPCS, 1993; Prista & Uva, 2006; Suspiro & Prista, 2011). Um indicador biológico de exposição pode também ser definido por dose interna, uma vez que representa a quantidade ou concentração de um determinado composto que efetivamente penetrou no organismo e foi efetivamente absorvida (Prista & Uva, 2006).

A absorção é caracterizada por ser um processo no qual uma determinada substância consegue alcançar tecidos internos do corpo através da penetração de barreiras epiteliais e entrar na circulação, isto é, no sangue (Gupta, 2014).

Quando este é absorvido pelo sistema sanguíneo os efeitos poderão ser mais acentuados, uma vez que tem a possibilidade de ser distribuído para outros órgãos alvo (Prista & Uva, 2006). Todo este processo, desde a penetração, absorção, distribuição, metabolização, fixação e excreção é determinante para a interpretação de resultados obtidos através destes biomarcadores (Prista & Uva, 2006). Os biomarcadores de exposição refletem a disponibilidade biológica de uma substância / composto no organismo e tem a importante vantagem de permitir medir a quantidade de substância química que é absorvida. Porém, estes biomarcadores podem ser influenciados por diversos parâmetros, nomeadamente, as vias de exposição, características fisiológicas do recetor e as características químicas do xenobiótico (DeCaprio, 1997; DeCaprio, 1999; Ladeira & Viegas, 2016).

Os biomarcadores de exposição em contextos ocupacionais são fundamentais para a avaliação da exposição por todas as vias de exposição e ao mesmo tempo complementar às informações obtidas através da monitorização ambiental nos locais de trabalho (Manno *et al.*, 2010).

2.7.2. Biomarcadores de efeito

Um biomarcador de efeito define-se como uma alteração bioquímica, fisiológica, comportamental, ou de outra natureza, quantificável, que, dependendo da magnitude, pode ser reconhecido como associado a uma possível alteração de saúde ou doença (WHO & IPCS, 1993; Prista & Uva, 2006). Estes biomarcadores traduzem assim o resultado que a exposição a um determinado composto poderá ter num indivíduo, isto é, da interação entre a quantidade de agente químico absorvido e o organismo recetor (Prista & Uva, 2006; Ladeira & Viegas, 2016).

Nesta fase da avaliação, cabe identificar que tipo de efeitos poderão advir da dose que foi absorvida. Estes danos podem ser a nível estrutural ou funcional, a nível celular, molecular ou tissular (Prista & Uva, 2006).

Comparativamente aos biomarcadores de exposição, os biomarcadores de efeito são um indicador do risco mais real uma vez que permitem quantificar as interações que existem e que são determinadas pela dose interna. Contudo, a validação e aplicação destes biomarcadores em programas de prevenção na exposição a agentes químicos em contextos ocupacionais requerem um maior desenvolvimento de estudos (Prista & Uva, 2006).

2.7.2.1. Biomarcadores de genotoxicidade

O cancro é uma doença complexa e uma das principais causas de morte em todo o mundo, particularmente, na UE é estimado que todos os anos morram, aproximadamente, 1,3 milhões de pessoas com cancro (Sivasankari *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2013; Vencovsky *et al.*, 2017). De entre todos os casos de morte por cancro, 2-12% está relacionado com a exposição ocupacional a carcinogénicos (Vencovsky *et al.*, 2017). De acordo com o *European Parliamentary Research Service* (EPRS), aproximadamente, 53% das mortes relacionadas com o contexto laboral na UE estão associadas a uma patologia oncológica (EPRS, 2017).

A grande maioria dos tecidos que apresenta fenómenos neoplásicos mostra uma diversidade de aberrações cromossómicas bastante complexas, nomeadamente a existência de mutações críticas que podem ocorrer num único gene e que aceleram o processo da divisão celular, e consequentemente inibem a morte celular, o que vai provocar alterações no equilíbrio existente entre a proliferação celular e a apoptose (Fenech, 2002; Kang *et al.*, 2013).

A existência de expressão génica alterada, o crescimento celular anormal e a interrupção da função celular normal podem estar relacionados com os efeitos decorrentes da exposição a potenciais agentes cancerígenos em ambientes ocupacionais e/ou ambientais (Kang *et al.*, 2013).

A toxicologia genética é uma especialidade da toxicologia que tem como objetivo a identificação e análise da ação de qualquer agente, seja este, físico ou biológico, que produza efeitos nocivos sobre o material genético (Brusick, 1987). Esta especialidade estuda uma grande variedade de efeitos resultantes do dano ao DNA, e é através da medição qualitativa e quantitativa de biomarcadores genotóxicos em ensaios *in silico*, *in vitro* e *in vivo* que é possível prever o dano genotóxico (Beedanagari *et al.*, 2014),

A avaliação de efeitos decorrentes da exposição pode ser feita através da avaliação de mutações genéticas, lesões ao nível dos cromossomas ou do DNA utilizando biomarcadores genotóxicos (Valente, 2017). O desenvolvimento do cancro requer, geralmente, vários anos, por esse motivo existe interesse em determinar biomarcadores de efeitos genotóxicos que permitam prever o risco de cancro. Atualmente já existem vários exemplos de biomarcadores de lesões no DNA utilizados em células humanas, tais como, quebras nas cadeias de DNA, aberrações cromossómicas, ensaio dos micronúcleos, aneuploidia, encurtamento de telómeros, adutos de DNA, oxidação de DNA, metilação de DNA, entre muitos outros (Vine, 1994; Fenech, 2002).

2.7.3. Biomarcadores de suscetibilidade

O biomarcador de suscetibilidade por sua vez define-se como um indicador de uma capacidade inata ou adquirida de um organismo para responder ao impacto da exposição a uma substância xenobiótica (WHO & IPCS, 1993; Prista & Uva, 2006). Pode-se entender, portanto, que através de um indicador de suscetibilidade obtém-se informação sobre a forma como um organismo, perante a exposição a uma determinada dose absorvida, responderá. Importa realçar que em condições semelhantes de exposição os efeitos demonstrados variam de indivíduo para indivíduo (Prista & Uva, 2006).

Estes biomarcadores, geralmente de origem genética, indicam-nos que a resposta pode ser de maior ou menor intensidade em indivíduos semelhantes, com hábitos semelhantes, inclusões sociais semelhantes, entre outros fatores (Amorim, 2003).

Os biomarcadores de suscetibilidade são indicadores que apresentam uma sensibilidade elevada aos efeitos de uma determinada substância e que podem ser medidos num sistema biológico ou amostra. São geralmente utilizados para identificar indivíduos em risco, em que o risco pode estar associado a exposição ocupacionais ou ambientais, e igualmente associado a questões hereditárias (Kelly & Vineis, 2014)

Um das grandes questões levantadas na utilização destes biomarcadores está relacionado com a ética (Prista & Uva, 2006), face à capacidade de análise sobre a aptidão ou não de determinado indivíduo ser sujeito a uma determinada exposição. Para além disso, a utilização deste tipo de biomarcadores não deve ser tida em conta para a criação de condições de trabalho, uma vez que estas deverão proteger a globalidade dos trabalhadores sem distinção às suas capacidades intrínsecas. São, portanto, indicados para o estudo das relações dose-resposta e para a definição dos limites de exposição individual (Prista & Uva, 2006).

2.8. Métodos de avaliação de genotoxicidade

Os tecidos que apresentam células cancerígenas apresentam uma diversidade de aberrações cromossómicas complexas (Miyamae *et al.*, 1998; Keen-Kim *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2013). A alteração da expressão génica, um crescimento celular anormal ou perturbação da função celular podem estar relacionados com efeitos genotóxicos de agentes carcinogénicos industriais (Sivasankari *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2013).

De forma a avaliar o risco de cancro, é possível determinar a ocorrência de dano genético através de ensaios de genotoxicidade, nomeadamente, o *comet assay*, CBMN ou o ensaio de aberrações cromossómicas (Kang *et al.*, 2013). O estudo do dano no DNA ao nível dos cromossomas é fundamental na toxicologia genética, no sentido em que as

mutações cromossômicas são um fenômeno importante na carcinogênese (Fenech, 2008).

O CBMN é um dos métodos preferenciais que permite a avaliação de danos no DNA. Este ensaio foi desenvolvido, inicialmente, para quantificar os micronúcleos (MN), especificamente, em células que completaram a divisão celular, mas que posteriormente, foram bloqueadas numa fase binucleada antes da citocinese. Porém, este ensaio foi evoluindo permitindo, atualmente, a medição de pontes nucleoplasmáticas (NPB) e protusões nucleares (NBUD) para além dos MN (Fenech, 2006; Fenech *et al.*, 2011).

Quando ocorre a divisão celular o material genético presente no núcleo replica e divide-se equitativamente pelas duas células-filhas. É, principalmente, durante os processos de replicação e divisão celular que podem ocorrer erros, potenciados por agentes genotóxicos. Nesse sentido, o material genético pode ser dividido de forma díspar ou até mesmo ser excluído e não encorpar, de forma correta, o núcleo da célula-filha recém-formada e, conseqüentemente, é formado um pequeno núcleo, designado de micronúcleo (Fenech, 2002). Na anáfase, durante a divisão celular, existem perdas de fragmentos de cromossomas que não são incluídos no núcleo das células-filhas, que posteriormente durante última fase da mitose, a telófase, dão origem aos micronúcleos, que podem ser o resultado direto da quebra da cadeia dupla de DNA (Mateuca *et al.*, 2006; Iarmarcovai *et al.*, 2008). É também durante a anáfase, que os cromossomas e cromátídeos tem diferentes formas de distribuir-se na célula, estes podem, por exemplo, deslocarem-se para o mesmo polo da célula ou para pólos opostos (Thomas *et al.*, 2003). A deslocação de cromossomas e cromátídeos dicêntricos para pólos contrários da célula pode indicar a ocorrência de uma reparação incorreta do DNA, rearranjos cromossômicos, fusão de telómeros e a não reparação do dano no genoma resultante de quebras nas cadeias de DNA (Fenech, 2005; Fenech, 2006).

As NPB podem ocorrer devido a fenômenos de fusão dos telómeros ou à reparação incorreta de quebras de DNA, em que cromossomas e cromátídeos deslocam-se para pólos opostos, e conseqüentemente, o DNA vai formar uma ponte que está envolvida em membrana nuclear (Fenech, 2000; Maluf, 2004; Cheong *et al.*, 2013). Tal como os MN, as NPB também são indicadores de danos no DNA (Cheong *et al.*, 2013). Estas apresentam algumas vantagens, nomeadamente, o facto de serem facilmente observáveis, a sua frequência fornecer uma medida de rearranjo cromossômico, permitirem ajudar na interpretação de dados dos MN e ainda fornecer algumas informações adicionais, por exemplo, sobre o tipo de mutagénico envolvido (Maluf, 2004; Cheong *et al.*, 2013).

Em relação aos NBUD, estes são caracterizados por apresentarem uma morfologia semelhante a um MN, todavia estão ligados ao núcleo através de um pedúnculo constituído por material nucleoplasmático, nomeadamente, fragmentos intersticiais ou terminais sem regiões centroméricas ou teloméricas (Serrano-García & Montero-Montova, 2001; Fenech *et al.*, 2011; Luzhna *et al.*, 2013). Os NBUD podem ser classificados de biomarcadores de eliminação de DNA amplificado e/ou de complexos de reparo de DNA (Ladeira *et al.*, 2011; Cheong *et al.*, 2013). Segundo Dutra *et al.*, (2010), existem alguns estudos que indicam que os NBUD, são precursores de MN e que contém cromossomas específicos, tais como, os cromossomas 1, 4 e 12 frequentemente associados a sarcomas do tecido adiposo.

Outro ensaio importante devido à sua simplicidade, rapidez e sensibilidade e que permite a medição de quebras de DNA, normalmente, em linfócitos em estudos de monitorização biológica é o *comet assay* (Dusinska & Collins, 2008). Este apresenta uma aplicação vasta na toxicologia com o objetivo de avaliar os efeitos genotóxicos de agentes químicos, podendo ser utilizado como ferramenta de biomonitorização em contextos ocupacionais distintos (Campos *et al.*, 2017).

Neste ensaio as células são misturadas em agarose de baixo ponto de fusão, numa lâmina de vidro e, posteriormente, são colocadas numa solução de lise que promove o rompimento das membranas celulares e o acesso ao DNA. Segue-se uma incubação em solução alcalina para tornar a cadeia dupla de DNA em simples e a eletroforese. O DNA move-se em direção ao ânodo, sendo que o DNA intacto permanece sob uma forma esférica de nucleóide (“cabeça do cometa”) e o que possui quebras, forma uma espécie de cauda de cometa, que é visualizado através de microscopia de fluorescência. A percentagem de intensidade do DNA da cauda do cometa é indicativa da frequência de quebras (Dusinska & Collins, 2008) e, conseqüentemente, de dano no genoma. As quebras de DNA podem originar modificações diretas no DNA por agentes químicos ou os seus metabolitos, através de processos como, a replicação e a recombinação. A quebra direta de DNA ocorre quando existe espécies reativas de oxigénio que interagem com o DNA (Møller *et al.*, 2000), traduzindo-se especificamente em dano oxidativo do DNA.

O *Comet assay* permite a deteção de danos primários no DNA e o estudo da cinética de reparação de células (*DNA repair assay*), para além de que existe uma diversidade de modificações do ensaio passíveis de serem aplicadas que facilitam a deteção de quebras na cadeia simples do DNA, lesões álcali-lábeis, quebras na cadeia dupla do DNA e locais de reparação de excisão incompleta (Kopjar & Garaj-Vrhovac, 2001). Este ensaio pode ser igualmente utilizado para a avaliação da fragmentação do DNA decorrente da morte celular ou associada a apoptose (Kopjar & Garaj-Vrhovac, 2001).

Na última década, o *Comet assay* tem sido amplamente utilizado como ferramenta de avaliação de risco em ambientes ocupacionais, nomeadamente, na indústria do plástico, de borracha, do calçado e farmacêutica (Valverde & Rojas, 2009a).

3. Metodologia

3.1. Tipo de Estudo

O presente estudo caracteriza-se por ter um método de estudo quantitativo, na medida em que é caracterizada pela medição de variáveis e pela obtenção de resultados numéricos suscetíveis de ser generalizados a outras populações ou contextos. Este paradigma quantitativo faz apelo a explicações, predições e ao estabelecimento de relações causa-efeito. Dentro deste paradigma, o estudo enquadra-se no tipo descritivo-correlacional, uma vez que, pretende explorar relações entre variáveis e descrevê-las (Fortin, 2006). A pesquisa realizada pode ser classificada de descritiva, no sentido, em que o estudo pretende descrever as características de uma determinada população e ao mesmo tempo explicativa porque pretendeu igualmente a identificação de fatores que determinam ou contribuem para a ocorrência de fenómenos, tendo sido utilizado neste âmbito métodos experimentais (Gil, 2002).

3.2. Caracterização do local de estudo

O projeto foi desenvolvido numa indústria química, produtora de polímeros, situada na região de Lisboa e Vale do Tejo, e inserida num parque industrial de uma zona maioritariamente urbana (figura 3). A indústria em questão é constituída por 127 trabalhadores, dos quais 56 realizam funções numa das 2 fábricas pertencentes ao complexo industrial. As fábricas laboram 24 horas/dia e por esse motivo, os 56 trabalhadores fabris realizam trabalhos por turnos de 8 horas (das 00:00 às 08:00; das 08:00 às 16:00; das 16:00 às 00:00). Os turnos encontram-se distribuídos tendo em conta o volume de produção existente no momento, isto é, as fábricas apresentam regimes de laboração de 5 dias por semana ou 7 dias por semana conforme a necessidade de produção. Os trabalhadores fabris encontram-se distribuídos em Chefe de Turno, Técnico de Produção e Análise, Operador de Reator, Preparador de Cargas e Operador de Enchimento.

A empresa em estudo, como referido anteriormente, é constituída por duas fábricas, uma dedicada a produção de resinas de base solvente (fábrica 1) e outra dedicada a produção de resinas de base aquosa (fábrica 2). Para o presente estudo somente foram realizadas avaliações ambientais e biológicas na fábrica 1, uma vez que, existem mais etapas dos processos de fabrico que envolvem exposição por parte do trabalhador, e onde ocorre igualmente o manuseamento de solventes orgânicos, particularmente, o estireno e o xileno. No ano de 2017, foram consumidas na indústria em questão, aproximadamente, 5000 toneladas e 1300 toneladas de estireno e xileno,

respetivamente. Na fábrica onde foi realizado o estudo, o estireno é utilizado em 4 processos distintos podendo ter duas funções diferentes: monómero ou solvente.



Figura 3 Localização geográfica da indústria em estudo.

No processo de produção 1 e 2, constituídos pelas mesmas etapas de produção, mas utilizados para o fabrico de gamas de produtos distintos, o estireno apresenta a função de monómero, entrando na etapa A (carga de matérias-primas) e etapa B (produção da mistura monomérica), e reagindo quase na sua totalidade na etapa D (polimerização) (figura 4). O estireno pode ficar livre após a polimerização, contudo, em quantidades residuais, sendo considerado um monómero livre residual.

Por sua vez, nos processos 3 e 4, o estireno apresenta a função de solvente de diluição, entrando após a polimerização e permanecendo livre até ao final do processo e no produto acabado. No caso do processo 3, o estireno entra nas etapas A (carga de matérias-primas), B (produção de misturas), D (ajuste), E (filtração), F (enchimento) (figura 5). No caso do processo 4, o estireno entra em todas as etapas que o compõem (figura 5). Tal como o estireno, o xileno é utilizado nos 4 processos referidos anteriormente, porém a sua função é sempre a mesma, a de solvente de diluição. Nos processos 1, 2 e 3 esta substância entra somente na etapa A (carga de matérias-primas) e nas etapas após a polimerização. Em relação ao processo 4, o xileno entra igualmente em todas as etapas.

Dependendo da sua função, os trabalhadores podem estar afetos a várias etapas dos processos descritos anteriormente.

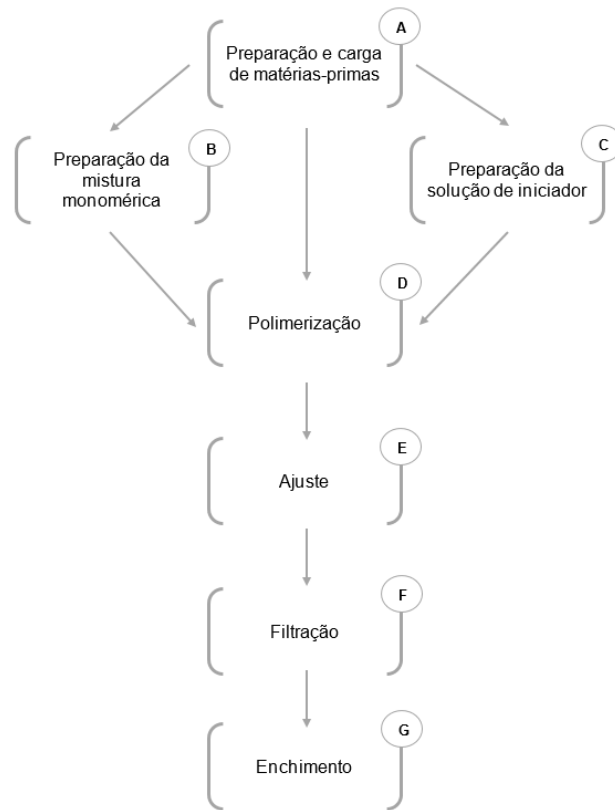


Figura 4 Fluxograma dos processos 1 e 2 da fábrica de resinas de base solvente.

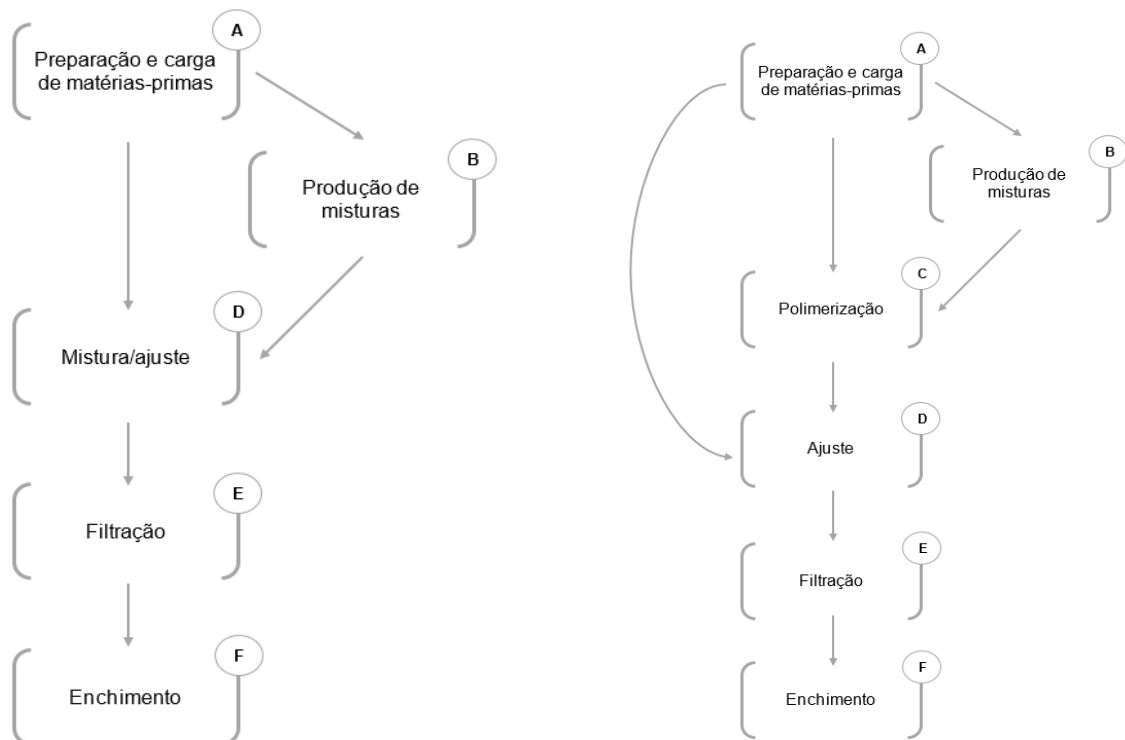


Figura 5 Fluxogramas dos processos 3 e 4 da fábrica de resinas de base solvente, respectivamente.

Na tabela 11, estão indicadas com X as etapas nas quais o trabalhador consoante a sua função pode estar presente. Para este estudo não foi excluída nenhuma função, de forma a compreender o nível de exposição consoante a função desempenhada pelo trabalhador na fábrica.

Tabela 12 Afetação dos trabalhadores às etapas dos processos.

Função	Processos e etapas																		
	Processo 1 e 2							Processo 3					Processo 4						
	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	
Chefe de Turno	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Técnico de Produção e Análise				X	X					X	X					X			
Operador de Reator	X	X	X	X				X		X	X								
Preparador de Cargas	X							X	X			X	X	X	X	X			
Operador de Enchimento							X	X					X	X				X	X

3.3. Variáveis em estudo

As variáveis utilizadas no presente estudo para a verificação de uma possível associação entre a exposição ocupacional a estireno e xileno e biomarcadores de genotóxicos encontram-se sistematizadas na tabela 12.

Tabela 13 Classificação das variáveis em estudo.

Variável	Tipo de medida	Tipo de variável
Idade	Quantitativa	Atributo
Hábitos tabágicos	Qualitativa	Independente
Função desempenhada	Qualitativa	Independente
Anos de exposição	Quantitativa	Independente
Exposição a estireno	Quantitativa	Independente
Exposição a xileno	Quantitativa	Independente
Exposição a COV	Quantitativa	Independente
Micronúcleos	Quantitativa	Dependente
Protusões nucleares	Quantitativa	Dependente

Tabela 12 Classificação das variáveis em estudo.

Variável	Tipo de medida	Tipo de variável
Pontes nucleoplásmicas	Quantitativa	Dependente
Dano no DNA	Quantitativa	Dependente
Dano oxidativo no DNA	Quantitativa	Dependente

3.4. Recolha de dados

3.4.1. Questionário

Os 17 trabalhadores que participaram no estudo preencheram um questionário constituído por questões de diversas tipologias, nomeadamente, sobre o seu historial social, especificamente os hábitos tabágicos e o consumo de álcool. Outras questões foram colocadas relativamente à realização de tratamentos oncológicos, medicação, suplementos alimentares e atividades dos tempos livres que pudessem potenciar a exposição aos agentes químicos em estudo (Apêndice I).

3.4.2. Monitorização ambiental

A quantificação da exposição a estireno e xileno teve por base a aplicação de um método de avaliação ambiental, o NIOSH 1501 de 2003, relativo a Hidrocarbonetos Aromáticos. A respetiva aplicação do método de avaliação ambiental ocorreu no dia 21 de novembro de 2017, durante 2 turnos de trabalho, nos quais ocorreram simultaneamente a produção de polímeros; cujo solvente principal era o estireno ou o xileno. Neste dia foram realizadas amostragens entre as 8h45 e as 23h37. O método utilizado na avaliação ambiental implica recorrer a amostragem ativa através da utilização de amostradores individuais com tubos de carvão ativado colocados próximo do aparelho respiratório dos trabalhadores. Nesse sentido, foram utilizadas as bombas AirCheck 2000 – SKC, bombas Gilian GilAir Plus e bombas Gilian-5000 e os tubos de adsorção *coconut shell charcoal*.

Foram realizadas 5 amostras no primeiro turno (8h-16h) e 7 amostras no segundo turno (16h-00h), posteriormente, as amostras foram sujeitas a um processamento analítico específico, por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama, conforme descrito no método NIOSH 1501 (Anexo 1). Os limites de quantificação do método utilizado são de 18,0 µg para o estireno e 6,0 µg para o xileno. Relativamente à seleção dos indivíduos para a colocação das bombas de amostragem, optou-se por colocar os amostradores pessoais em todos os trabalhadores dos 2 turnos, com o objetivo de avaliar exposição aos compostos em estudo em todas as funções desempenhadas na

fábrica. As bombas de amostragem acompanharam as diversas movimentações que os trabalhadores realizaram durante o período de amostragem de, aproximadamente, 2 horas, e que fazem parte da sua rotina diária na fábrica. O período de amostragem de 2 horas foi o equivalente ao tempo máximo que os tubos de adsorção utilizados têm até ficarem colmatados. Nesse sentido, foram escolhidos períodos de 2 horas em que os trabalhadores pudessem estar a realizar tarefas que envolvessem uma maior exposição e que fosse representativo da exposição ao longo de todo o período de trabalho (8 horas diárias). Os resultados obtidos foram comparados de seguida com os valores-limites estabelecidos para Portugal para a concentração média ponderada e a concentração de curta duração para o estireno e xileno. No mesmo período de amostragem foram igualmente medidos os Compostos Orgânicos Voláteis (COV) através equipamento MultiRAE Lite, com sensor fotocatalítico de 10,6 eV, leitura de 1 a 1000 ppm e resolução de 1 ppm. Este equipamento portátil acompanhou, na maioria do tempo, alguns dos trabalhadores em tarefas de maior exposição.

3.4.3. Monitorização biológica

Para a população em estudo foram recolhidos dois tipos de material biológico: urina e sangue periférico, obtido por venopunctura. A urina para a deteção e quantificação de três metabolitos, MHA, MA e PGA. O sangue periférico foi utilizado para a cultura de linfócitos para mensuração de micronúcleos, pontes nucleoplásmicas e protusões nucleares, assim como, de danos ao nível do DNA e danos oxidativos de DNA.

3.4.3.1. Colheitas de amostras de urina

Foram colhidos 30 mL de urina de cada um dos indivíduos, para frascos de poliestireno estéreis, antes e após o turno de trabalho. As colheitas foram realizadas em 2 turnos no dia 21 de novembro de 2017, nos mesmos turnos onde foi realizada a avaliação ambiental, e 1 turno a 28 de novembro de 2017. De acordo com a Norma Portuguesa de 1796 de 2014, o momento de amostragem adequado para a medição na urina da soma do MA e PGA, e do MHA, respetivamente indicadores biológicos de exposição do estireno e do xileno, é no fim do turno de trabalho, isto é, se possível, assim que cessar a exposição. Vários estudos realizados em contextos industriais referem a colheita de urina após o turno de trabalho para o estireno (Nakayama *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2015) e xileno (Takeuchi *et al.*, 2002; Bahrami *et al.*, 2008; Azari *et al.*, 2012). Suplementarmente, foi realizada uma colheita antes do turno, que de acordo com a Norma Portuguesa mencionada anteriormente, deve ser realizada 16 horas após a cessação da exposição. Pode ser bastante útil realizar e analisar colheitas obtidas antes

do início da jornada de trabalho, uma vez que, permite estabelecer uma linha base para identificar a influência que a atividade tem na exposição a substâncias. A realização de colheitas antes do início do turno pode ser igualmente vantajosa para demonstrar a existência de exposição não-ocupacional (AIHA, 2004). As amostras de urina foram armazenadas no frigorífico a 4°C durante algumas horas até serem transportadas numa mala térmica para um laboratório analítico. De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), amostras de urina armazenadas entre 4°C e -20°C durante uma semana não mostram diferenças significativas nos dados para cada analito de COVs.

3.4.3.2. Colheitas de sangue

Foram colhidos 10 mL de sangue periférico de 17 indivíduos para tubos Falcon de 15 mL com heparina (10U/mL de sangue) como agente anticoagulante. As colheitas de sangue foram realizadas a 21 e 28 de novembro de 2018 a meio do turno de trabalho, e mantidas a 4°C até ao seu transporte, em mala térmica, para o laboratório. Neste foram mantidas à temperatura referida anteriormente até serem processadas no dia seguinte.

3.5. Procedimentos laboratoriais

3.5.1. Determinação de MHA, MA e PGA na urina

A determinação dos metabolitos em estudo na urina foi realizada por um laboratório analítico externo, que utilizou o método *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) para a sua quantificação. De acordo com informação obtida através do laboratório o limite de deteção (LoD) do método é de 0,16 g/L e 0,55 g/L para o MA + PGA e MHA, respetivamente. O método HPLC tem sido amplamente utilizado para determinar alguns metabolitos na urina, nomeadamente, os utilizados no presente estudo (Onchoi *et al.*, 2008).

3.5.2. Ensaio de micronúcleos por bloqueio da citocinese (CBMN)

Os 10 mL de sangue colhidos foram diretamente utilizados para o ensaio CBMN, e posteriormente, para o *comet assay*. Os linfócitos foram isolados utilizando gradiente Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) e colocados, posteriormente, em meio de cultura RPMI 1640 com L-glutamina e fenol vermelho adicionado com 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado, 50 µg/ml de estreptomicina, penicilina 50U/ml e 10 µg / mL de fito-hemaglutinina. De seguida, incubaram-se culturas em duplicado de cada individuo a 37 °C num incubador de CO₂ a 5% humidificado durante 44 horas. A restante parte dos

linfócitos isolados foi criopreservada e armazenada a -80°C até ao momento da realização do *comet assay*, como será referido de seguida.

Após 44 horas de cultivo das células foi adicionada citocalasina-b $6\ \mu\text{g}/\text{mL}$, de forma a inibir a citocinese, ficando as células com aparência binucleada. Após 28h de incubação, as células foram centrifugadas e projetadas em lâminas de microscópio usando uma citocentrífuga (Cyto-Tek® Human 125 Sakura). As lâminas foram coradas com a técnica de May-Grünwald Giemsa, a qual utiliza como corantes as soluções de May-Grünwald, que cora o núcleo de azul e o citoplasma basófilo de rosa; e Giemsa que aumenta a coloração nuclear e a capacidade de demonstrar seletivamente determinadas estruturas celulares. A visualização foi feita com um microscópio Leica DM500 com óleo de imersão e amplificação de 1000x por um único observador, sendo que para cada caso foram visualizadas 1000 células, de acordo com os critérios de Fenech *et al.* (2003).

3.4.3 Comet Assay

Para a análise dos danos no DNA e danos oxidativos, foi realizada uma alteração no procedimento do *comet assay*, originalmente descrito por Singh *et al.*, (1988), e a adição de um tratamento enzimático com o intuito de avaliar a oxidação do DNA nas células, ambas como descritas em Collins *et al.* (2012). Como referido, cerca de 1,5 mL da suspensão de linfócitos foi criopreservada numa solução constituída por 90% em volume de FBS e 10% em volume de dimetilsulfóxido (DMSO), e armazenados a -80°C em poliestireno para posterior análise do *comet assay*. Desta forma, aquando da análise, as células foram descongeladas a 37°C e centrifugadas para remoção da solução criopreservante. Foram diluídos 30 μL de suspensão celular em 140 μL de agarose 1% de baixo ponto de fusão, 70 μL dessa mistura foram transferidos para uma lâmina com agarose 1%, padrão a totalizando 2 *spots* por lâmina, posteriormente, foram colocadas lamelas em cada para fixar os géis. Seguidamente, as lâminas foram colocadas numa solução de lise (NaCl 2,5 M, Na_2EDTA 0,1 M, Tris 10 mM e Triton X-100 a 1%, pH 10), durante 1 hora a 4°C . Para deteção de dano oxidativo, as lâminas foram incubadas com a formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG) por 30 minutos a 37°C . Após este tratamento, e várias lavagens, as lâminas foram submersas numa solução de eletroforese (NaOH 10 M e EDTA 0,5 M) durante 40 minutos a 4°C e, subsequentemente a eletroforese foi conduzida na mesma solução sob 20 V durante 20 minutos a 4°C . Após a lavagem e secagem ao ar os géis foram corados com DAPI. A quantificação de 100 cometas por lâmina foi realizada através do *software* Comet Assay IV Perceptive Instruments®. A visualização das lâminas foi realizada por um único observador.

3.6. Procedimentos estatísticos

Os dados ambientais e biológicos obtidos foram analisados no *software* estatístico SPSS, versão 22.0 para *Windows*. Os resultados foram considerados significativos ao nível de significância de 5%. Com o objetivo de testar a normalidade dos dados, utilizou-se o teste Shapiro-Wilk. Para a caracterização das amostras das amostras utilizou-se a análise de frequências (n, %) para dados qualitativos e cálculo da média e desvio padrão para os dados quantitativos. Relativamente à comparação dos dados ambientais e de biomarcadores entre expostos e não expostos a estireno e xileno e entre fumadores e não fumadores, utilizou-se o teste Mann-Whitney, uma vez que o pressuposto de normalidade não se verificou.

Para estudar a relação entre a idade, os anos de exposição, dados ambientais e de biomarcadores utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman, uma vez que o pressuposto de normalidade não se verificou.

3.7. Considerações ético-legais

Questões ético-legais constituem uma componente fundamental da pesquisa moderna, relacionada não apenas com o assunto em estudo, mas também com o investigador (Yip *et al.*, 2016). Os investigadores têm o dever de proteger a vida, a saúde, a dignidade, a integridade, o direito à autodeterminação, a privacidade e a confidencialidade das informações pessoais dos indivíduos que decidam participar no estudo (WMA, 2013). O Relatório de Belmont também refere 3 princípios éticos primordiais: (1) respeito pelas pessoas, isto é, a exigência de reconhecer a autonomia e proteger aqueles que apresentam uma autonomia reduzida; (2) beneficência, ou seja, acima de tudo não causar danos, maximizar os potenciais benefícios e minimizar os possíveis danos; (3) justiça a nível individual e social (Yip *et al.*, 2016). Nesse sentido, no presente estudo foram realizadas ações de esclarecimento para informar os participantes acerca do estudo e dos seus objetivos, e seguidamente, foi distribuído um formulário para a obtenção de um consentimento informado por todos os participantes, que informa do objetivo da investigação, bem como da garantia de anonimato e confidencialidade dos dados. Foram ainda tidos em consideração os direitos da autonomia, ou seja, todos os participantes aderem de forma voluntária ao estudo e o direito à privacidade, preservada através confidencialidade do tratamento dos dados obtidos nos questionários. Foi igualmente previsto assegurar os pressupostos previstos no Regulamento (UE) 2016/679 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de abril de 2016, relativo à proteção das pessoas singulares no que diz respeito ao tratamento

de dados pessoais e à livre circulação desses dados, que é aplicável desde 25 de maio de 2018. De acordo com a regulamentação supracitada, foi garantido o anonimato das amostras de urina e sangue mediante a substituição do nome do trabalhador por um número. Por sua vez, todas as publicações científicas e relatórios que possam advir do presente estudo não incluirão informações suscetíveis de identificar tanto os trabalhadores como a empresa em estudo. É importante ainda salientar que nem o empregador nem terceiros terão acesso aos resultados pessoais dos trabalhadores sem o consentimento expresso do próprio para o efeito.

4. Resultados

4.1. Caracterização das amostras

A amostra foi constituída por 2 grupos: expostos (casos) e não expostos (controles), sendo que o grupo dos não expostos foi utilizado unicamente para a avaliação da genotoxicidade. Aos casos pertencem os trabalhadores expostos ocupacionalmente a estireno e xileno, num total de 17 indivíduos, todos do género masculino. Por sua vez, os controles, correspondem a indivíduos que não estão ocupacionalmente expostos às duas substâncias em estudo, todos do género masculino, tal como nos casos. Na tabela 12, estão caracterizadas de forma sumária os dois grupos que constituem a amostra do presente estudo. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a idade dos expostos e não expostos ($p = 0,003$).

Tabela 14 Caracterização das amostras em estudo (não expostos e expostos).

	Não expostos (Controles)	Expostos (Casos)
Número de indivíduos	12	17
Idade (anos)	37,3 ± 12,7	49,4 ± 8,0
Intervalo de idades (anos)	20,0-61,0	25,0-59,0
Anos de exposição (anos)	Não aplicável	21,9 ± 12,2
Intervalo de anos de exposição (anos)	Não aplicável	0,50-29,0
Funções exercidas		
Chefe de Turno	Não aplicável	4
Técnico de Produção e Análise		3
Operador de Reator		3
Preparador de Cargas		4
Operador de Enchimento		3
Hábitos tabágicos		
Fumadores	1	5
Não fumadores	11	12

4.2. Descrição das funções observadas

Durante o decorrer das avaliações ambientais e biológicas houve um acompanhamento dos trabalhadores com distintas funções nas suas tarefas diárias na fábrica. Na fábrica em questão, e como referido anteriormente, os trabalhadores podem desempenhar funções distintas: (1) Chefe de Turno; (2) Técnico de Produção e Análise; (3) Operador de Reator; (4) Preparador de Cargas; (5) Operador de Enchimento.

O Chefe de Turno tem como função controlar e assegurar, durante o decorrer do seu turno, o cumprimento de todas as tarefas planeadas. Este distribui as diferentes tarefas e recursos disponíveis de forma a garantir o cumprimento do plano de produção. Apoia os outros trabalhadores e tenta solucionar anomalias detetadas no âmbito das suas funções e acompanha todas as etapas de produção remotamente através do *software WinCC*. Este pode ter de desempenhar tarefas em qualquer um dos pontos da fábrica podendo realizar, se necessário, atividades que normalmente estão associadas a outras funções. Tal como demonstrado na tabela 11, este pode estar presente em qualquer uma das etapas do processo de produção. Particularmente, foi observado que ao longo das avaliações realizadas, o Chefe de Turno desempenhou algumas tarefas, nomeadamente, o acompanhamento da produção de produtos através *software* supracitado na sala de controlo, atualização dos documentos relativo aos processos de produção específicos para cada produto produzido no seu turno, troca de filtros na cuba durante o processo de filtração, acompanhamento da descarga de produto acabado dos tanques de armazenagem para cisternas e enchimento de produto acabado para bidons.

No que concerne à função Técnico de Produção e Análise, este desenvolve a grande maioria das suas atividades no laboratório da fábrica onde realiza análises aos produtos acabados durante a etapa de polimerização e ajuste. No laboratório, este faz análises a amostras de produto acabado com o objetivo de verificar se estas cumprem as especificações internas, nomeadamente, ao nível da viscosidade e do teor de resíduos sólidos. Este pode ainda ter de retirar amostras nos reatores durante a polimerização e na cuba durante o ajuste aquando a realização de produtos nos processos 1, 2 e 3. Pode igualmente retirar amostra de produto do *dispermix* durante a etapa de mistura/ajuste, neste caso, somente no processo 4. O *dispermix* consiste num recipiente onde é realizada a mistura, dispersão e homogeneização de produtos químicos. Ambas as tarefas, de análise de produto acabado e de recolha de amostra, foram observadas no presente estudo.

Relativamente aos Operadores de Reator, estes desenvolvem as suas tarefas maioritariamente na sala de controlo, quando é necessário o acompanhamento do

processo por *WinCC* e quando ocorre a adição de matéria-prima por tubagem, e na zona de reatores, quando existe adição manual de matérias-primas no estado líquido e sólido no tanque de mistura monomérica, no tanque de iniciador e no reator. Este pode ainda realizar a adição manual de pequenas quantidades de matéria-prima na cuba e recolher amostras para o Técnico de Produção e Análise analisar. A introdução de estireno e xileno nos reatores é feito por tubagem, num processo fechado, não havendo contacto com estas substâncias. Foi acompanhada a adição manual de matéria-prima na cuba.

O Preparador de Cargas, como o próprio nome indica, prepara as cargas para posterior adição no reator, cuba ou *dispemix*. As suas tarefas consistem na recolha da matéria-prima no armazém e, no caso de quantidades pequenas, a sua pesagem. Se for necessário pode ainda ter de realizar algumas misturas ou diluições. Foi observada a realização de uma mistura com estireno e xileno na sua composição.

Por fim, o Operador de Enchimento realiza maioritariamente as suas tarefas nas etapas de filtração, onde faz a troca de filtros colmatados, e de enchimento, onde prepara as embalagens para receberem o produto, adicionando os rótulos e limpando-as com um pano húmido, e efetuado o enchimento do produto acabado. Ambas as tarefas foram observadas.

É importante salientar que cada trabalhador tem a sua função, e maioria das vezes, realiza as atividades inerentes a essa função. Todavia, foi observado que estes podem exercer outra função, para a qual tenham competência, devido aos mais variados motivos, tais como, ausência de um colega e/ou excesso de trabalho num período específico.

4.3. Monitorização ambiental

4.3.1. Estireno e xileno

Relativamente aos resultados obtidos através da amostragem pessoal, estão representados graficamente os valores obtidos para cada um dos trabalhadores no que concerne aos valores de média ponderada (8h) de estireno e xileno e o seu efeito aditivo (figura 6). Quando dois ou mais agentes químicos apresentam um efeito toxicológico semelhante sobre o mesmo órgão-alvo ou sistema e estão presentes, em simultâneo, no ar dos locais de trabalho devem ser considerados os seus efeitos conjuntos. Nesse sentido, aplicou-se a fórmula para mistura de agentes (efeito aditivo) referida na Norma Portuguesa 1796 de 2014 (equação 2). Outras entidades internacionais e estudos científicos recomendam a aplicação do *Hazard Index* (HI), que é bastante semelhante, à definida pela Norma supracitada (EPA, 1986; Mumtaz *et al.*, 1997; ACGIH, 2017;

Sarigiannis & Hansen, 2012). Ambas as fórmulas consistem no rácio entre a exposição e o valor de referência de cada componente da mistura.

$$\frac{C_1}{VLE_1} + \frac{C_2}{VLE_2} + \dots + \frac{C_n}{VLE_n} > 1$$

Equação 2 Equação para mistura de agentes (efeito aditivo) (Fonte: *Norma Portuguesa 1796 de 2014*).

onde:

C_n corresponde à concentração atmosférica encontrada para o agente n

VLE_n corresponde ao valor-limite de exposição correspondente ao agente n

Na tabela 14 foram ainda descritas detalhadamente as funções, as atividades, as medidas de gestão de risco existentes, a duração da amostragem e os resultados obtidos de forma. Observa-se então que as funções que apresentam valores superiores são a de Chefe de Turno, Técnico de Produção e Análise e Operador de Enchimento. Porém, nenhum trabalhador apresentou valores superiores ao do VLE-MP para ambas as substâncias em estudo. O efeito aditivo para cada um dos trabalhadores também foi sempre inferior a 1.

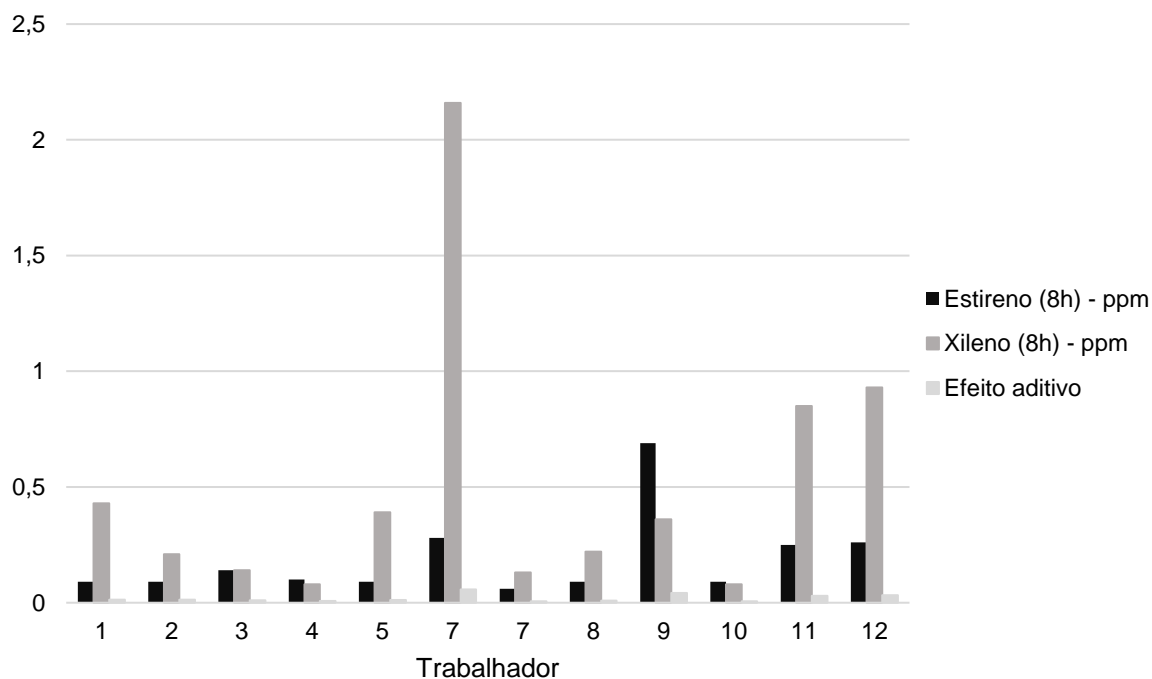


Figura 6 Resultados obtidos para cada trabalhador relativamente aos valores de média ponderada (8h) de estireno e xileno e o seu efeito aditivo.

Tabela 15 Resultados da amostragem pessoal e descrição das funções, atividades, condições operacionais, medidas de gestão de risco.

Função	Trabalhador	Atividade	Número de trabalhadores associados à atividade	Condições operacionais & Medidas de Gestão do Risco	Duração da amostragem (min)	Valor medido (ppm)	Média ponderada (8h) (ppm)	Efeito aditivo (ppm)
Técnico de Produção e Análise	1	Realização de análises laboratoriais a produto acabado.	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação geral por portas e janelas; Luvas quimicamente resistentes.	121	Estireno - 0,36	Estireno - 0,09	0,013
		Retirar amostras durante as etapas de polimerização e ajuste.	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes.		Xileno - 1,7	Xileno - 0,43	
	12	Realização de análises laboratoriais ao produto acabado.	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação geral por portas e janelas; Luvas quimicamente resistentes.	127	Estireno - 1,0	Estireno - 0,26	0,032
		Retirar amostras durante as etapas de polimerização e ajuste.	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes.		Xileno - 3,5	Xileno - 0,93	

Tabela 15 Resultados da amostragem pessoal e descrição das funções, atividades, condições operacionais, medidas de gestão de risco (*Continuação*).

Função	Trabalhador	Atividade	Número de trabalhadores associados à atividade	Condições operacionais & Medidas de Gestão do Risco	Duração da amostragem (min)	Valor medido (ppm)	Média ponderada (8h) (ppm)	Efeito aditivo (ppm)
Operador de reator	2	Lavagem do funil de amostras com xileno quente	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes.	118	Estireno - 0,35 Xileno - 0,84	Estireno - 0,09 Xileno - 0,21	0,013
		Utilização de xileno de lavagens na cuba	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação geral por portas e janelas; Luvas quimicamente resistentes.				
		Adição de matérias-primas à cuba	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes.				
	10	Adição de matérias-primas através da sala de controlo/laboratório da fábrica/zona junto aos reatores	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica;	133	Estireno - 0,31 Xileno - 0,29	Estireno - 0,09 Xileno - 0,08	0,006

Tabela 15 Resultados da amostragem pessoal e descrição das funções, atividades, condições operacionais, medidas de gestão de risco (*Continuação*).

Função	Trabalhador	Atividade	Número de trabalhadores associados à atividade	Condições operacionais & Medidas de Gestão do Risco	Duração da amostragem (min)	Valor medido (ppm)	Média ponderada (8h) (ppm)	Efeito aditivo (ppm)
Operador de enchimento	3	Adição de matérias-primas ao <i>dispermix</i>	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Exaustão localizada; Luvas quimicamente resistentes; Fato de proteção Tyvek.	112	Estireno - 0,60 Xileno - 0,61	Estireno - 0,14 Xileno - 0,14	0,010
		Pesagem de matérias-primas para fazer mistura	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação geral por portas e janelas; Luvas quimicamente resistentes.				
		Troca de filtros da cuba	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes.				
		Mistura	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	15 min. - 1h.; Ventilação geral por portas e janelas; Luvas quimicamente resistentes.				

Tabela 15 Resultados da amostragem pessoal e descrição das funções, atividades, condições operacionais, medidas de gestão de risco (*Continuação*).

Função	Trabalhador	Atividade	Número de trabalhadores associados à atividade	Condições operacionais & Medidas de Gestão do Risco	Duração da amostragem (min)	Valor medido (ppm)	Média ponderada (8h) (ppm)	Efeito aditivo (ppm)
Operador de enchimento	9	Enchimento de bidons com produto acabado (estireno)	3 trabalhadores. 1 ou 2 trabalhador por turno.	15 min. - 1h.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes.	123	Estireno - 2,7 Xileno - 1,4	Estireno - 0,69 Xileno - 0,36	0,042
		Adição de sílica ao <i>dispermix</i> com estireno	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	15 min. - 1h.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes; Fato de proteção Tyvek.				
		Retirar amostra do <i>dispermix</i>	3 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes.				
		Enchimento de bidons com produto acabado (xileno)	3 trabalhadores. 1 ou 2 trabalhador por turno.	15 min. - 1h.; Exaustão localizada; Luvas quimicamente resistentes.				

Tabela 15 Resultados da amostragem pessoal e descrição das funções, atividades, condições operacionais, medidas de gestão de risco (*Continuação*).

Função	Trabalhador	Atividade	Número de trabalhadores associados à atividade	Condições operacionais & Medidas de Gestão do Risco	Duração da amostragem (min)	Valor medido (ppm)	Média ponderada (8h) (ppm)	Efeito aditivo (ppm)
Preparador de Cargas	4	Descarga de produto acabado do reator para a cuba	4 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes.	123	Estireno - 0,38	Estireno - 0,10	0,007
		Troca de filtros	4 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes.		Xileno - 0,31	Xileno - 0,08	
	8	Adição de matérias-primas através da sala de controlo/laboratório da fábrica/zona junto aos reatores	4 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica;	132	Estireno - 0,32 Xileno - 0,80	Estireno - 0,09 Xileno - 0,22	0,009
Chefe de turno	5	Troca de filtros	4 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes.	124	Estireno - 0,34	Estireno - 0,09	0,012
		Adição de matérias-primas através da sala de controlo/laboratório da fábrica/zona junto aos reatores	4 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica;		Xileno - 1,5	Xileno - 0,39	

Tabela 15 Resultados da amostragem pessoal e descrição das funções, atividades, condições operacionais, medidas de gestão de risco (*Continuação*).

Função	Trabalhador	Atividade	Número de trabalhadores associados à atividade	Condições operacionais & Medidas de Gestão do Risco	Duração da amostragem (min)	Valor medido (ppm)	Média ponderada (8h) (ppm)	Efeito aditivo (ppm)
Chefe de turno	7	Acompanhamento do enchimento da cisterna com produto acabado	4 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Exterior.	133	Estireno - 1,0 Xileno - 7,8	Estireno - 0,28 Xileno - 2,16	0,057
		Lavagem das luvas com xileno	4 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	15 min. - 1h. Ventilação geral por portas e janelas; Luvas quimicamente resistentes.				
		Troca de filtros	4 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	15 min. - 1h. Ventilação geral por portas e janelas; Luvas quimicamente resistentes.				
	11	Enchimento de bidons com produto acabado	4 trabalhadores. 1 ou 2 trabalhador por turno.	15 min. - 1h.; Exaustão localizada; Luvas quimicamente resistentes.	64	Estireno - 0,45 Xileno - 1,0	Estireno - 0,06 Xileno - 0,13	0,006
		Acompanhamento dos processos de fabrico na sala de controlo/laboratório da fábrica	4 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica.	119	Estireno - 1,0 Xileno - 3,5	Estireno - 0,25 Xileno - 0,85	0,030
		Troca de filtros	4 trabalhadores. 1 trabalhador por turno.	< 15 min.; Ventilação mecânica; Luvas quimicamente resistentes.				

4.3.2. Compostos Orgânicos Voláteis

Estão representados na figura 7, os resultados obtidos para os COV totais durante os 2 turnos observados. Verifica-se que existem vários picos com valores elevados COV totais. Os principais picos foram descritos e associados à atividade correspondente (tabela 13), sendo possível observar que a atividade com um pico mais elevado foi a descarga do reator para a cuba de produto acabado em que o seu solvente de diluição é o tolueno (ponto E). Outros picos elevados ocorreram durante as tarefas de lavagem do funil de amostras (ponto C) e na descarga de produto acabado do reator para a cuba (ponto A), 321 e 230 ppm, respetivamente, onde a principal substância presente é o xileno. A lavagem do funil de amostras é uma tarefa que envolve a lavagem do funil com xileno quente, e conseqüentemente, a libertação de vapores deste composto durante alguns minutos e a descarga de produto acabado referente ao ponto A, corresponde, a uma resina alquídica em que a principal matéria-prima é o xileno. O pico mais elevado associado à substância estireno foi de 124 ppm, correspondente à tarefa de agitação de poliéster modificado no *dispermix* num local onde a ventilação localizada encontrava-se ligada. Verifica-se também que a maioria dos picos obtidos apresenta valores superiores ao VLE-MP do estireno e do xileno, inclusive alguns deles apresentam valores superiores a 3 vezes o VLE-MP das substâncias supracitadas. Verifica-se, igualmente, através da figura 8, que existem 4 e 3 picos com valores superiores a 3 vezes o VLE-MP do estireno e xileno, respetivamente.

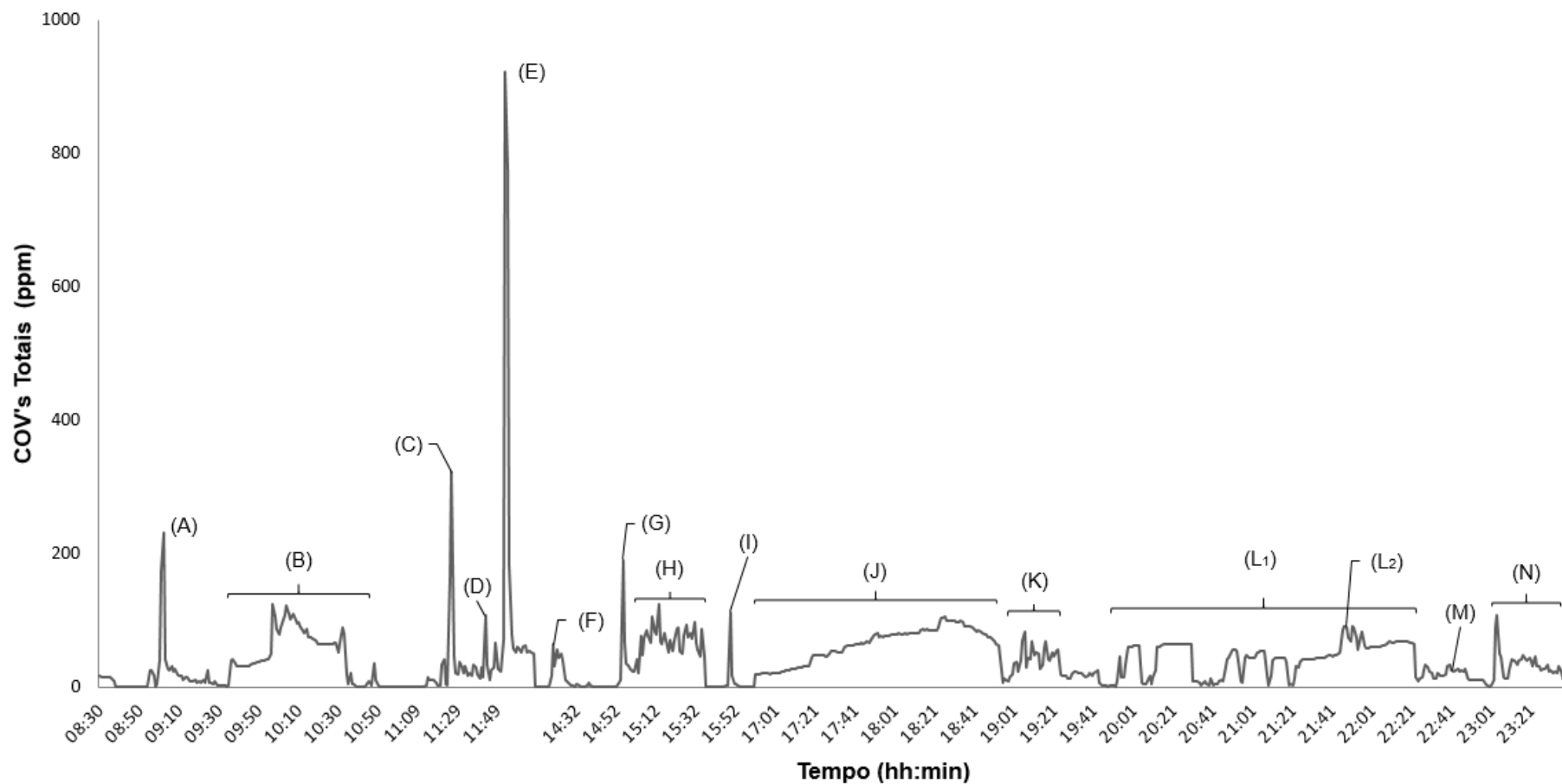


Figura 7 Resultados obtidos para o COV totais ao longo de 2 turnos de trabalho (Etapas do 1º turno: (A)-Descarga do reator para a cuba de produto acabado; (B)-Análises laboratoriais de amostras de produto acabado; (C)-Lavagem do funil de amostra; (D)-Adição de matéria-prima na cuba; (E)-Descarga do reator para a cuba de produto acabado; (F)-Adição de matéria-prima no dispermix; (G)-Abertura da entrada-de-homem da cuba; (H)-Agitação de poliéster modificado no dispermix; (I)-Recolha de amostra de poliéster modificado. Etapas do 2º turno: (J)-Análises laboratoriais de amostras de produto acabado; (K)-Enchimento de bidons com produto acabado; (L₁)-Análises laboratoriais de amostras de produto acabado; (L₂)-Laboratório da fábrica com ventilação geral ligada; (M)-Adição de matéria-prima ao dispermix; (N)-Enchimento das bidons com produto acabado).

Tabela 16 Descrição dos picos obtidos para os COV totais.

Ponto	Atividade	Duração da atividade	Substância	Picos (ppm)	Função
A	Descarga do reator para a cuba de produto acabado.	25 min.	Xileno	230	Preparador de Cargas
B	Análises laboratoriais de amostras de produto acabado.	1h15 min.	--	123	Técnico de Produção e Análise
C	Lavagem do funil de amostras.	2 min.	Xileno	321	Operador de Reator
D	Adição de matéria-prima na cuba.	2 min.	Estireno	107	Operador de Reator
E	Descarga do reator para a cuba de produto acabado.	15 min.	Tolueno	922	Operador de enchimento
F	Adição de matéria-prima no <i>dispermix</i> .	8 min.	Estireno	55	Operador de enchimento
G	Abertura da entrada-de-homem da cuba.	2 min.	Xileno	190	Operador de Reator
H	Agitação de poliéster modificado no <i>dispermix</i> .	30 min.	Estireno	124	Operador de enchimento
I	Recolha de amostra de poliéster modificado.	2 min.	Estireno	112	Técnico de Produção e Análise
J	Análises laboratoriais de amostras de produto acabado.	2h00 min.	--	106	Técnico de Produção e Análise
K	Enchimento de bidons com produto acabado.	30 min.	Estireno	82	Operador de enchimento
L₁	Análises laboratoriais de amostras de produto acabado.	2h20min.	--	67	Técnico de Produção e Análise
L₂	Laboratório da fábrica com ventilação geral ligada.	6 min.	--	89	Técnico de Produção e Análise
M	Adição de matéria-prima ao <i>dispermix</i> .	45 min.	Estireno	24	Operador de enchimento
N	Enchimento das bidons com produto acabado.	1h00 min.	Xileno	107	Operador de enchimento/Chefe de turno

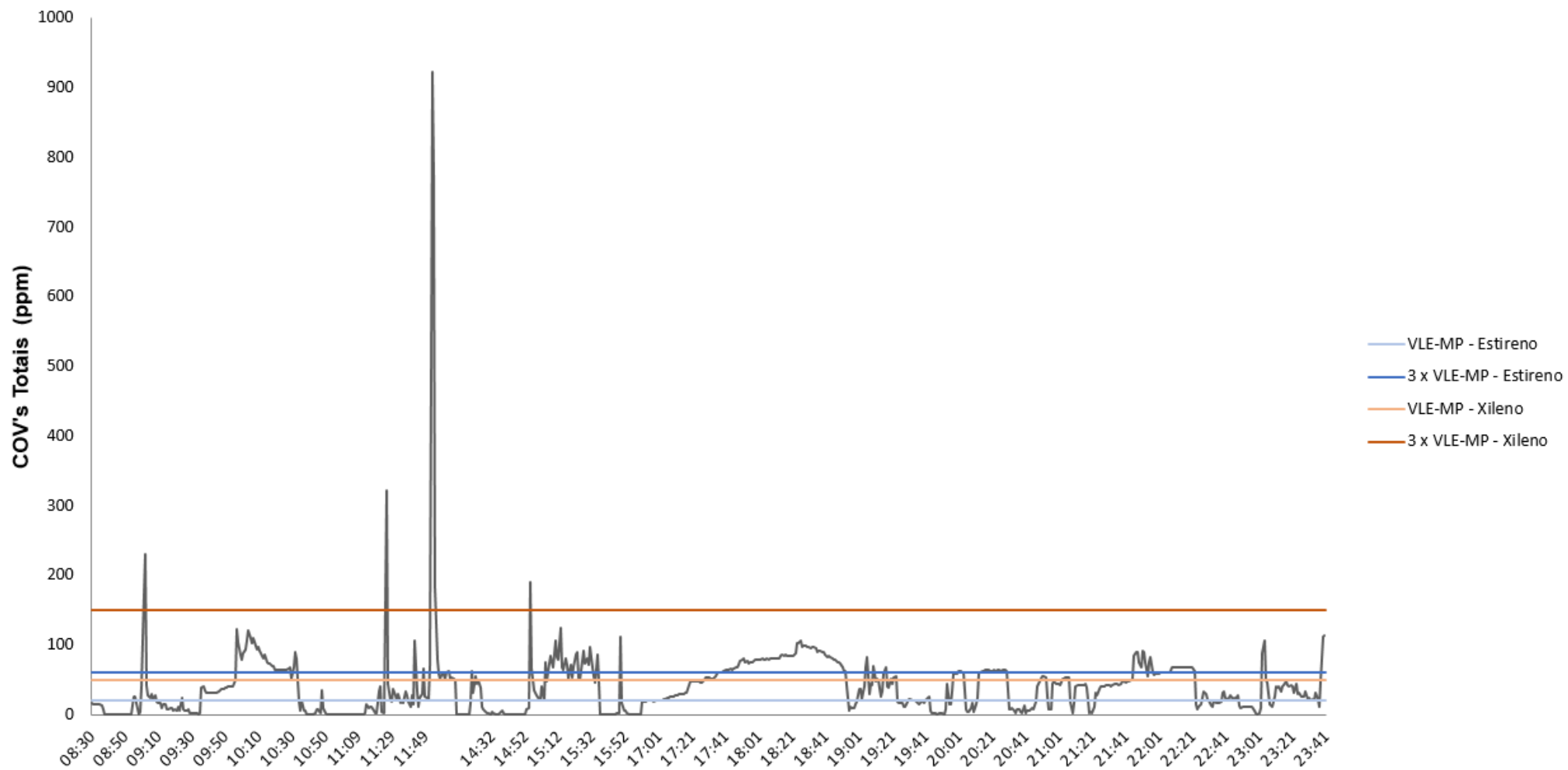


Figura 8 Resultados obtidos para o COV totais ao longo de 2 turnos de trabalho tendo em conta os VLE-MP do estireno e xileno.

4.4. Monitorização biológica

4.4.1. Determinação MHA, MA e PGA na urina

Os resultados obtidos para os metabolitos urinários em estudo foram para todos os trabalhadores abaixo do LoD (MA + PGA = 0,16 g/L; MHA = 0,55 g/L) do método utilizado, inclusive, não existiram quaisquer diferenças entre os resultados das amostras pré-laboral e pós-laboral.

4.4.2. Ensaio de micronúcleos por bloqueio da citocinese (CBMN) e

Comet Assay

De acordo com os resultados obtidos para os biomarcadores de efeito utilizados, representados na tabela 15, verifica-se que relativamente a alterações nucleares, somente as pontes nucleoplásmicas apresentam valores superiores em indivíduos não expostos ($1,33 \pm 1,50$) comparativamente a indivíduos expostos ($0,53 \pm 0,87$). Na mesma tabela é possível observar-se que os resultados obtidos para o dano no DNA revelam valores superiores nos indivíduos expostos ($23,83 \pm 20,84$) comparativamente aos indivíduos não expostos ($7,49 \pm 5,33$), o mesmo acontece para o dano oxidativo (Não expostos: $4,65 \pm 3,08$; Expostos: $23,83 \pm 18,92$).

Tabela 17 Resultados dos biomarcadores de efeito das amostras não expostos (controlos) e expostos (casos).

	Não expostos (controlos)	Expostos (Casos)
Micronúcleos		
Intervalo	0-15	0-18
Média	3,75	6,29
Desvio Padrão	4,39	5,67
Protusões Nucleares		
Intervalo	0-1	0-9
Média	0,08	1,82
Desvio Padrão	0,29	2,16
Pontes Nucleoplásmicas		
Intervalo	0-5	0-3
Média	1,33	0,53
Desvio Padrão	1,50	0,87
Dano no DNA		
Intervalo	2,79-18,49	2,63-65,45
Média	7,49	23,83
Desvio Padrão	5,33	20,84

Tabela 17 Resultados dos biomarcadores de efeito das amostras não expostos (controles) e expostos (casos).

	Não expostos (controles)	Expostos (Casos)
Dano oxidativo		
Intervalo	0,1-9,61	4,45-73,41
Média	4,65	20,26
Desvio Padrão	3,08	18,92

Foram observadas diferenças significativas nas protusões nucleares entre os indivíduos não expostos e expostos (Não expostos: $0,08 \pm 0,29$; Expostos: $1,82 \pm 2,16$; *Mann-Whitney test*, $p < 0,0001$). Foram igualmente observadas diferenças significativas no dano oxidativo entre não expostos e expostos (Não expostos: $4,65 \pm 3,08$; Expostos: $20,26 \pm 18,92$; *Mann-Whitney test*, $p < 0,0001$), como apresentado na tabela 16. Para os restantes biomarcadores de genotoxicidade não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre indivíduos expostos fumadores e não fumadores relativamente aos biomarcadores de genotoxicidade ($p > 0,05$) (tabela 17).

Tabela 18 Resultados dos biomarcadores de efeito entre não expostos e expostos.

			<i>Estatística de teste</i>
Biomarcadores	Exposição	N	p
Micronúcleos em linfócitos	Não expostos	12	0,202
	Expostos	17	
	Total	29	
Protusões Nucleares	Não expostos	12	$\leq 0,0001$
	Expostos	17	
	Total	29	
Pontes Nucleoplásmicas	Não expostos	12	0,078
	Expostos	17	
	Total	29	
Dano no DNA	Não expostos	12	0,184
	Expostos	17	
	Total	29	
Dano oxidativo	Não expostos	12	$\leq 0,0001$
	Expostos	17	
	Total	29	

Não se verificou nenhuma relação entre os anos de empresa e dados ambientais com os biomarcadores utilizados no presente estudo, como é possível observar-se na tabela 18 (*Sperman test*, $p > 0,05$).

Tabela 19 Resultados de correlação entre anos de empresa, média ponderada (8h) de estireno e xileno e os picos de COVs, e os biomarcadores genotóxicos.

		Micronúcleos	Protusões Nucleares	Pontes Nucleoplásmicas	Dano no DNA	Dano oxidativo
Anos de exposição	Coeficiente de correlação	,306	,185	-,073	-,192	,421
	<i>p</i>	,249	,492	,789	,476	,104
	N	16	16	16	16	16
Média ponderada (8h) - xileno	Coeficiente de correlação	,270	-,384	,041	-,164	,000
	<i>p</i>	,423	,243	,905	,630	1,00
	N	11	11	11	11	11
Média ponderada (8h) - estireno	Coeficiente de correlação	-,005	-,598	,176	-,448	,381
	<i>p</i>	,989	,052	,604	,167	,247
	N	11	11	11	11	11
Picos COV	Coeficiente de correlação	-,521	,459	-,160	-,218	-,402
	<i>p</i>	,150	,214	,680	,574	,284
	N	9	9	9	9	9

Relativamente às funções desempenhadas pelos indivíduos expostos, verifica-se que a função de Chefe de Turno é a que apresenta uma média superior de MN ($11,67 \pm 3,93$). Por sua vez, na função de Preparador de Cargas observa-se uma média superior para protusões nucleares ($3,00 \pm 2,04$) e dano no DNA ($32,32 \pm 10,08$). Uma média superior de pontes nucleoplásmicas verifica-se na função de Operador de Enchimento ($1,00 \pm 1,00$) e a maior média de dano oxidativo é observada no Operador de Reator ($39,14 \pm 17,27$) (tabela 19). Não foi realizada inferência estatística que relacionasse a função do trabalhador com a presença de biomarcadores devido ao número reduzido de trabalhadores por função, entre 3 e 4.

Tabela 20 Estatística descritiva relativamente às funções desempenhadas pelos indivíduos expostos.

			Média	Desvio Padrão
Função	Chefe de turno (N=4)	Micronúcleos em linfócitos	11,67	3,93
		Protusões Nucleares	1,33	0,88
		Pontes Nucleoplásmicas	0,67	0,67
		Dano no DNA	17,87	8,14
			Média	Desvio Padrão
		Dano oxidativo	14,47	3,82
	Técnico de produção e análise (N=3)	Micronúcleos em linfócitos	5,00	2,52
		Protusões Nucleares	1,33	0,33
		Pontes Nucleoplásmicas	0,33	0,33
		Dano no DNA	24,17	20,65
		Dano oxidativo	30,94	15,34
	Operador de reator (N=3)	Micronúcleos em linfócitos	1,67	0,88
		Protusões Nucleares	1,00	0,00
		Pontes Nucleoplásmicas	0,33	0,33
		Dano no DNA	7,41	4,51
		Dano oxidativo	39,14	17,27
	Preparador de cargas (N=4)	Micronúcleos em linfócitos	6,75	1,44
		Protusões Nucleares	3,00	2,04
		Pontes Nucleoplásmicas	0,50	0,29
		Dano no DNA	32,32	10,08
Dano oxidativo		12,10	4,18	
Operador de enchimento (N=3)	Micronúcleos em linfócitos	2,33	1,45	
	Protusões Nucleares	1,67	1,20	
	Pontes Nucleoplásmicas	1,00	1,00	
	Dano no DNA	26,85	12,16	
	Dano oxidativo	11,06	3,48	

5. Discussão

O presente estudo pretendeu conhecer a exposição simultânea ao estireno e xileno, bem como os seus potenciais efeitos para a saúde em trabalhadores de uma indústria química dedicada a produção de resinas. Através da utilização de amostragem pessoal, foi possível medir as concentrações de estireno e xileno no ar. Nenhum dos trabalhadores apresentou valores superiores ao VLE-MP recomendado para o estireno (20 ppm) e xileno (50 ppm). Estes resultados também foram obtidos em outros estudos, realizados em diferentes contextos ocupacionais onde ocorre a exposição ao estireno (Vodicka *et al.*, 2004; Wongvijitsu *et al.*, 2011) e do xileno (Jacobson & McLean, 2003; Periago & Prado, 2005; Tunsaringkarn *et al.*, 2012).

Atualmente, as avaliações de risco a substâncias químicas para fins regulamentares geralmente não têm em consideração a exposição simultânea, dependendo essencialmente da avaliação a substâncias individuais. No caso de misturas intencionais, em que a sua composição é conhecida, alguns modelos matemáticos podem ser aplicados para estimar o efeito tóxico combinado, tendo por base, o modo de ação (Kienzler *et al.*, 2014). Um dos principais métodos utilizados que se baseiam numa abordagem de adição da dose/concentração é o HI ou como descrito na Norma Portuguesa, fórmula para mistura de agentes (efeito aditivo). O estireno e o xileno apresentam um efeito tóxico semelhante sobre dois órgãos-alvo, nomeadamente, o SNC e o trato respiratório superior (TRS) (ATSDR, 2007; ATSDR, 2010; Kandyala *et al.*, 2010; ACGIH, 2017), o que permite a aplicação do método supracitado, conforme descrito na NP1796 (2014). Neste caso, não foram obtidos valores superiores a 1, considerando-se, então, que o VLE para a mistura destes dois compostos não foi excedido. O resultado obtido através deste método matemático é considerado uma indicação numérica da proximidade aos limites admissíveis de exposição ou o grau em que esses limites são excedidos para a mistura. Quanto mais próximo de 1 forem os valores obtidos, maior deve ser a preocupação com o risco potencial da exposição à mistura (Mumtaz *et al.*, 1997).

Devido à presença ubíqua na atmosfera e do seu potencial impacto na saúde humana, os COV são considerados um parâmetro fundamental na avaliação da qualidade do ar em ambientes interiores (Ramírez *et al.*, 2012). Estes compostos são amplamente utilizados como constituintes de produtos químicos e podem comprometer a saúde, especialmente de trabalhadores expostos a concentrações mais elevadas. Dentro deste grupo de compostos, o xileno e o tolueno são comumente encontrados em ambientes ocupacionais e não-ocupacionais (Kim *et al.*, 2011). Nesse sentido, foi pertinente determinar a concentração de COV no ar em algumas atividades desenvolvidas pelos

trabalhadores ao longo de 2 turnos de trabalho recorrendo a equipamento de leitura direta. Através da observação direta das atividades foi possível associar os picos obtidos à principal substância presente naquele momento. O maior pico observado (922 ppm), correspondeu à descarga de um produto, com tolueno na sua constituição, do reator para a cuba. Este pico foi muito superior a outros picos medidos, possivelmente, devido ao facto de a tarefa de descarga ocorrer a uma temperatura inicial elevada (110 °C) e o ponto de ebulição do tolueno (110 °C) ser relativamente baixo em relação a outros solventes orgânicos utilizados na fábrica, particularmente, o estireno (145 °C) e o xileno (> 137 °C). Outra razão para a medição de valores elevados de COV durante esta tarefa é a localização onde a mesma ocorre, isto é, num espaço relativamente limitado e sem dispositivos de ventilação, podendo ocorrer acumulação de vapores. Vários picos com níveis elevados foram igualmente associados ao estireno e ao xileno, sendo que os valores máximos medidos para estas substâncias foram de 124 e 321 ppm, respetivamente.

Desde há vários anos que é reconhecido que exposições caracterizadas por ser intensas e de curta duração, comumente designadas de exposições de pico, podem apresentar um risco significativo para os efeitos agudos na saúde humana, que em exposições crónicas de baixa intensidade poderiam não estar presentes (Smith, 2001). Quando um indivíduo está exposto a concentrações elevadas produz doses mais elevadas no corpo e nos órgãos-alvo, o que pode ter potenciais consequências ao nível do metabolismo, alterando-o, sobrecarregando mecanismos associados a processos de proteção e reparação, e incrementando as respostas nos tecidos (Smith, 2001; Preller *et al.*, 2004; Viegas, 2011). Um pico de exposição é capaz de induzir mais ou diferentes efeitos quando comparado com uma dose que é mais baixa, mas por um período de tempo mais longo (Smith, 2001). Nos últimos anos, especulou-se inclusive que elevados níveis de exposição a curto prazo desempenham um papel na etiologia de doenças ocupacionais crónicas tradicionalmente associadas a exposições acumuladas durante longos períodos de tempo (Preller *et al.*, 2004). Nesse sentido, é fundamental que haja uma preocupação relativamente a este tipo de exposição, nomeadamente, no conhecimento das tarefas com maiores concentrações pico para posteriormente serem definidas prioridades para a aplicação de medidas preventivas e de proteção (Viegas, 2011). Deste modo, conseguiu-se um maior impacto/redução na exposição total.

Assim, e considerando os resultados de COV obtidos com o equipamento de leitura direta, aplicou-se novamente a fórmula para mistura de agentes (efeito aditivo) ou HI, desta vez, para os picos que tivessem ocorrido no mesmo turno, para a mesma função e em que a principal substância presente fosse conhecida. Neste caso, foram utilizados na fórmula o VLE-CD de 40 ppm do estireno, de acordo com a referida na Norma

Portuguesa 1796 de 2014, e o VLE-CD de 100 ppm do xileno, de acordo com o referido no DL n.º 24/2012. No primeiro turno (08h00-16h00) 2 funções tiveram expostas a picos com diferentes substâncias: operador de enchimento, que esteve exposto a estireno e tolueno, e o operador de reator, que esteve presente em atividades com níveis elevados de estireno e xileno. Neste caso do operador de enchimento, a aplicação da fórmula para a mistura de agentes também foi possível o tolueno, tal como o estireno e o xileno, afeta o SNC (Greenberg, 1997; Lee *et al.*, 2003) e é biotransformado através do mesmo sistema enzimático, o CYP450 (Jiménez-Garza *et al.*, 2015). O tolueno também apresenta um VLE-CD de 100 ppm de acordo com a Norma Portuguesa 1796 (2014). Para as 2 funções os valores do efeito aditivo foram muito superiores a 1, 13,7 no caso do operador de enchimento e 7,8 para a função de operador de reator. O mesmo verificou-se no segundo turno (16h00-00h00), novamente na função de operador de enchimento, onde o valor do efeito aditivo para a mistura de estireno e xileno foi de, aproximadamente, 3,7. Concluindo-se assim que o VLE para as misturas estireno/tolueno e estireno/xileno é excedido quando consideramos as concentrações de pico das substâncias em causa.

Quando o VLE para a mistura é ultrapassado a preocupação deve ser semelhante à existente quando um determinado agente químico ultrapassa o seu nível admissível, neste caso, o VLE (Mumtaz *et al.*, 1997; Sarigiannis & Hansen, 2012; Kienzler *et al.*, 2014). Nesse sentido, em contextos ocupacionais a existência destes resultados, deve aumentar a preocupação de um potencial efeito sobre a saúde e conseqüentemente pode e deve-se desencadear uma nova avaliação de risco (Mumtaz *et al.*, 1997). Mas é fundamental ter em consideração que a indicação numérica obtida não permite prever os potenciais efeitos na saúde derivados da exposição simultânea a substâncias, todavia, possibilita compreender a força do risco, atribuível a cada substância presente na mistura (Sarigiannis & Hansen, 2012). Esta abordagem apesar de ser bastante simples e amplamente aplicável em misturas com componentes toxicologicamente semelhantes, apresenta algumas desvantagens, nomeadamente, a dificuldade na determinação dos órgãos-alvo para componentes específicos, o facto de não ter em conta interações que possam potenciar ou reduzir as ações de agentes químicos que estejam presentes em simultâneo e não tem em conta as exposições que ocorrem fora do contexto ocupacional e que podem potenciar respostas tóxicas (Dennison *et al.*, 2004; Kienzler *et al.*, 2014). Embora já comecem a existir métodos que avaliem o risco cumulativo da exposição a misturas, muitas vezes, ainda existem limitações na sua aplicação, tais como, a falta de dados para realizar avaliações realistas. Atualmente ainda existem muitas questões pendentes e, portanto, é necessário o desenvolvimento e harmonização de terminologia e metodologias para a avaliação da exposição a

misturas em diferentes setores legislativos (Kienzler *et al.*, 2014; Kienzler *et al.*, 2016) De acordo ainda com a Norma Portuguesa 1796 de 2014, para substâncias cujo valor-limite é expresso por uma média diária ponderada, as flutuações de concentração acima da média não devem exceder 3 vezes o VLE-MP em mais de 30 minutos, por dia de trabalho. Esta situação não foi verificada no presente estudo, uma vez que, os picos associados ao estireno, durante o primeiro turno corresponderam a 3 pontos (D, H e I) que excederam 3 vezes o VLE-MP do estireno (60 ppm) durante, aproximadamente, 22 minutos. Por outro lado, no segundo turno, 1 ponto (K) excedeu 3 vezes o VLE-MP durante cerca de 4 minutos. Contudo, é importante garantir medidas de prevenção e proteção para que as atividades não excedam o referido na Norma, já que, o primeiro turno esteve próximo de atingir os 30 minutos, num dia de trabalho. Por sua vez relativamente aos picos associados ao xileno, existem 3 pontos (A, C e G) que excederam 3 vezes o VLE-MP do xileno (150 ppm) todos no decorrer o primeiro turno durante, aproximadamente, 6 minutos, o que também não ultrapassa o limite de 150 ppm. Importa ainda referir que um momento único de amostragem pode não conseguir estimar todos os picos de exposição que podem ocorrer durante a atividade, ou mesmo caracterizar a exposição que ocorre num determinado contexto ocupacional onde as condições ambientais podem mudar ou, onde diferentes trabalhadores adotam diferentes modos operatórios que implicam exposição (Symanski & Rappaport, 1994; Ryan *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Rosén *et al.*, 2005).

No que concerne a avaliação biológica na urina os valores obtidos para os metabolitos MA, PGA e MHA foram abaixo do limite de deteção, o que pode estar associado a diferentes motivos. Primeiramente, o método utilizado para a quantificação dos metabolitos pode não ter sido o mais adequado por não ser sensível o suficiente. Estudos anteriores obtiveram LoD inferiores utilizando o mesmo recurso analítico (Prieto *et al.*, 2002; Šperlingová *et al.*, 2003; Laffon *et al.*, 2011a; Yamamoto *et al.*, 2016;). Szúcs *et al.*, (2002), utilizando o método de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC/MS), revelou LoD de 0,0010 g/L para o MA, 0,0020 g/L para o PGA e 0,0020 g/L, 0,01 g/L e 0,02 g/L para o *o*-MHA, *m*-MHA e *p*-MHA. Para além deste estudo, outros estudos utilizaram métodos para a quantificação destes metabolitos com maior sensibilidade, tais como, Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa de *tandem* (LC-MS/MS) e Cromatografia Líquida de ultra eficiência acoplada Espectrometria de Massa de *tandem* (UPLC-MS/MS) (Manini *et al.*, 2002; Gagné, 2013). Assim, dado que as concentrações de estireno e xileno, medidas através dos amostradores pessoais, foram relativamente baixas seria expectável a obtenção de valores também baixos dos metabolitos na urina, que poderiam ter sido quantificados através de métodos analíticos com LoD mais baixos.

Outra possível justificação para a ausência de metabolitos na urina é pelo facto destes trabalhadores estarem expostos simultaneamente a uma diversidade de solventes orgânicos que podem interagir entre si e alterar a sua toxicocinética e, em concreto o momento em que ocorre a excreção. No caso particular da empresa em estudo são utilizados diversos solventes, nomeadamente, o estireno, o xileno, o tolueno e outros hidrocarbonetos. O CYP450 é o principal grupo de enzimas envolvidas em diversas reações funcionais, constituindo uma interface enzimática entre humanos e uma ampla variedade de produtos químicos. Vários produtos químicos, particularmente, os determinados no presente estudo, são metabolizados por este sistema enzimático (Nakajima, 1997). Segundo Haddad *et al.*, (2000), a cinética do estireno, xileno, tolueno e outros COV pode sofrer modificações durante a exposição simultânea com outros agentes químicos, nomeadamente, no aumento destes compostos inalterados no sangue. Assim, pode-se concluir que quando existe uma substância que compete com outra pela mesma via metabólica deve-se verificar se estas são indutoras ou inibidoras enzimáticas, uma vez que se uma das substâncias for inibidora é esperado que a outra substância aumente no sangue e que haja retenção, e conseqüentemente, que o período de tempo até à excreção dos seus metabolitos aumente (Viau, 2002).

No caso do estireno existem ainda estudos que recomendam colheitas de urina adicionais no início do turno seguinte devido à elevada solubilidade do estireno nos tecidos gordos, podendo o tempo de semi-vida nesse local chegar às 46h (Rodrigues *et al.*, 2018). Existem ainda alguns estudos que referem as potenciais conseqüências de polimorfismos nos níveis de metabolitos na urina de indivíduos ocupacionalmente expostos a estireno (Teixeira *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005). Teixeira *et al.*, (2004), refere que os polimorfismos GSTM1 podem modular a via metabólica do estireno em concentrações baixas de exposição. O GSTM1 é um gene que pertence ao sistema enzimático da glutathione S-transferase (GST), que desempenha um papel imprescindível da biotransformação de várias substâncias xenobióticas e endógenas (Hatagima *et al.*, 2000)

Contrariamente ao sucedido com os biomarcadores de exposição, os biomarcadores de efeito, especificamente, biomarcadores genotóxicos utilizados no presente estudo revelaram valores médios superiores de MN, NBUD, danos no DNA e dano oxidativo no DNA nos trabalhadores. Estudos realizados em trabalhadores expostos a estireno evidenciaram, tal como no presente estudo, um aumento de MN nestes indivíduos quando comparados com indivíduos não expostos (Laffon *et al.*, 2002; Laffon *et al.*, 2006; Migliori *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2010). Estudos também desenvolvidos em diferentes contextos ocupacionais onde a exposição ao xileno é uma realidade corroboram os resultados obtidos neste estudo, revelando um aumento de MN (Diaz *et*

al., 1990; Lamasters *et al.*, 1997; Pitarque *et al.*, 2002; Roma-Torres *et al.*, 2006). Os MN surgem de fragmentos de cromossomas ou de cromossomas inteiros que não são incluídos nos núcleos-filhos durante a divisão celular (Fenech, 2000; Fenech, 2007; Bonassi *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2011). Os acontecimentos referidos anteriormente podem ser induzidos por diversos fatores, nomeadamente, stress oxidativo ou exposição a substâncias clastogénicas ou aneugénicas (Fenech, 2007; Bonassi *et al.*, 2007; Pardini *et al.*, 2017). O potencial genotóxico dos agentes químicos pode estar associado à sua capacidade para induzir alterações cromossómicas estruturais (clastogénicas) e numéricas (aneugénicas) (Parry *et al.*, 2002). Alguns estudos de exposição ocupacional sugerem que o estireno, através da sua metabolização para SO, pode ser clastogénico para humanos (Nestmann *et al.*, 2005; Vodicka *et al.*, 2006). Adicionalmente, Laffon *et al.*, (2001b), evidenciou que a atividade genotóxica do SO é preferencialmente clastogénica. No que concerne ao xileno, este não apresentou propriedades clastogénicas em estudos realizados em ratos (Bloemen & Burn, 1993). Foram igualmente observados valores médios superiores de NBUD nos indivíduos expostos, verificando-se diferenças estaticamente significativas entre indivíduos expostos e não expostos. Estes resultados sugerem a existência de danos cromossómicos e/ou instabilidade no DNA no grupo exposto (Cassini *et al.*, 2011; Fenech *et al.*, 2011). Outros estudos realizados em ambientes ocupacionais revelaram o aumento de NBUD em indivíduos expostos a Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP) e, solventes e metais (Duan *et al.*, 2009; Cassini *et al.*, 2011).

Relativamente aos dados obtidos através do *comet assay*, evidenciou-se que os trabalhadores apresentaram valores médios superiores de dano no DNA comparativamente com os controlos. O presente estudo corrobora, assim, alguns estudos ocupacionais que apresentaram igualmente um aumento de danos ao nível do DNA em trabalhadores expostos ao estireno (Somorovská *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2010; Wongvijitsuk *et al.*, 2011) e ao xileno (Roma-Torres *et al.*, 2006; Rekhadevi *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Aquino *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2016). O *comet assay*, como biomarcador, reflete a exposição atual e o nível de dano no DNA presente no sangue no momento da colheita de sangue (Kopjar *et al.*, 2006). Porém, é necessário ter em consideração que existem uma diversidade de fatores que podem influenciar o dano no DNA medido através do ensaio supracitado (Møller *et al.*, 2000; Londoño-Velasco *et al.*, 2016). No presente não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre indivíduos expostos fumadores e não fumadores. A indução de danos no DNA devido aos hábitos tabágicos têm sido um assunto controverso, onde diferentes estudos têm apresentado resultados distintos (Hoffmann *et al.*, 2005). Um dos motivos referidos para a ausência de efeitos associados ao consumo de tabaco é poder estatístico dos

estudos. Um baixo poder estatístico pode ser a razão para alguns estudos não demonstrarem indução de dano no DNA devido ao tabaco (Møller *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2005). Nesse sentido, e uma vez que, a amostra do presente estudo era relativamente pequena (Fumadores = 5; Não fumadores = 12), pode ter sido esse motivo para não serem encontradas diferenças significativas entre o grupo de fumadores e o grupo de não fumadores.

Segundo Nagarathna *et al.*, (2013) a extensão de um dano ao nível do DNA não é uniforme em todas as populações porque cada indivíduo apresenta diferentes capacidades para a ativação e desintoxicação de substâncias químicas, o que leva, por exemplo, à variabilidade na incidência de cancro entre os indivíduos. Carpenter *et al.*, (2002) referiu também que a suscetibilidade individual a efeitos tóxicos e carcinogénicos seja afetada significativamente pela genética. A presença de polimorfismos genéticos envolvidos no metabolismo de substâncias químicas pode ser uma das razões para a diferença que os indivíduos têm para desintoxicar determinados compostos (Nagarathna *et al.*, 2013). Existem alguns estudos científicos realizados com um intuito de perceber o efeito de polimorfismos genéticos em trabalhadores expostos a estireno (Godderis *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2011). De acordo com Godderis *et al.*, (2004), a existência de polimorfismos nas enzimas de biotransformação da glutatona e nas enzimas de reparação podem explicar as diferenças entre indivíduos na resposta genotóxica decorrente da exposição ao estireno. Ao *comet assay* realizado no presente estudo foi adicionado uma etapa suplementar, com o objetivo de tornar o ensaio mais específico e sensível, que permitisse a avaliação do dano oxidativo através da utilização da proteína FPG. Esta deteta o principal produto decorrente da oxidação de purinas, 8-oxoguanina, bem como outras purinas alteradas (Speit *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2009). O valor médio obtido ao nível do dano oxidativo foi muito superior em indivíduos expostos comparativamente com os indivíduos não expostos. Alguns estudos reportaram igualmente a existência de um aumento do dano oxidativo em células sanguíneas em trabalhadores expostos a estireno (Marczynski *et al.*, 1997; Cavallo *et al.*, *in press*), BTX (Liu *et al.*, 1996), HAP (Cavallo *et al.*, 2006) e sílica (Schins *et al.*, 1995). É certo que todas as células vivas são expostas de forma continuada a radicais livres que podem ser potencialmente prejudiciais, inclusive, níveis baixos de stress oxidativo podem refletir um metabolismo normal. A origem destes radicais pode ser intracelular, isto é, surgem através do metabolismo celular normal, ou extracelular, por exemplo, produzidos como consequência da exposição a agentes químicos e/ou agentes físicos (radiação ultravioleta) (Labrèche & Goldberg, 1997; Evans *et al.*, 2004; Pilger & Rüdiger, 2006; Silins & Högberg, 2011; Malaguarnera *et al.*, 2012) As espécies reativas de oxigénio (ROS), que são usualmente geradas como

consequência de um metabolismo anaeróbio, podem reagir, de uma forma destrutiva, com o DNA (Halliwell & Gutteridge, 1998; Banmeyer *et al.*, 2004). Acredita-se inclusive que o dano no DNA induzido pela presença de ROS pode contribuir para a carcinogénese, o envelhecimento e a neurodegeneração (Pilger & Rüdiger, 2006; Maynard *et al.*, 2009). O dano oxidativo associado ao DNA pode levar a mutações que ativam os processos de oncogénese ou, pelo contrário, inativam genes supressores de tumores (Maynard *et al.*, 2009). Pelo que é necessário ter em atenção trabalhadores que apresentem elevados níveis de dano oxidativo e compreender se a exposição, durante a realização de uma determinada tarefa pode potenciar o aparecimento destes danos.

No que concerne aos biomarcadores de efeito tentou-se ainda compreender se os anos de empresa e a exposição ambiental ao xileno, estireno e COV totais (picos) poderiam estar correlacionados positivamente ou negativamente com cada um destes biomarcadores. Contudo, não foi encontrada correlação entre as variáveis. Um estudo de Laffon *et al.*, (2002), realizado a trabalhadores expostos a níveis baixos de estireno, apresentou resultados contraditórios ao deste estudo, referindo que o tempo de exposição está correlacionado positivamente com os MN e o dano no DNA. De acordo com Roma-Torres *et al.*, (2006), que realizou um estudo de avaliação da genotoxicidade num grupo de trabalhadores de uma refinaria de petróleo, onde ocorre a exposição a compostos aromáticos como o xileno, o tempo de exposição não demonstrou ter efeitos significativo nos biomarcadores utilizados, particularmente, MN e dano no DNA. Porém, o grupo exposto há mais anos apresentou um aumento considerável em todos os biomarcadores em estudo.

Em relação aos resultados obtidos por função, foi possível observar que a função de Chefe de Turno foi a que apresentou uma média superior de MN. A média de MN nos trabalhadores que desempenham a função supracitada foi, aproximadamente, 3 vezes maior que a média de MN observada nos indivíduos não expostos. Estes resultados podem estar relacionados com o facto de os chefes de turno estarem expostos a diferentes compostos químicos nas mais variadas atividades. Como descrito no tópico 4.2, estes trabalhadores desenvolvem atividades que podem estar inerentes a outras funções. A somar ao referido anteriormente, são trabalhadores que desenvolvem estas atividades há muitos anos em condições operacionais que nem sempre foram as mesmas. Estes são também trabalhadores com uma faixa etária mais elevada, variando entre os 44 e os 59 anos, e com mais tempo de atividade. Segundo Fenech & Bonassi (2011) desde a década de 80 que é reconhecido o efeito da idade na frequência de MN. O incremento de MN com a idade pode estar relacionado com a combinação de diferentes fatores, nomeadamente, o efeito acumulativo de mutações adquiridas em

genes envolvidos no processo de reparação de DNA e segregação cromossômica e, aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais causadas pela exposição ambiental ou ocupacional (Fenech & Bonassi, 2011). Os chefes de turno também apresentam danos no DNA superiores aos dos indivíduos não expostos o que poderá estar relacionado, tal como nos MN, com a exposição a agentes químicos durante o decorrer das suas tarefas, nomeadamente, a troca de filtros que em alguns casos aconteceu pouco antes da realização de colheitas de sangue.

Os Técnicos de Produção e Análise revelaram valores médios de dano no DNA muito superiores aos indivíduos não expostos, o que pode estar relacionado com os níveis relativamente constantes e elevados de COV nos laboratórios. O que significa que estes trabalhadores estão constantemente expostos, e por esse motivo apresentaram valores médios de dano no DNA, aproximadamente, 3 vezes maior que os indivíduos expostos. Outra razão para valores elevados de dano no DNA é a tarefa de recolha de amostras que apesar de ser geralmente rápida apresenta valores elevados de COV.

A função de Operador de Reator foi a que apresentou valores mais elevados de dano oxidativo, aproximadamente, 8 vezes superior quando comparado com os indivíduos não expostos. Estes resultados podem estar relacionados com as atividades de adição de matéria-prima em pequenas quantidades em cubas em que o solvente já lá está, por exemplo, no ponto D que corresponde a uma dessas adições mediu-se 107 ppm de COV totais. Adicionalmente, estes trabalhadores adicionam muitas vezes aos reatores peróxidos, que estão presentes na composição de algumas resinas alquídicas, e que podem ter contribuído o aumento do dano oxidativo ao nível do DNA.

Por sua vez, as funções de Preparador de Cargas e Operador de Enchimento apresentaram níveis muito superiores de dano no DNA, o que pode estar relacionado com as várias atividades que desenvolvem e que apresentam, por vezes, níveis de exposição elevados, mesmo que por um curto período de tempo. Como é possível observar na tabela 15, o Preparador de Cargas e o Operador de Enchimento estiveram expostos a picos elevados, por exemplo, os correspondentes ao ponto A e ao ponto H, respetivamente.

Os resultados obtidos entre os biomarcadores de exposição e os biomarcadores de efeito não coincidem, no sentido, em que, nas amostras de urina os valores dos metabolitos em estudo foram inferiores ao LoD do método, mas foram detetados efeitos, tendo os trabalhadores apresentado médias superiores em praticamente todos os biomarcadores de efeito comparativamente com os controlos. Alguns dos motivos para a ausência de metabolitos foram discutidos acima, porém, outras explicações podem ser dadas para o aparecimento de efeitos, nomeadamente, estes estarem relacionados com a exposição a uma variedade de misturas e não só com a exposição ao estireno

ou xileno. Apesar de o estireno e o xileno serem uns dos principais solventes utilizados nas instalações industriais onde foi realizada o estudo, a verdade, é que estes trabalhadores estão expostos a outros solventes e matérias-primas que não foram contempladas no estudo, nomeadamente, tolueno, *white spirit*, metiletilcetona (MEK) e outros produtos químicos, que por si só, já são misturas. Este é um contexto de trabalho relativamente complexo, pela quantidade e variedade de substâncias que estão presentes todos os dias. Nesse sentido, o que podemos estar a observar com os resultados dos biomarcadores de efeito pode não ser decorrente da exposição à mistura estireno e xileno, mas sim da exposição a estes compostos e outros tantos que fazem parte deste ambiente de trabalho.

Os efeitos combinados decorrentes da exposição a várias substâncias químicas podem estar associados ou não a interações entre os componentes individuais. Quando não ocorrem interações podemos ter dois modos de ação distintos, tal como referido no tópico 1 do presente estudo, ação semelhante e ação dissimilar. Contudo, os agentes químicos também podem interagir uns com os outros e alterar a magnitude e a natureza de um determinado efeito tóxico. Estas interações podem ocorrer tanto na fase de toxicocinética como na fase toxicodinâmica, e resultar num efeito combinado mais forte (efeito sinérgico) ou fraco (efeito antagonista) do que seria de prever através do conhecimento sobre a toxicidade e modo de ação de cada um dos componentes da mistura (DVFA, 2003). Nesse sentido, é fundamental adquirir e compreender conhecimento científico relacionado com os componentes individuais e, potenciais interações e efeitos combinados de misturas químicas. A avaliação dos potenciais efeitos de uma mistura de agentes químicos requer uma abordagem em que haja a colaboração de áreas científicas distintas, nomeadamente, toxicologia, epidemiologia, avaliação de riscos, entre outras.

6. Considerações finais

Ao longo dos anos têm existido uma preocupação crescente sobre a temática da exposição ocupacional a misturas químicas. Esta preocupação prende-se com o facto de a utilização de agentes químicos ser transversal a todos os setores económicos, abrangendo um elevado número de trabalhadores expostos simultaneamente a vários produtos químicos. Outro motivo para o aumento gradual desta preocupação é o facto de poucas misturas terem sido estudadas desconhecendo-se os possíveis efeitos associados com a exposição.

Os resultados revelaram concentrações baixas destes compostos no ambiente de trabalho, porém, picos elevados de COV totais foram obtidos para tarefas específicas. Os nossos resultados revelaram um pico bastante elevado de outro composto, o tolueno, o que corrobora os resultados de um estudo anterior realizado na mesma fábrica. Foram sugeridas algumas medidas de controlo de risco, nomeadamente, a colocação de ventilação geral mecanizada na zona onde se observaram esses picos de concentração. Considera-se, no entanto, fundamental a realização de uma nova avaliação naquele local com o objetivo de compreender se a medida aplicada foi eficaz na redução e/ou eliminação da contaminação observada. Outras medidas de gestão de risco devem ser igualmente pensadas para os locais que apresentaram picos elevados de COV, nomeadamente, a implementação de equipamentos de proteção coletiva (ventilação localizada) e, caso se verifique ainda necessário, proteção individual. Adicionalmente, devem ser promovidas ações de sensibilização dos trabalhadores para a utilização de equipamentos de proteção individual, uma vez que, na maioria das atividades observadas, os trabalhadores não usavam máscara de proteção respiratória, muito relevante quando se trata de substâncias em que a principal via de exposição é a inalatória.

No que concerne à monitorização biológica, os metabolitos urinários estudados apresentaram níveis abaixo do LoD do método analítico utilizado. Apesar de não terem sido encontrados metabolitos na urina dos trabalhadores, a maioria dos biomarcadores de efeito utilizados apresentaram valores médios superiores ao grupo de controlo, o que pode estar relacionado com a exposição a misturas observada.

A utilização complementar monitorização ambiental e biológica, além da consideração de outra informação pertinente nomeadamente, hábitos tabágicos e sociais, é imprescindível para uma avaliação do risco real e uma gestão do risco mais eficaz.

6.1. Limitações do estudo

Uma das limitações do presente estudo é o tamanho reduzido da amostra, não permitindo avaliar a influência de algumas variáveis, nomeadamente, o efeito da atividade exercida pelo trabalhador na frequência de biomarcadores genotóxicos.

O método analítico utilizado foi outra das limitações devido ao facto de apresentar uma sensibilidade reduzida.

6.2. Perspectivas Futuras

Devido ao crescente interesse relativo à temática exposição a misturas, nos últimos anos temos assistido a uma melhor compreensão dos riscos associados à exposição simultânea a agentes químicos e das metodologias para avaliar esses riscos (Kortenkamp & Faust, 2018; Bopp *et al.*, 2018). O paradigma atual para avaliação do risco a produtos químicos está muito focalizado nos efeitos dos componentes individualmente, inclusive, o REACH centra-se muito na segurança de substâncias individuais (Sarigiannis & Hansen, 2012). Alguns organismos oficiais desenvolveram alguns modelos matemáticos para a avaliação de misturas químicas, mas existem ainda várias limitações devido à falta de dados para a realização de avaliações ao mais elevado nível. Nesse sentido, existe ainda muitas questões para as quais não existem resposta e são necessárias orientações mais detalhadas, que harmonizem as abordagens usadas em diferentes setores legislativos (Kienzler *et al.*, 2016). Novos estudos devem ser desenvolvidos com o objetivo de compreender as interações toxicocinéticas e toxicodinâmicas entre produtos químicos em misturas, bem como a variabilidade de processos biológicos.

7. Referências bibliográficas

- ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). (2017). *Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices*. ACGIH, Cincinnati, EUA.
- AEP (Associação Empresarial de Portugal). (2011). *Caracterização do Sector: Indústria dos Produtos Químicos – Segurança e Saúde no Trabalho*. Associação Empresarial de Portugal, Lisboa, Portugal.
- AIHA (American Industrial Hygiene Association). (2004). *Biological Monitoring - A Practical Field Manual*. American Industrial Hygiene Association, Virginia, EUA.
- Al-Ghamdi, S.S., Raftery, M.J., Yaqoob, M.M. (2003). Organic solvent-induced proximal tubular cell toxicity via caspase-3 activation. *Clinical Toxicology*, 41: 941-5.
- Al-Ghamdi, S.S., Raftery, M.J., Yaqoob, M.M. (2004). Organic solvent-induced proximal tubular cell apoptosis via caspase-9 activation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 16: 147-52.
- Alguacil, J., Porta, M., Malats, N., Kauppinen, T., Kogevinas, M., Benavides, F.G., Partenen, T., Carrato, A. (2002). Occupational exposure to organic solvents and K- *ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, 23(1): 101-106.
- Alimonti, A., Mattei, D. (2008). Biomarkers for human biomonitoring. *WIT Transactions on State-of-the-art in Science and Engineering*, 30: 165-211.
- Altenburger, R., Greco, W.R. (2009). Extrapolation Concepts for Dealing with Multiple Contamination in Environmental Risk Assessment. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 5: 62-68.
- Alves, J.O., Zhuo, C., Levendis, Y.A., Tenório, J.A.S. (2011). Microstructural analysis of carbon nanomaterials produced from pyrolysis/combustion of Styrene-Butadiene-Rubber (SBR). *Materials Research*, 14(4): 499-504.
- Alves, N.O., Loomis, D., Guha, N. (2017). 0370 Systematic review and meta-analysis of occupational exposure to styrene and lung cancer. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 74(Suppl 1): A1-A170.
- Amaral, I.C.C., Carvalho, L.V.B., Pimentel, J.N.S., Pereira, A.C., Vieira, J.A., Castro, V.S., Borges, R.M., Alves, S.R., Nogueira, S.M., Tabalipa, M.M., Otero, U.B., Oliveira, M.P.G., Corrêa, S.M., Fonseca, A.S.A., Moreira, J.C., Peres, F., Teixeira, L.R., Menezes, M.A.C., Mattos, R.C.O.C., Sarcinelli, P.N., Larentis, A.L. (2017). Environmental assessment of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes) and

biomarkers of genotoxicity in gas stations workers. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 42(1): 1-14.

Amorim, L.C.A. (2003). Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 6(2): 158-170.

Andersen, M.E., Cruzan, G., Black, M.B., Pendse, S.N., Dodd, D., Bus, J.S., Sarang, S.S., Banton, M.I., Waites, R., McMullen, P.D. (2017). Assessing molecular initiating events (MIEs), key events (KEs) and modulating factors (MFs) for styrene responses in mouse lungs using whole genome gene expression profiling following 1-day and multi-week exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 335: 28–40.

Antos, G.J., Moser, M.D., Lapinski, M.P. (2004). 8 - Generation of Commercial Catalytic Naphtha-Reforming Catalysts. In: Antos, G.J., Aitani, A.M. (Eds). *Catalytic Naphtha Reforming*. 2ª edição. Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, EUA.

APA (Aromatics Producers Association). (2018). Facts and figures. Disponível em: <https://www.aromaticsonline.eu/aromatics/facts-and-figures> [última consulta: 18-06-2018].

Aquino, T., Zenkner, F.F., Ellwanger, J.H., Prá, D., Rieger, A. (2016). DNA damage and cytotoxicity in pathology laboratory technicians exposed to organic solvents. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 88(1): 227-236.

Aransiola, E.F., Daramola, M.O., Ojumu, T.V. (2013). Chapter 1 - Xylenes: Production Technologies and Uses. In: Daramola, M.O. (Eds). *Xylenes: Synthesis, Characterization and Physicochemical Properties*. Nova Publishers, Nova Iorque, EUA.

Artiola, J.F., Warrick, A.W. (2004). 2 – Sampling and data quality objectives for environmental monitoring. In: Artiola, J. F.; Pepper, I. L. and Brusseau, M. (Eds). *Environmental Monitoring and characteristics Burlington*. Elsevier Academic Press, Massachusetts, EUA.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2007). *Toxicological profile for xylene*. U.S. Department of Health and Human Services.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2010). *Toxicological profile for styrene*. U.S. Department of Health and Human Services.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2012). *Public Health Statement – Styrene*. U.S. Department of Health and Human Services, Washington, EUA.

- Azari, R., Konjin, N., Zayeri, F., Selehpour, S., Seyedi, M.D. (2012). Occupational exposure of petroleum depot workers to BTEX compounds. *International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 3(1): 39-44.
- Ba, H., Podila, S., Liu, Y., Mu, X., Nhut, J., Papaefthimiou, V., Zafeiratos, S., Granger, P., Pham-Huu, C. (2014). Nanodiamond decorated few-layer graphene composite as an efficient metal-free dehydrogenation catalyst for styrene production. *Catalysis Today*, 1: 167-175.
- Backhaus, T., Blanck, H., Faust, M. (2010). *Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures under REACH - State of the Art, Gaps and Options for Improvement*. Swedish Chemicals Agency, Bromma, Suécia.
- Bahrami, A., Jonidi-Jafari, A., Mahjub, H. (2008). Environmental Exposure to Xylenes in Drivers and Petrol Station Workers by Urinary Methylhippuric Acid. *Journal of Research in Health Sciences*, 8(2): 61-68.
- Baker, E.L. (1994). A review of recent research on health effects of human occupational exposure to organic solvents. A critical review. *Journal of Occupational Medicine*, 36(10): 1079–1092.
- Bakoğlu, M., Karademir, A., Ayberk, S. (2004). An evaluation of the occupational health risks to workers in a hazardous waste incinerator. *Journal of Occupational Health*, 46(2): 156-164.
- Banmeyer, I., Marchand, C., Verhaeghe, C., Vucic, B., Rees, J.F., Knoop, B. (2004). Overexpression of human peroxiredoxin 5 in subcellular compartments of chinese hamster ovary cells: effects on cytotoxicity and DNA damage caused by peroxides. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(1): 65-77.
- Barale, R. (1991). The genetic toxicology of styrene and styrene oxide. *Mutation Research*, 257: 107–126.
- Barragán-Martínez, C., Speck-Hernández, C.A., Montoya-Ortiz, G., Mantilla, R.D., Anaya, J., Rojas-Villarraga, A. (2012). Organic Solvents as Risk Factor for Autoimmune Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 7(12): 1-18.
- Beedanagari, S., Vulimiri, S.V., Bhatia, S., Mahadevan, B. (2014). Chapter 43 – Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility. In: Gupta, R.C. (Eds.). *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier Academic Press, Massachusetts, EUA.

- Benignus, V.A., Geller, A.M., Boyes, W.K., Bushnell, P.J. (2005). Human Neurobehavioral Effects of Long-Term Exposure to Styrene: A Meta-Analysis. *Environmental Health Perspectives.*, 113(5): 532–538.
- Berlung, M., Elinder, C.G., Järup, L. (2001). *Human Exposure Assessment – An Introduction*. World Health Organization, Geneva, Suíça.
- Bevan, R., Brown, T., Matthies, F., Sams, C., Jones, K., Hanlon, J., La Vedrine, M. (2017). Human biomonitoring data collection from occupational exposure to pesticides - External scientific report. *EFSA Supporting publication*, 14(3): 1-207.
- Bloemen, H.J., Burn, J. (1993). *Chemistry and Analysis of Volatile Organic Compounds in the Environment*. 1ª Edição. Springer Science & Business Media, Berlim, Alemanha.
- Boman, A., Maibach, H.I. (2000). Influence of Evaporation and Solvent Mixtures on the Absorption of Toluene And n-butanol in Human Skin in Vitro. *The Annals of Occupational Hygiene*, 44(2): 125-135.
- Bonanni, R.S., Gatto, M.P., Paci, E., Gordiani, A., Gherardi, M., Tranfo, G. (2015). Biomonitoring for Exposure Assessment to Styrene in the Fibreglass Reinforced Plastic Industry: Determinants and Interferents. *The Annals of Occupational Hygiene*, 59(8): 1000–1011.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliori, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Ziino, A., Norppa, H. Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3): 625–631
- Bopp, S.K., Barouki, R., Brack, W., Costa, S.D., Dorne, J.L.C.M., Drakvik, P.E., Faust, M., Karjalainen, T.K., Kephelopoulos, S., van Klaveren, J., Kolossa-Gehring, M., Kortenkamp, A., Lebre, E., Lettieri, T., Nørager, S., Rüegg, J., Tarazona, J.V., Trierm X., Bergman, A. (2018). Current EU research activities on combined exposure to multiple chemicals. *Environment International*, 120: 544-562.
- Bouscaren, R., Frank, R., Veldt, C. (1987). *Hydrocarbons. Identification of air quality problems in Member States of the European Communities*. Comissão Europeia.
- Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S., Speit, G. (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20: 245–254.

Bress, B. (2009). Chapter 14 – Risk Assessment. In: Hacker, M., Messer, W. S., & Bachmann, K. A. *Pharmacology: principles and practice*. Elsevier Academic Press, Massachusetts, EUA.

Brodkin, C.A., Moon, J.D., Camp, J., Echeverria, D., Redlich, C.A., Willson, R.A., Checkoway, H. (2001). Serum hepatic biochemical activity in two populations of workers exposed to styrene. *Occupational and Environmental Medicine*, 58(2): 95-102.

Brown, N.A., Lamb, J.C., Brown, S.M., Neal, B.H. (2000). A review of the developmental and reproductive toxicity of styrene. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(3): 228-47.

Brusick, D. (1987). *Principles of genetic toxicology*. 2ª edição. Springer Science, Nova Iorque, EUA.

Campos, M.A.A., Fernandes, A.P.S.M., André, L.C. (2017). Comet assay as a biomarker of genotoxicity to assess occupational exposure to benzene in gas-station attendants and fuel analysts. *Revista brasileira de saúde ocupacional*, 42(1): 1-9.

Cárdenas-Bustamante, O., Varona-Urbe, M., Patiño-Florez, R.I., Groot-Restrepo, H., Sicard-Suárez, D., Tórres-Carvajal, M.M., Pardo-Pardo, D. Bogotá paint-industry workers' exposure to organic solvents and genotoxic effects. *Revista de salud pública*, 9(1): 275-288.

Carlson, G.P. (2011). Hepatotoxicity and pneumotoxicity of styrene and its metabolites in glutathione S-transferase-deficient mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 34(4): 440-4.

Carpenter, D.O., Arcaro, K., Spink, D.C. (2002). Understanding the Human Health Effects of Chemical Mixtures. *Environmental Health Perspectives*, 110(1): 25-42.

Cassini, C., Calloni, C., Bartolini, G., Garcia, S.C., Dornelles, M.A., Henriques, J.A.P., Erdtmann, B., Salvador, M. (2011). Occupational risk assessment of oxidative stress and genotoxicity in workers exposed to paints during a working week. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 24(3): 308–319.

Cavallo, D., Tranfo, G., Ursini, C.L., Fresegna, A.M., Ciervo, A., Maiello, R., Paci, E., Pignini, D., Gherardi, M., Gatto, M.P., Buresti, G., Lavicoli, S. (in press). Biomarkers of early genotoxicity and oxidative stress for occupational risk assessment of exposure to styrene in the fibreglass reinforced plastic industry. *Toxicology Letters*.

Cavallo, D., Ursini, C.L., Carelli, G., Lavicoli, I., Ciervo, A., Perniconi, B., Rondinone, B., Lavicoli, S. (2006). Occupational exposure in airport personnel: characterization and evaluation of genotoxic and oxidative effects. *Toxicology*, 223(1-2): 26-35.

- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2017). *Volatile Organic Compounds Metabolites*. CDC, Atlanta, EUA.
- Cefic (European Chemical Industry Council). (2007). *Styrene Monomer: Environmental, Health, Safety, Transport and Storage guidelines*. Styrene Producers Association, CEFIC Sector Group, Bruxelles, Bélgica.
- Cefic (European Chemical Industry Council). (2014). *Short Introduction to the European Chemical Industry*. Cefic, Bruxelles, Bélgica.
- Cefic (European Chemical Industry Council). (2018). *Landscape of the European Chemical Industry 2018*. Cefic, Bruxelles, Bélgica.
- Cefic. (s.d). *Technical Bulletin 03 – Occupational exposure to styrene*. Plastics Europe. Disponível em: <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/442-occupational-exposure-styrene> [última consulta: 23-09-2018].
- Chan, C.C., Shie, R.H., Chang, T.Y., Tsai, D.H. (2006). Workers' exposures and potential health risks to air toxics in a petrochemical complex assessed by improved methodology. *International Archives Occupational Environmental Health*, 79(2): 135-142.
- Chang, F.K., Chen, M.L., Cheng, S.F., Shih, T.S., Mao, I.F (2007). Evaluation of dermal absorption and protective effectiveness of respirators for xylene in spray painters. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 81(2): 145–150.
- Chang, P., Li, Y., Li, D. (2011). Micronuclei levels in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker for pancreatic cancer risk. *Carcinogenesis*, 32(2): 210-215.
- Chang, W.J., Joe, K.T., Park, H. Y., Jeong, J.D., Lee, D.H. (2013). The Relationship of Liver Function Tests to Mixed Exposure to Lead and Organic Solvents. *Annals of Occupational and Environmental*, 25(5): 1-12.
- Chen, C.S., Hseu, Y.C., Liang, S.H., Kuo, J.Y., Chen, S.C. (2008). Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. *Journal of Hazardous Materials*, 153: 351-356.
- Cheng, Y., Chen, Y., Jiang, Y., Jiang, L., Sun, L., Li, L., Huang, J. (2016). Migration of BTEX and biodegradation in shallow underground water through fuel leak simulation. *BioMed Research International*, 2016.
- Cheong, H.S.J., Seth, I., Joiner, M.C., Tucker, J.D. (2013). Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 28(4): 433–440.

- Cherrie, J.W., Semple, S., Christopher, Y., Saleem, A., Hughson, G.W., Philips, A. (2006). How Important is Inadvertent Ingestion of Hazardous Substances at Work? *The Annals of Occupational Hygiene*, 50(7): 693–704
- Clerc, F., Vincent, R. (2014). Assessment of Occupational Exposure to Chemicals by Air Sampling for Comparison with Limit Values: The Influence of Sampling Strategy. *The Annals of Occupational Hygiene*, 58(4): 437–449.
- Cohen, J.T., Carlson, G., Charnley, G., Coggon, D., Delzell, E., Graham, J.D., Greim, H., Krewski, D., Medinsky, M., Monson, R., Paustenbach, D., Petersen, B., Rappaport, S., Rhomberg, L., Ryan, P., B., Thompson, K. (2002). A comprehensive evaluation of the potential health risks associated with occupational and environmental exposure to styrene. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 5:1–263.
- Collins, A., Azqueta, A. (2012). Single-Cell Gel Electrophoresis Combined with Lesion-Specific Enzymes to Measure Oxidative Damage to DNA. In: Conn, P.M. (Eds.). *Laboratory Methods in Cell Biology: Biochemistry and Cell Culture*. Elsevier Academic Press, Massachusetts, EUA.
- Collins, J.J., Delzell, E. (2018). A systematic review of epidemiologic studies of styrene and cancer. *Critical Reviews in Toxicology*, 48(6): 1-28.
- Costa, M.F.B., Costa, M.A.F. (2002). Exposição ocupacional a compostos orgânicos voláteis na indústria naval. *Quimica Nova*, 25(3): 384-386.
- Cruzan, G., Cushman, J.R., Andrews, L.S., Granville, G.C., Johnson, K.A., Bevan, C., Hardy, C.J., Coombs, D.W., Mullins, P.A., Brown, W.R. (2001). Chronic toxicity/oncogenicity study of styrene in CD- 1 mice by inhalation exposure for 104 weeks. *Journal of Applied Toxicology*, 21:185-198.
- CSTEE (Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment). (2001). *Opinion on the results of the Risk Assessment of: Styrene - Environmental Part*. Comissão Europeia.
- DeCaprio, A. (1999). Biomarkers of exposure and susceptibility. In: Ballantyne, B.; Timothy, C., Syversen, T.L.M (Eds.). *General and Applied Toxicology*. 2ª edição. MacMillan, Basingstoke, Reino Unido.
- DeCaprio, A.P. (1997). Biomarkers: Coming of Age for Environmental Health and Risk Assessment. *Environmental Science & Technology*, 31 (7): 1837–1848.
- Decker, J.A., DeBord, D.G., Bernard, B., Dotson, G.S., Halpin, J., Hines, C.J., Kiefer, M., Myers, K., Page, E., Schulte, P., Snawder, J. (2013). Recommendations for

Biomonitoring of Emergency Responders: Focus on Occupational Health Investigations and Occupational Health Research. *Military Medicine*, 178: 68–75.

Decreto-Lei n.º 24/2012. (2012). Protecção dos trabalhadores contra os riscos de exposição a agentes químicos. *Diário da República*, 1ª Série, 580 – 589.

Dennison, J.E., Bigelow, P.L., Andersen, M.E. (2004). Occupational exposure limits in the context of solvent mixtures, consumption of ethanol, and target tissue dose. *Toxicology and Industrial Health*; 20: 165-175

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft). (2014). *List of MAK and BAT Values - Maximum Concentrations and Biological Tolerance Values at the Workplace*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha.

DGS (Direcção Geral de Saúde). (2018). *Guia Técnico n.º 2: Vigilância da saúde dos trabalhadores expostos a agentes químicos Cancerígenos, Mutagénicos ou Tóxicos para a reprodução*. Direcção Geral de Saúde, Portugal.

Diaz, S., Fonseca, G., Fernandez, I. (1990). Analysis of lymphocyte and oral mucosa cell micronuclei in Cuban paint industry workers. *Hereditas*, 113: 77-80.

Dick F.D. (2006). Solvent neurotoxicity. *Occupational Environmental Medicine*, 63:221–6.

Duan, H., Leng, S., Pan, Z., Dai, Y., Niu, Y., Huang, C., Bin, P., Wang, Y., Liu, Q., Chen, W., Zheng, Y. Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*, 677(1-2):93–9.

Duan, W., Meng, F., Wang, F., Liu, Q. (2017). Environmental behavior and eco-toxicity of xylene in aquatic environments: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 324–332.

Dusinska, M., Collins, A.R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis*, 23(3): 191–205.

Dutra, A., Pak, E., Wincovitch, S., John, K., Poirier, M.C., Olivero, O.A. (2010). Nuclear Bud Formation: A Novel Manifestation of Zidovudine Genotoxicity. *Cytogenetic and Genome Research*, 128(1-3): 105–110.

DVFA (Danish Veterinary and Food Administration). (2003). *Combined Actions and Interactions of Chemicals in Mixtures - The Toxicological Effects of Exposure to Mixtures of Industrial and Environmental Chemicals*. The Danish Veterinary and Food Administration, Søborg, Dinamarca.

ECHA (European Chemicals Agency). (2017). *Guidance on the Application of the CLP Criteria – Guidance*. European Chemicals Agency, Filândia.

EFSA (European Food Safety Authority). (2008). *Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection Products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to human health with a view to set MRLs for those pesticides in the frame of Regulation (EC) 396/2005*. The EFSA Journal, 704: 1-85

EPA (Environmental Protection Agency). (1986). *Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, EUA.

EPA (Environmental Protection Agency). (1993). *Locating and Estimating Air Emissions from Sources of Styrene*. U.S Environmental Protection Agency, Washington, EUA.

EPA (Environmental Protection Agency). (1994). *Locating and estimating air emissions from sources of xylene*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, EUA.

EPA (Environmental Protection Agency). (2003). *Toxicological review of xylenes*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, EUA.

EPA (Environmental Protection Agency). (2016). *Solvents in the Workplace - How to Determine If They Are Hazardous Waste*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, EUA.

European Parliamentary Research Service (EPRS). (2017). *Limits on exposure to carcinogens and mutagens at work: Second proposal*. União Europeia.

Eurostat. (2016). *Compilation of chemical indicators - Development, Revision and Additional Analyses*. União Europeia.

Eurostat. (2017). Production and consumption of chemicals by hazard class. Disponível em: <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do> [Último acesso: 21-05-2018].

Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567: 1–61.

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81–95.

Fenech, M. (2002). Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discovery Today*, 22: 1128-1137.

- Fenech, M. (2005). The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis*, 20: 225 – 269.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*, 600(1-2): 58-66.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5): 1084-104.
- Fenech, M. (2008). The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. *Methods in Molecular Biology*, 410: 185-216.
- Fenech, M., Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26(1): 43–49.
- Fenech, M., Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1): 43-9.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., HUman Micronucleus project. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534: 65–75
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1): 125–132.
- Fernandes, D., Meneses, M., Albuquerque, P., Barros, M. (2017). Environmental monitoring and biomarkers of exposure to styrene in chemical industry. *Saúde & Tecnologia*, 18: 23-29.
- Fortin, M.F. (2006). *Fundamentos e etapas do processo de investigação*. Lusodidacta, Loures, Portugal.
- Fragnière, C., Aebischer, J., Dudler, V., Sager, F. (2003). A short study on the formation of styrene in cinnamon. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 94: 609–620.
- Gagné, S. (2013). A reliable method by ultra-performance liquid chromatography

coupled with tandem mass spectrometry to quantify and confirm simultaneously the presence of solvent metabolites in workers' urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(7): 845-52.

Gil, A.C. (2002). *Como elaborar projetos de pesquisa*. 4ª edição. Editora Atlas, São Paulo, Brasil.

Godderis, L., De Boeck, M., Haufroid, V., Emmery, M., Mateuca, R., Gardinal, S., Kirsh-Volders, M., Veulemans, H., Lison, D. (2004). Influence of Genetic Polymorphisms on Biomarkers of Exposure and Genotoxic Effects in Styrene-Exposed Workers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44: 293–303.

Green T. (2000). Pulmonary toxicity and carcinogenicity of trichloroethylene: Species differences and modes of action. *Environmental Health Perspectives*, 108(2): 261-264.

Green, T., Lee, R., Toghil, A., Meadowcroft, S., Lund, V., Foster, J. (2001). The toxicity of styrene to the nasal epithelium of mice and rats: studies on the mode of action and relevance to humans. *Chemico-Biological Interactions*, 137(2): 185-202.

Greenberg M.M. (1997). The central nervous system and exposure to toluene: a risk characterization. *Environmental Research*, 72: 1–7.

Gupta, R.C. (2014). *Biomarkers in toxicology*. Elsevier Academic Press, Massachusetts, EUA.

Haddad, S., Charest-Tardif, G., Krishnan, K. (2000). Physiologically based modeling of the maximal effect of metabolic interactions on the kinetics of components of complex chemical mixtures. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 61: 209-223.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1998). *Free radicals in biology and medicine*. 2ª edição. Oxford University Press, Londres, Reino Unido.

Hatagima, A., Klautau-Guimarães, M.N., da Silva, F.P., Cabello, P.H. (2000). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4): 709-713.

HBM4EU. (2017). *Newsletter n°1*. Disponível em: https://www.hbm4eu.eu/wp-content/uploads/2017/03/Newsletter-September-2017_Latest-1.pdf. [Último acesso: 24-09-2018].

HCN (Health Council of the Netherlands). (2008). *Occupational exposure to organic solvents: effects on human reproduction*. Health Council of the Netherlands, Den Haag, Holanda.

- Heaton, C. A. (1994). *The chemical industry*. Springer Netherlands.
- Henderson, L.M., Speit, G. (2002). Review of the genotoxicity of styrene in humans. *Mutation Research*, 589: 158–191.
- Heuser, V.D., Andrade, V.M., Silva, J., Erdtmann, B. (2005). Comparison of genetic damage in brazilian footwear-workers exposed to solvent-based or water-based adhesive. *Mutation Research*, 583: 85–94.
- Hoffmann, H., Högel, J., Speit, G. (2005). The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis*, 20(6): 455–466.
- Hsieh, L. L., Chang, C. C., Sree, U., Lo, J.G. (2006). Determination of volatile organic compounds in indoor air of buildings in nuclear power plants, Taiwan. *Water Air and Soil Pollution*, 170(1-4): 107-121.
- Hynes, D.E., DeNicola, D.B., Carlson, G.P. (1999). Metabolism of styrene by mouse and rat isolated lung cells. *Toxicology Sciences*, 51:195–20.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1999). *Volume 71: Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, França.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2002). *Volume 82: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, França.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2018). *List of classifications, volumes 1-121*. Disponível em: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php. [Última consulta: 18-06-2018].
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (*in press*). *Volume 121: Styrene, styrene-7, 8-oxide, and quinoline*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, França.
- Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Bann, R.A., Orsière, T. (2008). Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutation Research*, 658: 215 – 233.
- Ikeda, M. (1995). Exposure to complex mixtures: implications for biological monitoring. *Toxicology Letters*, 77(1-3): 85-91.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety). (1983). *Styrene*. World Health Organization, Geneva, Suíça.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). (1992). *Xylene*. World Health Organization, Geneva, Suíça.

Jacobson, G.A., McLean, S. (2003). Biological Monitoring of Low Level Occupational Xylene Exposure and the Role of Recent Exposure. *Annals of Occupational Hygiene*, 47(4): 331–336.

Jiménez-Garza, O., Bacarellim A.A., Byun, H.M., Márquez-Gamiño, S., Barrón-Vivanco, S., Albores, A. (2015). CYP2E1 epigenetic regulation in chronic, low-level toluene exposure: Relationship with oxidative stress and smoking habit. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 286: 207–215.

Johanson, G., Ernstgård, L., Gullstrand, E., Löf A., Osterman-Golkar, S., Williams, C.C., Summer, S.C.J. (2000). Styrene Oxide in Blood Hemoglobin Adducts, and Urinary Metabolites in Human Volunteers Exposed to ¹³C₈-Styrene Vapors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 168(1): 36-49.

Kandyala, R., Raghavendra, S.P., Rajasekharan, S.T. (2010). Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 14(1): 1-5.

Kang, S.H., Kwon, J.Y., Lee, J.K., Seo, Y.R. (2013). Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. *Journal of Cancer Prevention*, 18(4): 277-288.

Keen-Kim, D., Nooraie, F., Rao, P.N. (2008). Cytogenetic biomarkers for human cancer. *Frontiers Bioscience*, 13: 5928-5949.

Kelly, R.S., Vineis, P. (2014). Biomarkers of susceptibility to chemical carcinogens: the example of non-Hodgkin lymphomas. *British Medical Bulletin*, 111(1): 89–100.

Kienzler, A., Berggren, E., Bessems, J. Bopp, S., van der Linden, S., Worth, A. (2014). *Assessment of Mixtures - Review of Regulatory Requirements and Guidance*. União Europeia.

Kienzler, A., Bopp, S.K., van der Linden, S., Berggren, E., Worth, A. (2016). Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 80: 321-334.

Kim, H. (2010). Occupational diseases in workers exposed to organic solvents. *Hanyang medical reviews*, 30(4): 313–318.

Kim, J.H., Moon, J.Y., Park, E.Y., Lee, K.H., Hong, Y.C. (2011). Changes in Oxidative Stress Biomarker and Gene Expression Levels in Workers Exposed to Volatile Organic Compounds. *Industrial Health*, 49: 8–14.

Kim, J.K., Shin, H.S., Lee, J.H., Lee, J.J., Lee, J.H. (2003). Genotoxic effects of volatile organic compounds in a chemical factory as evaluated by the *Tradescantia* micronucleus assay and by chemical analysis. *Mutation Research*, 541 (1- 2): 55-61.

Kim, K.W. (2015). Effects of Styrene-metabolizing Enzyme Polymorphisms and Lifestyle Behaviors on Blood Styrene and Urinary Metabolite Levels in Workers Chronically Exposed to Styrene. *Toxicology Research*, 31(4): 355-361.

Kishi, R., Tozaki, S., Gong, Y.Y. (2000) Impairment of neurobehavioral function and color vision loss among workers exposed to low concentrations of styrene—a review of literatures. *Industrial Health*, 38: 120–126.

Kogevinas, M., Gwinn, W.M., Kriebel, D., Phillips, D.H., Sim, M., Bertke, S.J., Calaf, G.M., Colosio, C., Fritz, J.M., Fukushima, S., Hemminki, K., Jensen, A.A., Kolstad, H., Mráz, J., Nesnow, S., Nylander-French, L.A., Parent, M.L., Sandy, M., Smith-Roe, S.L., Stoner, G., Sukuzy, T., Teixeira, J.P., Vodicka, P., Ternero-Velez, R., Guyton, K.Z., Grosse, Y., Ghissassi, F.E., Bouvard, V., Benbrahim, Tallaa, L., Guha, N., Vilahur, N., Driscoll, T., Hall, A., Middleton, D., Jaillot, C., Mattock, H., Straif, K. (2018). Carcinogenicity of quinoline, styrene, and styrene-7, 8-oxide. *The Lancet Oncology*, 19(6): 728 – 729.

Kolstad, H.A., Bonde, J.P., Spano, M., Giwercman, A., Zschiesche, W., Kaae, D., Larsen, S.B., Roeleveld, N. (1999a). Change in semen quality and sperm chromatin structure following occupational styrene exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 72: 135-141.

Kolstad, H.A., Bonde, J.P.E., Spano, M., Giwercman, A., Zschiesche, W., Kaae, D., Larsen, S.B., Roeleveld, N. (1999b). Sperm chromatin structure and semen quality following occupational styrene exposure. *Scandinavian Journal of Work, Environmental Health*, 25: 70-73.

Kopjar, N., Garaj-Vrhovac, V. (2001). Application of the alkaline comet assay in human biomonitoring for genotoxicity: a study on Croatian medical personnel handling antineoplastic drugs. *Mutagenesis*, 16 (1): 71–78.

Kopjar, N., Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V. (2006). Evaluation of DNA damage in white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta Biochimica Polonica*, 53: 321-336.

- Kortenkamp, A., Faust, M. (2018). Regulate to reduce chemical mixture risk. *Science*, 361 (6399): 24-226.
- Labrèche, F.P., Goldberg, M.S. (1997). Exposure to Organic Solvents and Breast Cancer in Women: A Hypothesis. *American Journal of Industrial Medicine*, 32: 1–14.
- Ladeira, C., Smajdova, L. (2017). The use of genotoxicity biomarkers in molecular epidemiology: applications in environmental, occupational and dietary studies. *AIMS Genetics*, 4(3): 166-191.
- Ladeira, C., Viegas, S. (2016). Human Biomonitoring – An overview on biomarkers and their application in Occupational and Environmental Health. *Biomonitoring*, 3:15–24.
- Ladeira, C., Viegas, S., Carolino, E., Prista, J., Gomes, M.C., Brito, M. (2011). Genotoxicity biomarkers in occupational exposure to formaldehyde--the case of histopathology laboratories. *Mutation Research*, 721(1): 15-20.
- Laffon, B., Lema, M., Méndez, J. (2001a). Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids as indirect evaluation of styrene exposure. *Journal of Chromatography B*, 753: 385–393.
- Laffon, B., Pásaro, E., Méndez, J. (2001b). Genotoxic effects of styrene-7, 8-oxide in human white blood cells: comet assay in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Mutation Research*, 491: 163–172.
- Laffon, B., Pásaro, E., Méndez, J. (2002). Evaluation of genotoxic effects in a group of workers exposed to low levels of styrene. *Toxicology*, 171: 175–186.
- Laffon, B., Teixeira, J.P., Silva, S., Roma-Torres, J., Pérez-Cadahía, B., Méndez, J., Pásaro, E., Mayan, O. (2006). Assessment of Occupational Genotoxic Risk in the Production of Rubber Tyres. *The Annals of Occupational Hygiene*, 50(6): 583–592.
- Langman, J.M. (1994). Xylene: Its toxicity, measurement of exposure levels, absorption, metabolism and clearance. *Pathology*, 26(3): 301-309.
- Lauwerys, R.R., Hoet, P. (2001). *Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring*. 3ª edição. CRC Press, Florida, EUA.
- Lee, C.W., Dai, Y.T., Chien, C.H., Hsu, D.J. (2006). Characteristics and health impacts of volatile organic compounds in photocopy centers. *Environmental Research*, 100(2): 139-149.
- Lee, K., Bartell, S.M., Paek, D. (2004). Interpersonal and daily variability of personal exposures to nitrogen dioxide and sulfur dioxide. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 14: 137-143.

- Lee, Y.L., Pai, M.C., Chen, J.H., Guo, Y.L. (2003). Central neurological abnormalities and multiple chemical sensitivity caused by chronic toluene exposure. *Occupational Medicine*, 53: 479–482.
- Lemasters, G.K., Livingston, G.K., Lockey, J.E., Olsen, D.M., Shukla, R., New, G., Selevan, S.G., Yiin, J.H. (1997). Genotoxic changes after low-level solvent and fuel exposure on aircraft maintenance personnel. *Mutagenesis*, 12(4): 237-243.
- León-Mejía, G., Espitia-Pérez, L., Hoyos-Giraldo, L.S., Silva, J., Hartmann, A., Henriques, J.A.P., Quintana, M. (2011). Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Science of the Total Environment*, 409: 686–691.
- Leung, M.K., Liu, C.H., Chan, A.H. (2005). Occupational exposure to volatile organic compounds and mitigation by push-pull local exhaust ventilation in printing plants. *Journal of Occupational Health*, 47(6): 540-547.
- Li, Y., Wu, X., Song, J., Li, J., Shao, Q., Cao, N., Lu, N., Guo, Z. (2017). Reparation of recycled acrylonitrile-butadiene-styrene by pyromellitic dianhydride: Reparation performance evaluation and property analysis. *Polymer*, 124: 41-47.
- Liao, W., McNutt, M.A., Zhu, W.G. (2009). The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48: 46–53.
- Lide, D.R. (2001). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 82ª edição. CRC Press, Florida, EUA.
- Limasset, J.C., Simon, P., Poirot, P., Subra, I., Grzebyk, M. (1999). Estimation of the percutaneous absorption of styrene in an industrial situation. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 72: 46–51.
- Liu, L., Zhang, Q., Feng, J., Deng, L., Zeng, N., Yang, A., Zhang, W. (1996). The study of DNA oxidative damage in benzene-exposed workers. *Mutation Research*, 370: 145-150.
- Löf, A., Lundgren, E., Nordqvist, M.B. (1986). Kinetics of styrene in workers from a plastics industry after controlled exposure: a comparison with subjects not previously exposed. *British Journal of Industrial Medicine*, 43: 537-543.
- Londoño-Velasco, E., Martínez-Perafán, F., Carvajal-Varona, S., García-Vallejo, F., Hoyos-Giraldo, L.S. (2016). Assessment of DNA damage in car spray painters exposed to organic solvents by the high-throughput comet assay. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26(4):238-242

- Luzhna, L., Kayhiria, P., Kovalchuck, O. (2013). Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics*, 4(131): 1-17.
- Ma, M., Umemura, T., Mori, Y., Gong, Y., Saijo, Y., Sata, F., Kawai, T., Kishi, R. (2005). Influence of genetic polymorphisms of styrene-metabolizing enzymes and smoking habits on levels of urinary metabolites after occupational exposure to styrene. *Toxicology Letters*, 160: 84–91.
- Malaguarnera, G., Cataudella, E., Giordano, M., Nunnari, G., Chisari, G., Malaguarnera, M. (2012). Toxic hepatitis in occupational exposure to solvents. *World Journal of Gastroenterology*, 18(22): 2756-2766.
- Maluf, S.W. (2004). Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis–block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*, 347: 15-24.
- Manini, p., Andreoli, R., Poli, D., Mutti, A., Niessen, WM. (2002). Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry characterization of styrene metabolism in man and in rat. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(24):2239-48.
- Manno, M., Sito, F., Licciardi, L. (2014). Ethics in biomonitoring for occupational health. *Toxicology Letters*, 231(3): 111-121.
- Manno, M., Viau, C., Cocker, J., Colosio, C., Lowry, L., Mutti, A., Nordberg, M., Wang, S. (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology Letters*, 192: 3–16.
- Marczynski, B., Rozynek, P., Elliehausen, H.J., Korn, M., Baur, X. (1997). Detection of 8- hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in white blood cells of workers occupationally exposed to styrene. *Archives of Toxicology*, 71(8): 496–500.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P., Decordier, I., Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88: 1515- 1531.
- Maynard, S., Schurman, S.H., Harboe, C., Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A. (2009). Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*, 30(1): 2–10.
- Migliore, L., Naccarati, A., Zanello, A., Scarpato, R., Bramanti, L., Mariani, M. (2002). Assessment of sperm DNA integrity in workers exposed to styrene. *Human Reproduction*, 17(11): 2912–2918.

- Migliori, L., Naccarati, A., Coppedè, F., Bergamaschi, E., De Palma, G., Voho, A., Manini, P., Järventaus, H., Mutti, A., Norppa, H., Hirvonen, A. (2006). Cytogenetic biomarkers, urinary metabolites and metabolic gene polymorphisms in workers exposed to styrene. *Pharmacogenetics and Genomics*, 16(2): 87-99.
- Miller, R.R., Newhook, R., Poole, A. (1994). Styrene Production, Use, and Human Exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 24(S1): S1-S10.
- Miyamae, Y., Yamamoto, M., Sasaki, Y.F., Kobayashi, H., Igarashi-Soga, M., Shimoi, K., Hayashi, M. (1998). Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutation Research*, 418(2-3): 131-40.
- Mohammadyan, M., Baharfa, Y. (2015). Control of workers' exposure to xylene in a pesticide production factory. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 21(2): 121-126.
- Møller, p., Knudsen, L.E., Loft, S., Wallin, H. (2000). The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-damaging Agents and Effect of Confounding Factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9: 1005–1015.
- Morakinyo, O.M., Mokgobu, M.I., Mukhola, M.S., Engelbrecht, J.C. (2017). Health risk assessment of exposure to ambient concentrations of benzene, toluene and xylene in Pretoria West, South Africa. *African Journal of Science, Technology, Innovation and Development*, 9(4): 489-496.
- Morakinyo, O.M., Mokgobu, M.I., Mukhola, M.S., Engelbrecht, J.C. (2017). Health risk assessment of exposure to ambient concentrations of benzene, toluene and xylene in Pretoria West, South Africa. *African Journal of Science, Technology, Innovation and Development*, 9(4): 489-496.
- Morata, T.C., Campo, P. (2002). Ototoxic effects of styrene alone or in concert with other agents: A review. *Noise Health*, 4(14): 15-24.
- Mumtaz, M. (2010). Principles and Practice of Mixtures Toxicology. Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha.
- Mumtaz, M.M., Poirier, K.A., Colman, J.T. (1997). Risk Assessment for Chemical Mixtures: Fine-Tuning the Hazard Index Approach. *Journal of Clean Technology, Environmental Toxicology and Occupational Medicine*, 6(2): 189-204.
- Nagarathna, P.K.M., Wesley, M.J., Reddy, P.S., Reena, K. (2013). Review on Genotoxicity, its Molecular Mechanisms and Prevention. *International Journal Pharmaceutical Sciences Review Research*, 22(1): 236-243.

- Nakajima, T. (1997). Cytochrome P450 Isoforms and the Metabolism of Volatile Hydrocarbons of Low Relative Molecular Mass. *Journal of occupational Health*, 39: 83–91.
- Nakayama, S., Nishide, T., Horike, T., Kishimoto, T., Kira, S. (2004). Evaluation of Efficiency of Respiratory Protective Equipment based on the Biological Monitoring of Styrene in Fibreglass Reinforced Plastics Industries. *Journal of Occupational Health*, 46: 132-150.
- Namazi, H. (2017). Polymers in our daily life. *Bioimpacts*, 7(2): 73-74.
- National Research Council (NRC). (1987). Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Environmental Health Perspectives*, 74: 3-9.
- Nestmann, E.R., Lynch, B.S., Ratpan, F. (2005). Perspectives on The Genotoxic Risk of Styrene. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 8: 95–107.
- Nett, R.J., Cox-Ganser, J.M., Hubbs, A.M., Cummings, K.J., Huang, Y.T., Kreiss, K. (2017). Non-Malignant Respiratory Disease Among Workers in Industries Using Styrene - A Review of the Evidence. *American Journal of Industrial Medicine*, 60(2): 163-180.
- Niaz, K., Bahadar, H., Maqbool, F., Abdollahi, M. (2015). A review of environmental and occupational exposure to xylene and its health concerns. *EXCLI Journal*, 14: 1167-1186.
- Norma Portuguesa 1796. (2014). Segurança e Saúde no Trabalho – Valores-limite e índices biológicos de exposição profissional a agentes químicos. Instituto Português da Qualidade.
- Norppa, H., Sorsa, M. (1993). Genetic toxicity of 1,3-butadiene and styrene. In: Sorsa, M., Peltonen, K., Vainio, H., Hemminki, K. (Eds.). *Butadiene and Styrene: Assessment of Health Hazards*. IARC Scientific Publications, Lyon, França.
- NRC (National Research Council Committee). (2014). *Review of the styrene assessment in the National Toxicology Program 12th Report on Carcinogens*. The National Academies Press, Washington, EUA.
- NRC (National Research Council). (2003). *Occupational Health and Safety in the Care and Use of Nonhuman Primates*. The National Academies Press, Washington, EUA.
- NTP (National Toxicology Program). (2006). *NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Styrene*. U.S. Department of Health and Human Services, EUA.

NTP (National Toxicology Program). (2011). *12th Report on Carcinogens*. U.S. Department of Health and Human Services, EUA.

Occupational Hygiene Tool. *Annals of Occupational Hygiene*, 49(3): 201-217.

OEHHA (Office of Environmental Health Hazard Assessment). (2012). *Evidence on the developmental and reproductive toxicity of Xylene*. California Environmental Protection Agency, EUA.

Oliveira, H.M., Dagostim, G.P., Silva, A.M., Tavares, P., Rosam L.A.Z.C., Andrade, V.M. (2011). Occupational risk assessment of paint industry workers. *Indian J Occupational and Environmental Medicine*, 15(2): 52-58.

Onchoi, C., Kongtip, P., Yoosook, W., Chantanakul, S. (2008). High Performance Liquid Chromatography for determination of urinary metabolites of toluene, xylene and styrene and its application. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 39(6): 1164-1171.

Palanikumar, L., Panneerselvam, N. (2011). Micronuclei Assay: A Potential Biomonitoring Protocol in Occupational Exposure Studies. *Russian Journal of Genetics*, 47(9): 1033–1038.

Palma, M., Briceño, L., Idrovo, A.J., Varona, M. (2015). Evaluación de la exposición a solventes orgánicos en pintores de carros de la ciudad de Bogotá. *Biomédica*, 35(2): 66-76.

Pardini, B., Viberti, C., Naccarati, A., Allione, A., Oderda, M., Critelli, R., Preto, M., Zijno, A., Cucchiareale, G., Gontero, P., Vineis, P., Sacerdote, C., Matullo, G. (2017). Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 116(2): 202-210.

Parry, E.M., Parry, J.M., Corso, C., Doherty, A., Haddad, F., Hermine, T.F., Johnson, G., Kayani, M., Quick, E., Warr, T., Williamson, J. (2002). Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. *Mutagenesis*, 17(6): 509-521.

Paustenbach, D., Galbraith, D. (2006). Biomonitoring and Biomarkers: Exposure Assessment Will Never Be the Same. *Environmental Health Perspectives*, 114(8): 1143-1149.

Pekari, K., Nylander-French, L., Pfäffl, P., Sorsa, M., Aitio, A. (1993). Biological monitoring of exposure to styrene: assessment of different approaches. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2: 115- 26.

- Periago, J.F., Prado, C. (2005). Evolution of Occupational Exposure to Environmental Levels of Aromatic Hydrocarbons in Service Stations. *The Annals of Occupational Hygiene*, 49(3): 233–240.
- Phneah, S.L., Hassim, M.H., Ng, D.K.S. (2017), Review of chemical hazard based occupational health assessment methods for chemical processes. *Chemical Engineering Transactions*, 56: 1813-1818.
- Pilger, A., Rüdiger, H.W. (2006). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 80(1): 1-15.
- Pitarque, M., Vaglenov, A., Nosko, M., Pavlova, V., Petkova, V., Hirvonen, A., Creus, A., Norppa, H., Marcos, R. (2002). Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. *Environmental Health Perspectives*, 110(4): 399-404.
- Polver, P.P., Fenoglio, C., Nano, R., Coccini, T., Bertone, V., Vaccarone, R., Gerzeli, G. (2003). Styrene hepatotoxicity in rats treated by inhalation or intraperitoneally: a structural investigation. *Histology and Histopathology*, 18: 49-54.
- Prasher, D., Morata, T., Campo, P., Fechter, L., Johnson, A., Lund, S.P., Pawlas, K., Starck, J., Sułkowski, W., Sliwinska-kowalska, M. (2002). *Noisechem*: An European Commission research project on the effects of exposure to noise and industrial chemicals on hearing and balance. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 15(1): 5-11.
- Preller, L., Burstyn, I., De Pater, N. (2004). Characteristics of peaks of inhalation exposure to organic solvents. *The Annals of Occupational Hygiene*, 48: 643-652.
- Prieto, M.J., Marhuenda, D., Cardona, A. (2002). Analysis of styrene and its metabolites in blood and urine of workers exposed to both styrene and acetone. *Journal of Analytical Toxicology*, 26(1):23-28.
- Prieto, M.J., Marhuenda, D., Cardona, A. (2002). Analysis of Styrene and its Metabolites in Blood and Urine of Workers Exposed to both Styrene and Acetone. *Journal of Analytical Toxicology*, 26(1): 23-28.
- Prista, J., Uva, A. D. S. (2003). Exposição profissional a agentes químicos: os indicadores biológicos na vigilância de saúde dos trabalhadores. *Saúde & Trabalho*, 4: 5-12.

Prista, J., Uva, A.S. (2006). A utilização de indicadores biológicos em Saúde Ocupacional. Lisboa: *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 6: 45-54.

Rajan, S.T., Malathi, N. (2014). Health Hazards of Xylene: A Literature Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(2):271-274.

Ramírez, N., Cuadras, A., Rovira, E., Borrull, F., Marcé, R.M. (2012). Chronic risk assessment of exposure to volatile organic compounds in the atmosphere near the largest Mediterranean industrial site. *Environment International*, 39: 200–209.

Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho. (2006). Relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH).

Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho. (2008). Relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas.

Regulamento (UE) n.º 2016/679 do Parlamento Europeu e do Conselho. (2016). Relativo ainda à proteção das pessoas singulares no que diz respeito ao tratamento de dados pessoais e à livre circulação desses dados.

Regulamento (UE) n.º 605/2014 da Comissão. (2014). Altera, para efeitos de aditamento das advertências de perigo e das recomendações de prudência em língua croata e de adaptação ao progresso técnico e científico, o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas.

Rekhadevi, P.V., Rahman, M.F., Mahboob, M., Grover, P. (2010). Genotoxicity in Filling Station Attendants Exposed to Petroleum Hydrocarbons. *The Annals of Occupational Hygiene*, 54(8): 944–954.

Rhomberg, L.R., Goodman, J.E., Prueitt, R.L. (2013). The Weight of Evidence Does Not Support the Listing of Styrene as “Reasonably Anticipated to be a Human Carcinogen” in NTP’s Twelfth Report on Carcinogens. *Human and Ecological Risk Assessment*, 19(1): 4–27.

Roma-Torres, J., Teixeira, J.P., Silva, S., Laffon, B., Cunha, L.M., Méndez, J., Mayan, O. (2006). Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plants. *Mutation Research*, 604(1-2): 19-27.

Rosén, G., Andersson, I.M., Walsh, P.T., Clark, R.D.R., Säämänen, A., Heinonen, K., Riipinen, H., Pääkkönen, R. (2005). A Review of Video Exposure Monitoring as an

Rostami, R., Jafari, A.J. (2014). Application of an adsorptive-thermocatalytic process for BTX removal from polluted air flow. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 12: 89.

- Rueff, J., Teixeira, J.P., Santos, L.S., Gaspar, J.F. (2009). Genetic effects and biotoxicity monitoring of occupational styrene exposure. *Clinica Chimica Acta* 399: 8–23.
- Ryan, T.J., Burroughs, G.E., Taylor, K., Kovein, R.J. (2003). Video Exposure Assessments Demonstrate Excessive Laboratory Formaldehyde Exposures. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 18(6): 450-457.
- Sánchez, A.P., Sánchez, E.J.P., Silva, R.M.S. (2017). Simulation of the Styrene Production Process Via Catalytic Dehydrogenation of Ethylbenzene Using CHEMCAD® Process Simulator. *Tecnura*, 21(53): 15-31.
- Sandle, T. (2006). Environmental monitoring risk assessment. *Journal of GXP Compliance*, 10(2): 231-237.
- Sapkota, A., Williams, D., Buckley, T.J. (2005). Tollbooth workers and mobile source-related hazardous air pollutants: how protective is the indoor environment? *Environmental Science & Technology*, 39(9): 2936-2943.
- Sarangapani, R., Teegarden, J.G., Cruzan, G., Clewell, H.J., Andersen, M.E. (2002). Physiologically based pharmacokinetic modeling of styrene and styrene oxide respiratory-tract dosimetry in rodents and humans. *Inhalation Toxicology*, 14: 789–834.
- Sarigiannis, D.A., Hansen, U. (2012). Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals – A challenge for policy makers. *Environmental Health*, 11(1):1-12.
- Sartorelli, P. (2002). Dermal exposure assessment in occupational medicine. *Occupational Medicine*, 52(3): 151–156.
- Schins, R.P.F., Schilderman, P.A.E.L., Borm, P.J.A (1995). Oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 67: 153-157.
- Schulte P., Mazzuckelli L.F. (1991). Validation of biological markers for quantitative risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 90: 239–246.
- SCOEL (Scientific Committee on Occupational Exposure Limits). (2014). *List of recommended health-based biological limit values (BLVs) and biological guidance values (BGVs)*. União Europeia.
- Scott, D., Preston, R.J. (1994). A re-evaluation of the cytogenetic effects of styrene. *Mutation Research*, 318: 175–203.
- Sellappa, S., Mani, B., Kevan, K.S. (2011). Cytogenetic biomonitoring of road paving workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12(3): 713-717.

Semple, S. (2005). Assessing occupational and environmental. *Occupational Medicine*, 55:419–424.

Serrano-García, L., Montero-Montoya, R. (2001). Micronuclei and Chromatid Buds are result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38(1): 38 – 45.

Sheldon, L.S. (2010). Chapter 42 – Exposure Framework. In: Krieger, R. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. 3ª edição. Academic Press, Massachussets, EUA.

Silins, I., Högberg, J. (2011). Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(3):629-647.

Singh, M.P., Mishra, M., Sharma, A., Shukla, A.K., Mudiam, M.K.R., Patel, D.K., Ram, K.R., Chowdhuri, D.K. (2011). Genotoxicity and apoptosis in *Drosophila melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: Attenuation by quercetin and curcumin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253: 14-30.

Singh, N.P., McCoy, M. T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175 (1): 184–191.

Sivasankari, N.P., Kaur, S., Reddy, K.S., Vivekanandam, S. (2008). Micronucleus Index: an early diagnosis in oral carcinoma. *Journal of the Anatomical Society of India*, 57:8-13.

Smith, T. (2001). Studying Peak Exposure – toxicology and exposure statistics. In: Marklund, S. (Eds.). *X2001 – Exposure assessment in epidemiology and practice*. National Institute for Working Life, Estocolmo, Suécia.

Somorovská, M., Jahnová, E., Tulinská, J., Zámečníková, M., Šarmanová, J., Terenová, A., Vodičková, L., Lišková, A., Vallová, B., Souček, P., Hemminki, K., Norppa, H., Hirvonen, A., Tates, A.D., Fuortes, L., Dušinská, M., Vodička, P. (1999). Biomonitoring of occupational exposure to styrene in a plastics lamination plant. *Mutation Research*, 428: 255–269

Speight, J. (2002). *Chemical and Process Design Handbook*. The McGraw-Hill Companies, Inc., Nova Iorque, EUA.

Speit, G., Schütz, P., Bonzheim, I., Trenz, K., Hoffmann, H. (2004). Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicology Letters*, 146(2): 151-158.

- Šperlingová, I., Dabrowská, L., Stránský, V., Kučera, J., Tichý, M. (2003). Preliminary study to prepare a reference material of styrene metabolites – mandelic acid and phenylglyoxylic acid – in human urine. *Accreditation and Quality Assurance*, 8(3-4): 113-116.
- Spirtas, R., Stewart, P.A., Lee, J.S., Marano, D.E., Forbes, C.D., Grauman, D.J., Pettigrew, H.M., Blair, A., Hoover, R.N., Cohen, J.L. (1991). Retrospective cohort mortality study of workers at an aircraft maintenance facility. I Epidemiological results. *British Journal of Industrial Medicine*, 48: 515-530.
- Steele, D.H., Thornburg, M.J., Stanley, J.S., Miller, R.R., Brooke, R., Cushman, J.R., Cruzan, G. (1994). Determination of styrene in selected foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8): 1661–1665.
- Stewart, P.A., Lee, J.S., Marano, D.E., Spirtas, R., Forbes, C.D., Blair, A. (1991). Retrospective cohort mortality study of workers at an aircraft maintenance facility. II Exposures and their assessment. *British Journal of Industrial Medicine*, 48: 531-537.
- Sułkowski, W.J., Kowalska, S., Matyja, W., Guzek, W., Wesołowski, W., Szymczak, W., Kostrzewski, P. (2002). Effects of occupational exposure to a mixture of solvents on the inner ear: a field study. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 15(3): 247-256.
- Suspiro, A., Prista, J. (2011). Biomarkers of occupational exposure to anticancer agents: A minireview. *Toxicology Letters*, 207: 42–52.
- Swaminathan, V. (2011). Occupational health and safety in chemical industries in transitional economies. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 15(3): 85-86.
- Swaminathan, V. (2011). Occupational health and safety in chemical industries in transitional economies. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 15(3): 85–86.
- Symanski, E., Rappaport, S.M. (1994). An Investigation of the Dependence of Exposure Variability on the Interval Between Measurements. *The Annals of Occupational Hygiene*, 38(4):361-372.
- Szúcs, S., Tóth, L., Legoza, J., Sárváry, A., Adány, R. (2002). Simultaneous determination of styrene, toluene, and xylene metabolites in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Archives of Toxicology*, 76: 560–569.

- Takemoto, M., Achiwa, K. (2001). Synthesis of Styrenes through the Biocatalytic Decarboxylation of trans-Cinnamic Acids by Plant Cell Cultures. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49(5): 639-641.
- Takeuchi, A., Kawai, T., Zhang, Z.W., Miyama, Y., Sakamoto, K., Higashikawa, K., Ikeda, M. (2002). Toluene, xylenes and xylene isomers in urine as biological indicators of low-level exposure to each solvent; a comparative study. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 75(6): 387-393.
- Teixeira, J., Costa, S., Coelho, P., Costa, C., Silva, S., Moreira, A., Laffon, B. (2011). Cytogenotoxic Effect on Workers Exposed to Styrene. Influence of Genetic Polymorphisms. *Epidemiology*, 22(1): 229.
- Teixeira, J.P., Gaspar, J., Coelho, P., Costa, C., Pinho-Silva, S., Costa, S., Da Silva, S., Laffon, B., Pásaro, E., Rueff, J., Farmer, P. (2010). Cytogenetic and DNA damage on workers exposed to styrene. *Mutagenesis*, 25(6): 617–621.
- Teixeira, J.P., Gaspar, J., Silva, S., Torres, J., Silva, S.N., Azevedo, C., Neves, P., Laffon, B., Méndez, J., Gonçalves, C., Mayan, O., Garmer, P.B., Rueff, J. (2004). Occupational exposure to styrene: modulation of cytogenetic damage and levels of urinary metabolites of styrene by polymorphisms in genes CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1. *Toxicology*, 195: 231–242.
- Thomas, P., Umegaki, K., Fenech, M. (2003). Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 18 (2): 187–194.
- Thorud, S., Gjolstad, M., Ellingsen, D.G., Molander, P. (2005). Air formaldehyde and solvent concentrations during surface coating with acid-curing lacquers and paints in the woodworking and furniture industry. *Journal of Environmental Monitoring*, 7(6): 586-591.
- Tranfo, G., Gherardi, M., Paci, E., Gatto, M., Gordiani, A., Caporossi, L., Capanna, S., Sisto, R., Papaleo, B., Fiumalbi, C., Garofani, P. (2012). Occupational exposure to styrene in the fibreglass reinforced plastic industry: comparison between two different manufacturing processes. *La Medicina del Lavoro*, 103(5): 402-412.
- Trujillo, F., Dang, D., Starck, T. (2003). Xylene keratopathy: a case report and review of the literature. *Cornea*, 22(1): 88-90.
- Tunsaringkarn, T., Siriwong, W., Rungsiyothin, A., Nopparatbundit, S. (2012). Occupational Exposure of Gasoline Station Workers to BTEX Compounds in Bangkok, Thailand. *The International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 3: 117-125.

- Uchida, Y., Nakatsuka, H., Ukai, H., Watanabe, T., Liu, Y.T., Huang, M.Y., Wang, Y.L., Zhu, F.Z., Yin, H., Ikeda, M. (1993). Symptoms and signs in workers exposed predominantly to xylenes. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 64: 597-605.
- Valente, D., Costa-Amaral, I.C., Carvalho, L.V.B., dos Santos, M.V.C., Castro, V.S., Rodrigues, D.R.F., de Falco, A., Silva, C.B., Nogueira, S.M., Gonçalves, E.S., Moreira, J.C., André, L.C., Teixeira, L.R., Sarcinelli, P.N., Sisenando, H.A., de Oliveira, M.S., Perini, J.A., Mattos, R.C.O.C., Larentis, A.L. (2017). Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 42(supl 1): 1-21.
- Valverde, M., Rojas, E. (2009a). Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research*, 681: 93-109.
- Valverde, M., Rojas, E. (2009b). The Comet assay in human biomonitoring. In: Dhawan, A., Anderson, S. *The Comet Assay in Toxicology*. Royal Society of Chemistry, Londres, Reino Unido.
- Vencovsky, D., Postle, M., Kalberlah, D., Vencovska, J., Fenn, T., Daly, E., Hanlon, J., Osborne, K. (2017). *The cost of occupational cancer in the EU-28*. European Trade Union Institute, Bruxelas, Bélgica.
- Viaene, M., Vermier, G., Godderis, L. (2009). Sleep disturbances and occupational exposure to solvents. *Sleep Medicine Reviews*, 13(3): 235-243.
- Viaene, M.K. (2002). Overview of the neurotoxic effects in solvent-exposed workers. *Archives of Public Health*, 60: 217-232.
- Viaene, M.K., Pauwels, W., Veulemans, H., Roels, H.A., Masschelein, R. (2001). Neurobehavioural changes and persistence of complaints in workers exposed to styrene in a polyester boat building plant: influence of exposure characteristics and microsomal epoxide hydrolase phenotype. *Occupational and Environmental Medicine*, 58:103–112.
- Viau, C. (2002). Biological monitoring of exposure to mixtures. *Toxicology Letters*, 134: 9–16.
- Viegas, S. (2011). Occupational exposure to volatile organic compounds in the Portuguese printing industry. *Environmental Health and Biomedicine*, 15: 233-239.
- Vine, M.F. (1994). Biological Markers: Their Use in Quantitative Assessments. *Advances in Dental Research*, 8(1): 92-9.

Vineis, P., Zeise, L. (2010). Styrene-7, 8-oxide and Styrene. In: *Identification of research needs to resolve the carcinogenicity of highpriority IARC carcinogens*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Vodicka, P., Koskinen, M., Naccarati, A., Oesh-Bartlomowicz, B., Vodickova, L., Hemminki, K., Oesh, F. (2006). Styrene metabolism, genotoxicity, and potential carcinogenicity. *Drug Metabolism Reviews*, 38: 805–853.

Vodicka, P., Tuimala J., Stetina, R., Kumar, R., Manini, P., Naccarati, A., Maestri, L., Vodickova, L., Kuricova, M., Järventaus, H., Majvaldova, Z., Hirvone, A., Imbriani, M., Mutti, A., Migliore, L., Norppa, H., Hemminki, K. (2004). Cytogenetic Markers, DNA Single-Strand Breaks, Urinary Metabolites, and DNA Repair Rates in Styrene-Exposed Lamination Workers. *Environmental Health Perspectives* 12(8): 867-871.

Vodicka, P., Tuimala, J., Stetina, R., Kumar, R., Manini, P., Naccarati, A., Maestri, L., Vodickova, L., Kuricova, Järventaus, H., Majvaldova, Z., Horvonen, A., Imbriani, M., Mutti, A., Migliori, L., Norppa, H., Hemminki, K. (2004). Cytogenetic Markers, DNA Single-Strand Breaks, Urinary Metabolites, and DNA Repair Rates in Styrene-Exposed Lamination Workers. *Environmental Health Perspectives*, 112(8): 867-871.

Waterfield, C., Timbrell, J. A. (1999). Biomarkers – An Overview In: Bellantyne, B.; Marrs, T.C., Syversen, T. *General and Applied Toxicology*. 2ª edição. MacMillan, Basingstoke, Reino Unido.

Watson W.P., Mutti A. (2004). Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects. *Biomarkers*, 9: 211–242.

Weng, Z., Sudam M., Wan, M., Zhang, X., Guan, D., Zhao, P., Zheng, Y., Miyagawa, M., Wang, R.S. (2016). Significant association between decreased ALDH2 activity and increased sensitivity to genotoxic effects in workers occupationally exposed to styrene. *Oncotarget*, 7(25): 38224-38234.

Wenker, M.A.M., Kezic, S., Monster, A.C., Wolff, F.A (2001). Metabolic capacity and interindividual variation in toxicokinetics of styrene in volunteers. *Human & Experimental Toxicology*, 20: 221-228.

WHO (World Health Organization). (1997). *Environmental Health Criteria 190: Xylenes*. World Health Organization, Geneva, Suíça.

WHO (World Health Organization). (2000). *Air Quality Guidelines for Europe*. 2ª edição. WHO Regional Publications, European Series, Copenhaga.

- WHO (World Health Organization). (2003). *Xylenes in Drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. World Health Organization, Geneva, Suíça.
- WHO (World Health Organization). (2015). *Human biomonitoring: facts and figures*. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.
- WHO/IPCS (World Health Organization & International Programme on Chemical Safety). (1993). *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles / published under the joint sponsorship of the United Nations environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization*. World Health Organization, Geneva, Suíça.
- WMA (World Medical Association). (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310:2191–2194.
- Wongvijitsuk, S., Navasumrit, P., Vattanasit, U., Parnlob, V., Ruchirawat, M. (2011). Low level occupational exposure to styrene: Its effects on DNA damage and DNA repair. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214: 127–137.
- Xiong, F., Li, Q., Zhou, B., Huang, J., Liang, G., Zhang, L., Ma, S., Oing, L., Liang, L., Su, J., Peng, X., Li, O., Zou, Y. (2016). Oxidative Stress and Genotoxicity of Long-Term Occupational Exposure to Low Levels of BTEX in Gas Station Workers. *International Journal of Environmental Resesearch and Public Health*, 13(1212): 1-9.
- Yamamoto, P.A., de Moraes, N.V., Silva, V.P., Lepera, J.S. (2016). Análise simultânea dos indicadores biológicos de exposição aos solventes etilbenzeno, estireno, tolueno e xileno na urina por CLAE-UV. *Química Nova*, 39(9): 1131-1135.
- Yip, C., Han, N.L.R., Sng, B.L. (2016). Legal and ethical issues in research. *Indian Journal of Anaesthesia.*, 60(9): 684-688.
- Zailina, H., Mohd Hafiz Syazwan, T., Naing, L., Jamal, H.H., Rusli, N. (2013). Occupational xylene exposure and respiratory impairment of paint manufacturing workers. *International Journal of Medical Sciences*, 5(5): 214-220.
- Zevedegani, K., Barakat, S., Yazdi, M. (2016). Chemical risk assessment in a chemical laboratory based on three different techniques. *Journal of Occupational Health and Epidemiology*, 5 (3): 168-175.
- Zhang, X., Duan, H., Gao, F., Li, Y., Huang, C., Niu, Y., Gao, W., Yu, S., Zheng, Y. (2015). Increased Micronucleus, Nucleoplasmic Bridge, and Nuclear Bud Frequencies

in the Peripheral Blood Lymphocytes of Diesel Engine Exhaust-Exposed Workers.
Toxicological Sciences, 143(2): 408-417.

Índice Geral de Anexos

Anexo I – Método NIOSH 1501 (EN)

Anexo I – Método NIOSH 1501 (EN)

HYDROCARBONS, AROMATIC

1501

FORMULA: Table 1

MW: Table 1

CAS: Table 1

RTECS: Table 1

METHOD: 1501, Issue 3		EVALUATION: Full		Issue 1: 15 August 1990 Issue 3: 15 March 2003		
OSHA: Table 2 NIOSH: Table 2 ACGIH: Table 2		PROPERTIES: Table 1				
SYNONYMS: (Synonyms in Table 1)						
<u>Group A:</u> benzene		toluene	ethylbenzene	<i>o</i> -xylene	<i>m</i> -xylene	<i>p</i> -xylene
<u>Group B:</u> cumene		<i>p</i> -tert-butyltoluene	α -methylstyrene	β -methylstyrene	styrene	
SAMPLING			MEASUREMENT			
SAMPLER:	SOLID SORBENT TUBE (coconut shell charcoal, 100 mg/50 mg)		TECHNIQUE:	GAS CHROMATOGRAPHY, FID		
FLOW RATE:	Table 3		ANALYTE:	Hydrocarbons listed above		
VOL-MIN:	Table 3		DESORPTION:	1 mL CS ₂ , stand 30 min with agitation		
-MAX:	Table 3		INJECTION			
SHIPMENT:	Routine		VOLUME:	1 μ L (<u>Group A:</u> split 5:1; <u>Group B:</u> split 1:1)		
SAMPLE STABILITY:	30 days @ 5°C		TEMPERATURE			
BLANKS:	10% of samples		-INJECTION:	250 °C		
			-DETECTOR:	300 °C		
			-COLUMN:	<u>Group A:</u> 40 °C (10 min) to 230°C (10 °C/min) <u>Group B:</u> 35°C (8 min) to 225°C (10°C/min)		
			CARRIER GAS:	He @ 2.6 mL/min		
ACCURACY			COLUMN:	Capillary, fused silica <u>Group A:</u> 30m x 0.32-mm ID; 1- μ m film 100% PEG or equivalent <u>Group B:</u> 30m x 0.53-mm ID; 3- μ m film crossbonded@35% diphenyl 65% dimethyl polysiloxane or equivalent		
RANGE STUDIED:	Table 3		CALIBRATION:	Solutions of analytes in CS ₂		
BIAS:	Table 3		RANGE:	Table 4		
OVERALL PRECISION (\$_r):	Table 3		ESTIMATED LOD:	Table 4		
ACCURACY:	Table 3		PRECISION (\$_s):	Table 4		
APPLICABILITY: This method is for peak, ceiling, and TWA determinations of aromatic hydrocarbons. Interactions between analytes may reduce breakthrough volumes and affect desorption efficiencies. Naphthalene, originally validated in S292 [4], failed to meet acceptable desorption efficiency recovery and storage stability criteria at the levels evaluated in this study. However, the application of this method to naphthalene levels at or near the REL/PEL continues to meet acceptable recovery criteria. Styrene failed to meet acceptable recovery criteria at the two lowest levels evaluated in this study (highest level to meet the criteria was 181 μ g/sample).						
INTERFERENCES: Under conditions of high humidity, the breakthrough volumes may be reduced. Other volatile organic compounds such as alcohols, ketones, ethers, and halogenated hydrocarbons are potential analytical interferences.						
OTHER METHODS: This method updates NMAM 1501 issued on August 15, 1994 [1] which was based upon P&CAM 127 (benzene, styrene, toluene, and xylene) [2]; S22 (<i>p</i> -tert-butyltoluene) [3]; S23 (cumene) [3]; S29 (ethylbenzene) [3]; S26 (α -methylstyrene) [3]; S30 (styrene); S311 (benzene) [4]; S343 (toluene) [4]; and S318 (xylenes) [4].						

REAGENTS:

1. Carbon disulfide*, low benzene, chromatographic quality.
2. Analytes, reagent grade.
3. Helium, prepurified and filtered.
4. Hydrogen, prepurified and filtered.
5. Air, prepurified and filtered.

* See SPECIAL PRECAUTIONS

EQUIPMENT:

1. Sampler: glass tube, 7 cm long, 6-mm OD, 4-mm ID, flame-sealed ends, containing two sections of activated coconut shell charcoal (front = 100 mg, back = 50 mg) separated by a 2-mm urethane foam plug. A silylated glass wool plug precedes the front section and a 3-mm urethane foam plug follows the back section. Tubes are commercially available.
2. Personal sampling pump, 0.01 to 1.0 L/min (Table 3), with flexible connecting tubing.
3. Gas chromatograph, FID, integrator, and columns (page 1501-1).
4. Autosampler vials, glass, 1.8 mL, with PTFE-lined caps.
5. Pipets, 1-mL, and pipet bulb.
6. Syringes, 10- μ L, 25- μ L, and 250- μ L.
7. Volumetric flasks, 10-mL.

SPECIAL PRECAUTIONS: Carbon disulfide is toxic and extremely flammable (flash point = -30°C), benzene is a suspect carcinogen. Prepare standards and samples in a well ventilated hood.

SAMPLING:

1. Calibrate each personal sampling pump with a representative sampler in line.
2. Break the ends of the sampler immediately before sampling. Attach sampler to personal sampling pump with flexible tubing.
3. Sample at an accurately known flow rate between 0.01 and 0.2 L/min for a total sample size as shown in Table 3.
4. Cap the samplers with plastic (not rubber) caps and pack securely for shipment.

SAMPLE PREPARATION:

5. Place the front and back sorbent sections of the sampler tube in separate vials. Include the glass wool plug in the vial along with the front sorbent section.
6. Add 1.0 mL eluent to each vial. Attach crimp cap to each vial immediately.
7. Allow to stand at least 30 min with occasional agitation.

CALIBRATION AND QUALITY CONTROL:

8. Calibrate daily with at least six working standards from below the LOD to 10 times the LOQ. If necessary, additional standards may be added to extend the calibration curve.
 - a. Add known amounts of analytes to carbon disulfide solvent in 10-mL volumetric flasks and dilute to the mark. Prepare additional standards by serial dilution in 10-mL volumetric flasks.
 - b. Analyze together with samples and blanks (steps 11 through 12).
 - c. Prepare calibration graph (peak area of analyte vs. μ g analyte per sample).

9. Determine desorption efficiency (DE) at least once for each batch of charcoal used for sampling in the calibration range (step 8).
 - a. Prepare three tubes at each of five levels plus three media blanks.
 - b. Inject a known amount of DE stock solution (5 to 25 μL) directly onto front sorbent section of each charcoal tube with a microliter syringe.
 - c. Allow the tubes to air equilibrate for several minutes, then cap the ends of each tube and allow to stand overnight.
 - d. Desorb (steps 5 through 7) and analyze together with standards and blanks (steps 11 and 12).
 - e. Prepare a graph of DE vs. μg analyte recovered.
10. Analyze a minimum of three quality control blind spikes and three analyst spikes to insure that the calibration graph and DE graph are in control.

MEASUREMENT:

11. Set gas chromatograph according to manufacturer's recommendations and to conditions given on page 1501-1. Inject a 1- μL sample aliquot manually using the solvent flush technique or with an autosampler.
 Note: If peak area is above the linear range of the working standards, dilute with solvent, reanalyze, and apply the appropriate dilution factor in the calculations.

Analyte	Approximate Retention Time (min)
benzene ^a	3.52
toluene ^a	6.13
ethylbenzene ^a	10.65
<i>o</i> -xylene ^a	12.92
<i>m</i> -xylene ^a	11.33
<i>p</i> -xylene ^a	11.04
cumene ^b	18.61
<i>p</i> -tert-butyltoluene ^b	21.45
α -methylstyrene ^b	19.99
β -methylstyrene ^b	20.82
styrene ^b	18.33

^a Separation achieved using a 30-m Stabilwax fused silica capillary column.

^b Separation achieved using a 30-m Rtx-35 fused silica capillary column.

12. Measure peak areas.

CALCULATIONS:

13. Determine the mass, μg (corrected for DE) of analyte found in the sample front (W_f) and back (W_b) sorbent sections, and in the average media blank front (B_f) and back (B_b) sorbent sections.
 NOTE: If $W_b > W_f/10$, report breakthrough and possible sample loss.
14. Calculate concentration, C , of analyte in the air volume sampled, V (L):

$$C = \frac{(W_f + W_b - B_f - B_b)}{V}, \text{mg} / \text{m}^3$$

NOTE: $\mu\text{g/L} = \text{mg/m}^3$

EVALUATION OF METHOD:

The desorption efficiency, at levels ranging from 5 times the LOQ to 0.1x the REL, was determined for each analyte by spiking known amounts (in CS₂) on coconut shell charcoal tubes. Both groups of analytes (A and B) were spiked together on the charcoal sorbent tubes. All analytes, with the exception of styrene and naphthalene, exhibited acceptable desorption efficiency recovery results at all five levels evaluated. Styrene failed to meet the 75% recovery criteria at the 18.1 µg and 90.6 µg levels. Naphthalene failed to meet the 75% criteria at all levels evaluated ranging from 48.8 µg to 976.0 µg.

Each analyte, at a level approximately 0.05x REL/PEL, was evaluated for its storage stability @ 5°C after 7, 14, and 30 days. All analytes, with the exception of naphthalene, had acceptable recoveries after 30 days storage.

REFERENCES:

- [1] NIOSH [1984]. Hydrocarbons, Aromatic: Method 1501. In: Eller PM, ed. NIOSH Manual of Analytical Methods. 4th rev. ed. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health, DHHS (NIOSH) Publication No. 94-113.
- [2] NIOSH [1977]. NIOSH Manual of Analytical Methods, 2nd. ed., V. 1, P&CAM 127, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Publ. (NIOSH) 77-157-A.
- [3] Ibid, V. 2, S22, S23, S25, S26, S29, S30, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Publ. (NIOSH) 77-157-B (1977).
- [4] Ibid, V. 3, S292, S311, S318, S343, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Publ. (NIOSH) 77-157-C (1977).
- [5] NIOSH [1977]. Documentation of the NIOSH Validation Tests, S22, S23, S25, S26, S29, S30, S292, S311, S318, S343, U.S. Department of Health, Education, and Welfare; Publ. (NIOSH) 77-185.

METHOD WRITTEN BY:

Stephanie M. Pendergrass, NIOSH/DART

TABLE 1. SYNONYMS, FORMULA, MOLECULAR WEIGHT, PROPERTIES

Name/Synonyms	Empirical Formula	Molecular Weight	Boiling Point (°C)	Vapor Pressure @ 25 °C (mm Hg)	(kPa)	Density @ 20 °C (g/mL)
benzene CAS #71-43-2 RTECS CY1400000	C ₆ H ₆	78.11	80.1	95.2	12.7	0.879
<i>p</i> -tert-butyltoluene CAS #98-51-1 RTECS XS8400000 1-tert-butyl-4-methylbenzene	C ₁₁ H ₁₆	148.25	192.8	0.7	0.09	0.861
cumene CAS #98-82-8 RTECS GR8575000 isopropylbenzene	C ₉ H ₁₂	120.20	152.4	4.7	0.63	0.862
ethylbenzene CAS #100-41-4 RTECS DA0700000	C ₈ H ₁₀	106.17	136.2	9.6	1.28	0.867
α -methylstyrene CAS #98-83-9 RTECS WL5075300 isopropenylbenzene (1-methylethenyl)-benzene	C ₉ H ₁₀	118.18	165.4	2.5	0.33	0.909
β -methylstyrene CAS #873-66-5 RTECS DA8400500	C ₉ H ₁₀	118.18	175.0	—	—	0.911
toluene CAS #108-88-3 RTECS XS5250000 methylbenzene	C ₇ H ₈	92.14	110.6	28.4	3.79	0.867
xylene ^a CAS #1330-20-7 RTECS ZE2100000 dimethylbenzene (<i>p</i> -xylene)	C ₈ H ₁₀ (<i>ortho</i>) (<i>meta</i>) (<i>para</i>)	106.17	144.4 139.1 138.4	6.7 8.4 8.8	0.89 1.12 1.18	0.880 0.864 0.861
styrene CAS #100-42-5 RTECS WL3675000 vinylbenzene	C ₈ H ₈	104.15	145.2	6.1	0.81	0.906

TABLE 2. PERMISSIBLE EXPOSURE LIMITS, PPM

Substance	OSHA TWA	NIOSH			ACGIH		mg/m ³ per ppm
		TWA	C	STEL	TLV	STEL	
benzene	1	0.1 ^a	1		10 ^b		3.19
<i>p</i> - <i>tert</i> -butyltoluene	10	10		20	1		6.06
cumene	50 (skin)	50 (skin)			50 (skin)		4.91
ethylbenzene	100	100		125	100	125	4.34
α -methylstyrene	100	50		100	50	100	4.83
β -methylstyrene	100	50		100	50	100	4.83
toluene	200	100		150	50 (skin)		3.77
<i>o</i> -xylene	100	100 ^c		150	100	150	4.34
<i>m</i> -xylene	100	100			100	150	4.34
<i>p</i> -xylene	100	100			100	150	4.34
styrene	100	50		100	50	100 (skin)	4.26

^a Potential carcinogen

^b Suspect carcinogen

^c Group I Pesticide

TABLE 3. SAMPLING FLOWRATE^a, VOLUME, CAPACITY, RANGE, OVERALL BIAS AND PRECISION

Substance	Sampling		Breakthrough		Range at VOL-MIN (mg/m ³)	Overall		Accuracy (±%)
	Flowrate (L/min)	Volume ^b (L) MIN MAX	Volume @ Concentration (L) (mg/m ³)			Bias (%)	Precision (%)	
benzene	<0.20	5 30	>45 149	42 - 165	-0.4	0.059	11.4	
<i>p</i> - <i>tert</i> -butyltoluene	<0.20	1 29	44 112	29 - 119	-10.3	0.07 ^c	20.7	
cumene	<0.20	1 30	>45 480	120 - 480	5.6	0.059	15.2	
ethylbenzene	<0.20	1 24	35 917	222 - 884	-7.6	0.08 ^c	17.1	
α -methylstyrene	<0.20	1 30	>45 940	236 - 943	-7.6	0.06 ^c	16.9	
β -methylstyrene	<0.20	1 30	>45 940	236 - 943	-7.6	0.06 ^c	16.9	
toluene	<0.20	1 8	12 2294	548 - 2190	1.6	0.052	10.9	
xylene (<i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -)	<0.20	2 23	35 870	218 - 870	-1.2	0.060	12.2	
styrene	≤1.00	1 14	21 1710	426 - 1710	-7.9	0.05 ^c	16.7	

^a Minimum recommended flow is 0.01 L/min.

^b V_{min} = minimum sample volume @ OSHA TWA;

^c V_{max} = maximum sample volume @ OSHA TWA

^c Corrected value, calculated from data in Reference 5.

TABLE 4. MEASUREMENT RANGE AND PRECISION^a

Substance	LOD ($\mu\text{g}/\text{sample}$)	Measurement	
		Range (mg)	Precision (%)
benzene	0.5	0.004-0.35	0.013
p-tert-butyltoluene	1.1	0.013-1.09	0.017 ^a
cumene	0.6	0.039-3.46	0.017
ethylbenzene	0.5	0.045-8.67	0.015
α -methylstyrene	0.6	0.036-3.57	0.014
β -methylstyrene	0.6	0.036-0.728	0.014
toluene	0.7	0.024-4.51	0.022
o-xylene	0.8	0.044-10.4	0.014
m-xylene	0.8	0.043-0.864	0.013
p-xylene	0.7	0.043-0.861	0.015
styrene	0.4	0.181-8.49	0.014

^a Corrected value, calculated from data in [5].

Índice Geral de Apêndices

Apêndice I – Questionários aos trabalhadores

Apêndice II – Termo de Consentimento Informado

Apêndice I – Questionários aos trabalhadores

QUESTIONÁRIO

O presente questionário foi realizado no âmbito do estudo da “Avaliação da exposição a misturas numa indústria química”, que tem como objetivo avaliar a exposição ocupacional ao xileno e estireno na Resiquímica.

SECÇÃO I – IDENTIFICAÇÃO

1.1. Idade: _____ anos

1.2. Nome: _____
(Apenas para identificação da exposição)

SECÇÃO II – HISTORIAL SOCIAL

2.1. Carga tabágica

- Fuma ou alguma vez fumou? Sim Não

- Se sim, com que idade começou a fumar regularmente? _____ anos

- Continua a fumar? Sim Quantos cigarros por dia? _____
Não Quando parou de fumar? _____

2.2. Consumo de álcool

Com que frequência consome álcool? _____

Qual a quantidade que consome? _____

Secção III – Suscetibilidade individual

3.1. Toma alguma medicação? Sim Não

3.1.1 Se sim, qual? _____

3.2. Fez algum tratamento de quimioterapia ou radioterapia? Sim Não

3.2.1. Se sim, há quanto tempo? _____ (meses ou anos).

3.3. Toma algum suplemento alimentar?

Sim Não

Se sim, quais? _____

Secção IV – Tempos livres

Que tipo de atividades desenvolve para além da sua atividade profissional?

Obrigada!

Apêndice II – Termo de Consentimento Informado

Termo de Consentimento Informado

O estudo da “Avaliação da exposição a misturas numa indústria química” tem como objetivo avaliar a exposição ocupacional ao xileno e estireno, em colaboradores de uma indústria química, através de monitorização ambiental e biológica, bem como investigação de potenciais efeitos genotóxicos com o propósito de conhecer os possíveis efeitos sobre a saúde dos trabalhadores e minimizar a exposição as substâncias referidas anteriormente.

De forma a concretizar os nossos objetivos, pretendemos recolher amostras de urina e sangue periférico de indivíduos expostos profissionalmente a xileno e estireno.

Eu, _____
(nome completo), dou o meu consentimento livre e informado, para participar na realização da colheita acima referidas, autorizando posterior uso e publicação dos dados. E ainda que:

- Assisti à sessão de esclarecimento acerca da execução do estudo;
- De acordo com as explicações que me foram prestadas, fui informado que me será colocado um coletor de ar portátil sobre o peito, durante a realização de determinadas tarefas, e serão realizadas colheitas de urina e sangue para posterior tratamento e doseamento do xileno e estireno;
- Se pretender, irei receber uma cópia dos resultados das minhas análises de ar e urina, realizadas no âmbito deste estudo;
- Tive oportunidade de colocar questões sobre o estudo e esclarecer as minhas dúvidas, no decorrer da sessão e no período após a mesma, ao longo de todo o decorrer do estudo;
- Se tiver alguma dúvida poderei esclarecê-la a qualquer altura com a responsável do projeto, Márcia Meneses;
- Compreendi que a minha participação neste estudo é voluntária, podendo desistir do estudo, se o desejar, sem ter que dar qualquer explicação e sem qualquer repercussão em relação a qualquer vertente da minha atividade laboral.

Obrigada pela atenção e disponibilidade.

Assinatura do Trabalhador:

Data: ____/____/____

Assinatura do Investigador Responsável:

Data: ____/____/____

(Nota: O presente formulário de consentimento informado é composto apenas pela presente página).