

Um Ensaio Sobre o Efeito Toxicológico e Comportamental do Hexano em Não-Humanos: Exemplificando com alguns Testes Comportamentaisⁱ

**An Essay on the Toxicological and Behavioral Effect of Hexane in Non-Humans:
Examples with some Behavioral Tests**

André Amaral Bravin¹

Lucas Codina de Souza²

David Alan Eckerman³

Diane Schertler Rohlman⁴

Lincoln da Silva Gimenes (in memoriam)⁵

Resumo

O n-hexano é um químico industrial relativamente comum e empregado em diversos produtos e processos industriais. A compreensão de aspectos toxicológicos é um importante fator para o manejo da higiene industrial, a fim de evitar o risco de contaminação com o solvente. Este trabalho é um ensaio que busca caracterizar os aspectos toxicocinéticos, toxicodinâmicos e a descrição dos efeitos do solvente sobre o comportamento de animais, em alguns métodos utilizados para essas avaliações (i.e., Bateria de Observação Funcional, Campo Aberto, Rotarod, Avaliação Automatizada do Movimento de Patas Traseiras, Titulação da Força de

¹ Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica de Ciências Humanas e Letras, Curso de Psicologia, Laboratório de Processos Psicológicos Básicos – Jataí, GO (Brasil). Professor da Graduação em Psicologia da Universidade Federal de Goiás. Doutor em Ciências do Comportamento pela Universidade de Brasília. E-mail: andrebravin@yahoo.com <http://orcid.org/0000-0002-5910-3050>

² Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica de Ciências Humanas e Letras, Curso de Psicologia, Laboratório de Processos Psicológicos Básicos – Jataí, GO (Brasil). Pós-Graduando do mestrado em Psicologia da Universidade Federal de São Carlos. Psicólogo pela Universidade Federal de Goiás. <http://orcid.org/0000-0002-4245-1622>

³ The University of North Carolina, College of Arts and Sciences, Department of Psychology – Chapel Hill, NC (Estados Unidos da América). Professor Emeritus da graduação e pós-graduação da The University of North Carolina. PhD em Psicologia pela Columbia University. <http://orcid.org/0000-0003-1144-4240>

⁴ The University of Iowa, College of Public Health, Department of Occupational & Environmental Health – Iowa City, IA (Estados Unidos da América). Professora da graduação e pós-graduação da The University of Iowa. PhD em Occupational Health Sciences pela Oregon Health and Science University. <http://orcid.org/0000-0002-6697-1577>

⁵ Universidade de Brasília, Instituto de Psicologia, Departamento de Processos Psicológicos Básicos – Brasília, DF (Brasil). PhD em Toxicologia Comportamental pela Oregon Health and Science University.

Resposta). Estudos de toxicologia comportamental com animais evidenciam os prejuízos motores e neurocomportamentais advindos da contaminação crônica ou aguda pelo hexano, e no que tange ao cenário aplicado, ações de prevenção devem ser tomadas.

Palavras-chave: Toxicologia; Toxicologia Comportamental; Hexano; Testes Neurocomportamentais; Análise do Comportamento.

Abstract

The n-hexane is a common solvent widely used in industrial products and processes. Toxicological understanding is an important way to deal with industrial hygiene to avoid the hazards of hexane exposure. This essay aims to characterize toxicokinetic, toxicodynamic and also describes hexane effects upon animal behavior in some research methods used in these behavioral evaluations (i.e., Functional Observational Battery, Open Field, Rotarod, Automated Hindlimb Movement, and Response Force Titration). Animal studies have shown neurobehavior and motor impairment related to acute or chronic exposure to hexane, and to avoid hazards, prevention actions should be taken.

Keywords: Toxicology; Behavioral Toxicology; Hexane; Neurobehavioral Tests; Behavior Analysis.

Introdução

O hexano (C_6H_{14}) é um solvente orgânico líquido, incolor, altamente volátil, inflamável, explosivo, pouco hidrossolúvel, muito lipossolúvel e solúvel na maioria dos solventes orgânicos (DeCaprio, 2000; Joshi & Adhikari, 2019; Li, Jiang, Yu, Li, Wang, Liu & Xie, 2020; NIOSH, 1983; WHO, 1991) (ver Tabela 1). Seu odor é característico, e a concentração atmosférica para a obtenção de um valor para o limiar de odor varia em função da pureza da substância e sua forma de exposição.

A solução pura concentra entre 95 e 99,5% de hexano, com pequenas quantias de seus isômeros e outras impurezas (Leite, 2008; Petrobras, 2011; WHO, 1991). Em geral, o hexano comercial varia sua concentração entre 20 e 80%, sendo predominantemente uma mistura de isômeros da substância, e compostos relacionados ao 6-carbono, dentre os quais: 2-metilpentano; 3-metilpentano; 2,3-dimetilbutano; ciclohexano; metil ciclopentano; acetona; metil etilcetona; diclorometano; tricloroetileno e isômeros de pentano e heptano (DeCaprio, 2000; NIOSH, 1983; WHO, 1991).

De modo geral, os solventes têm ampla aplicação. Sua propriedade dispersante (que favorece a limpeza de gordura em distintos materiais) e alta volatilidade (que permite uma fácil remoção) favorecem sua utilização em produtos e processos industriais e ocupacionais (Dekant & Anders, 2008; Joshi & Adhikari, 2019; Li et al., 2020). O hexano é, naturalmente, encontrado no gás natural e no petróleo bruto, de onde é refinado para futuro uso, quer seja isoladamente (solvente único) ou como componente em outras substâncias (Dekant & Anders, 2008; Leite, 2008; NIOSH, 1983; WHO, 1991). Em geral faz parte de produtos como: colas para calçados, colas adesivas, lacas, tintas e seus solventes, solventes poliolefinas, solvente para polimerização e amaciamento de borracha, químico laboratorial e industrial, agentes de limpeza específicos como tiner e limpadores, produtos como gasolina e subprodutos de sua queima (liberada pelos escapamentos de veículos). Como parte de processos ocupacionais e industriais, o hexano pode ser empregado para: limpeza e desengorduramento de produtos metálicos, extração de óleo vegetal, fabricação de borrachas, pneus e plásticos, laminação de materiais plásticos, impressão, pintura, fabricação de móveis, limpeza a seco de têxteis, fabricação de termômetros de baixa temperatura, na produção farmacêutica, cosmética, têxtil, química e petroquímica. De modo geral, solventes derivados de petróleo com baixo ponto de ebulição, contém alta proporção de hexano (Cardona e cols., 1996; DeCaprio, 2000; Dekant & Anders, 2008; Ikeda, Katakura, Kishi & Miyake, 1993; Joshi & Adhikari, 2019; Li et al., 2020; NIOSH, 1983; Sanagi, Seki, Sugimoto & Hirata, 1980; WHO, 1991).

Tabela 1. *Propriedades Físicas, Químicas e Toxicocinéticas do n-Hexano*

Propriedade	Valores (WHO, 1991)	Valores (Petrobras, 2011)
Ponto de fusão (°C)	-95,35	-96
Ponto de ebulição (°C) a (760 mm Hg)	68,74	68
Viscosidade (25 °C)	-----	0,45 cSt
Densidade relativa (20 °C/4 °C) g/cm ³	0,66	0,67
Pressão de vapor	20 kPa (150 mm Hg) a 25 °C	0,42 kgf/cm ² a 37,8 °C
Densidade de vapor	2,97	2,9
Taxa de Evaporação (Acetato de n-Butila = 1)	-----	6
Temperatura de autoignição (°C)	225	225
Limites inferior e superior de inflamabilidade / explosividade no ar (% por volume)	1,1 – 7,5	1,2 – 6,9
Flash point (°C)	-21,7	-----
Ponto de Fulgor (vaso fechado) / Closed-cup flash point (°C)	-30,56	-35
Solubilidade em água (mg/l à 25 °C)	9,5	-----
Coefficiente de partição n-octanol/água	3,6 (log P _{ow} à 25 °C)	3,9 (log kow)
Índice de refração (20 °C)	1,37	-----
Color, Saybolt	+ 39	-----
Meia-vida atmosférica	2 – 2,4 dias	-----

----- Valores não informados

Este artigo é um ensaio que tem por objetivo apresentar os aspectos toxicocinéticos e toxicodinâmicos do hexano, além de descrever três testes comportamentais empregados em pesquisas com animais não humanos a fim de avaliar sua toxicidade sobre o comportamento (i.e., Toxicologia Comportamental). Visto a importância do hexano como químico industrial, compreender os efeitos da exposição ao solvente possibilita esclarecer suas possíveis consequências à saúde, e os três testes comportamentais de toxicologia comportamental apresentados são uma alternativa para a avaliação funcional da integridade do Sistema Nervoso. O ensaio aqui realizado pode favorecer a ideação de futuras pesquisas que se debrucem sobre o tema, além de gerar conscientização quanto à importância desse debate em vistas a melhorias na higiene industrial para a prevenção de problemas.

Toxicocinética & Toxicodinâmica

A exposição aos solventes orgânicos e seu potencial risco tóxico é influenciada pelas propriedades físico-químicas da substância (e.g., lipossolubilidade, pressão de vapor, densidade de vapor), fatores fisiológicos (e.g., frequência cardiorrespiratória, estado hormonal, estado patológico), individuais (e.g., idade, peso, sexo, dieta, ingestão de substâncias lícitas ou não) e condições ambientais (e.g., temperatura, duração) de exposição dos organismos (DeCaprio,

2000; Eckert & Muller, 2008; Leite, 2008). De modo geral, a principal via de exposição aos solventes é a pulmonar, cutânea ou oral (quando ocorre ingestão de alimento/água contaminados), destacando-se a primeira (DeCaprio, 2000; Dekant & Anders, 2008; Eckert & Muller, 2008; Joshi & Adhikari, 2019; Leite, 2008; WHO, 1991). Nesse caso, a inalação de solventes volatilizados atinge os alvéolos pulmonares, e esses entram em contato com o sangue capilar, sendo então absorvidos se forem lipofílicos e distribuído pelo corpo.

A absorção transdérmica do hexano é restrita (com exposição crônica, cerca de 0,83 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$ é absorvido pela pele íntegra, cf. Leite, 2008), mas quando ocorre o contato com a camada epidérmica da pele, os solventes orgânicos removem lípidos da mesma, o que explica as irritações e lesões advindas desse tipo de exposição. Por seu turno, essas lesões favorecem a absorção dos próprios solventes (Dekant & Anders, 2008; Leite, 2008). Na absorção transdérmica do hexano, o pico plasmático ocorre após 1 hora de exposição, declinando rapidamente no período restante (Leite, 2008). A intoxicação por via oral, com hexano, é bastante rara (WHO, 1991). É importante distinguir a intoxicação aguda de uma intoxicação crônica de solventes. A exposição aguda a solventes orgânicos, em geral, causa uma depressão reversível do Sistema Nervoso Central (SNC), enquanto a exposição crônica de baixas doses pode resultar em degeneração de nervos periféricos (Eckert & Muller, 2008).

O hexano, quando inalado por mamíferos, é rapidamente absorvido pelo sangue e amplamente distribuído pelo corpo e tecido fetal (o solvente atravessa facilmente a barreira placentária e, por essa razão, o sangue fetal possui concentrações do solvente semelhantes às encontradas no sangue materno). Sua distribuição ocorre dos tecidos mais vascularizados para os tecidos de eliminação (fígado e rins) e tecido adiposo (Leite, 2008). Sua distribuição e excreção são bifásicas, isto é, o solvente deixa rapidamente a corrente sanguínea (fase α com $t_{1/2}$ de cerca de 12 a 36 minutos) e, à medida que o equilíbrio nos tecidos é alcançado, a saída do solvente da corrente sanguínea torna-se mais lenta (fase β com $t_{1/2}$ de 1,5 a 4 horas). O hexano tem afinidade por tecidos que apresentam elevado conteúdo lipídico (e.g., cérebro) e, no tecido adiposo, sua concentração se aproxima à capacidade máxima desse tecido em solubilizar o solvente (Leite, 2008; WHO, 1991). A maior parte do hexano inalado é excretado de forma inalterada pelo ar exalado e, embora uma pequena parte dos metabólitos possam ser encontrados no ar exalado, sua principal via de excreção é a urina (DeCaprio, 2000; WHO, 1991).

O efeito neurotóxico do hexano pode ser estrutural e/ou funcional. Quando estrutural, pode ocorrer no corpo celular (neuropatia), axônio (axonopatia) ou especificamente na mielina

(desmielinização). Quando funcional, pode modificar o funcionamento da neurotransmissão, sem necessariamente gerar danos estruturais ao sistema nervoso (Blake, 2004; Eckert & Muller, 2008). Investigações posteriores apontaram que o efeito neurotóxico do n-hexano era, na verdade, uma propriedade de um de seus metabólitos, o 2,5-hexanodiona (Boekelheide, 1987; Cardona et al., 1996; DeCaprio, 2000; Ikeda et al., 1993; Leite, 2008; Li et al., 2020; Weiss, 1983; WHO, 1991), embora outros metabólitos, como a 2,5-hexanodiol e a 2-hexanona tenham gerado edema axonal generalizado, danos severos no trato óptico e degeneração axonal em fibras longas e de maior diâmetro (WHO, 1991).

Dekant e Anders (2008) sugerem que quatro tipos de efeitos tóxicos podem ser distinguidos por exposição a solventes lipofílicos: (a) A exposição aguda em alta concentração via inalação, que gera rápida distribuição no organismo, resultando em altas concentrações no SNC, promovendo narcose (i.e., desorientação, euforia, vertigem, paralisia), dentre outros acometimentos (convulsões e eventual morte por parada cardíaca ou respiratória). Alguns desses efeitos são reversíveis após remoção da exposição. (b) A exposição ocupacional em limites superiores aos padrões aceitáveis, que geram reações no SNC (parestesia, déficits visuais ou auditivos, perda de memória, irritabilidade, comportamento compulsivo, perda de coordenação e fadiga), detectáveis em testes comportamentais de toxicidade. (c) A exposição crônica, que revela toxicidade em vários órgãos ou sistemas. Essa toxicidade é variável em função das substâncias químicas, pois afetarão diferentes órgãos-alvo, dada a biotransformação de seus metabólitos tóxicos. E, (d) a exposição da pele, trazendo conseqüente irritação, hiperplasia celular, edema e outros danos à pele. Esses danos podem aumentar a taxa de penetração de outros componentes, quando em contato com a pele.

Foi observada que a ação do hexano é majoritariamente sobre o axônio e a desmielinização produzida por ele é secundária ao efeito axonopático. Seu efeito sobre o axônio deixa o corpo celular intacto mas, quando o axônio progressivamente degenera, a mielina também é destruída (Blake, 2004). Hipóteses explicam que a axonopatia induzida pelo hexano deriva de um comprometimento do sistema metabólico da célula. Em síntese, a 2,5-HD reage com organelas intracelulares formando pirroles. A ligação cruzada entre esses pirroles e neurofilamentos pirrole-dependentes dificultam o transporte proteico intracelular, dado o estreitamento de regiões do axônio. Assim, um acúmulo de proteínas em uma região de constrição resulta na axonopatia (Dekant & Anders, 2008; Li et al., 2020; Weiss, 1983). Esse comprometimento gera, em primeiro lugar, uma degeneração da porção distal do axônio, visto que essa região é mais dependente dos mecanismos axonais de transporte energético (DeCaprio,

2000; Eckert & Muller, 2008; Weiss, 1983). Se a exposição persistir, a degeneração progredirá para as partes mais proximais e, eventualmente, afetará toda a célula (Blake, 2004; DeCaprio, 2000). Essa degeneração distal-proximal é chamada de neuropatia retrógrada. Cabe salientar que essa é considerada uma reação morfológica comum após a exposição crônica ou subaguda a várias substâncias químicas industriais, não só ao hexano (Blake, 2004; Eckert & Muller, 2008; DeCaprio, 2000; WHO, 1991). Essa degeneração axonal retrógrada inicia-se da porção distal do nervo, avança gradualmente para o centro com as fibras mielinizadas mais longas e maiores, degenerando-se antes das fibras menores e mais curtas (Blake, 2004; DeCaprio, 2000; Eckert & Muller, 2008; Elsner, Fellmann & Zbinden, 1988). Portanto, em fases mais tardias de exposição, fibras mielinizadas curtas e fibras não mielinizadas também são afetadas pelo hexano (WHO, 1991). Nas axonopatias, as perdas sensoriais tendem a preceder a perda na função motora, e a perda do reflexo patelar é um indicador precoce de axonopatia (Eckert & Muller, 2008).

Sintomas como dor de cabeça e tontura podem anteceder ou coincidir com a neuropatia. Além da dor de cabeça, a exposição aguda provoca náuseas, perturbações visuais e auditivas e desinibição comportamental. A continuidade da exposição pode gerar depressão moderada, seguida da falta de coordenação motora, confusão mental e eventual perda de consciência. O período de exposição que antecede uma clara neuropatia pode variar entre 2 meses e 5 anos, dependendo das condições de exposição e uma neuropatia leve pode ser assintomática (WHO, 1991). A exposição crônica gera, na maioria dos casos, redução do peso corporal e diminuição ou ausência de reflexos. Em caso de ingestão, pode causar vômitos, diarreia e efeito narcotizante.

A depender das condições de exposição ao solvente, as células de Schwann podem sobreviver e conduzir uma regeneração axonal (Blake, 2004; DeCaprio, 2000), e se a exposição ao agente for descontinuada antes da morte do axônio, axônios do sistema nervoso periférico irão se regenerar (Blake, 2004; DeCaprio, 2000). Entretanto, a regeneração axonal de células do sistema nervoso central é muito pequena ou não ocorre (Eckert & Muller, 2008; DeCaprio, 2000). A recuperação pode durar meses, anos ou nunca ocorrer completamente mas, quando ocorre, as funções são restabelecidas ao inverso da ordem com o que se deu a perda (DeCaprio, 2000).

Segurança do trabalho

No Brasil, o único fabricante de hexano é a Petrobras®. Segundo a Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ) do fabricante, 97% da solução é a própria substância, enquanto os 3% restantes são compostos por outros hidrocarbonetos insaturados e o benzeno (< 0,10% do volume) (Petrobras, 2011).

Por ser nocivo e perigoso, ambientes ocupacionais que fazem uso desta substância devem atender às exigências arquitetônicas (e.g., ventilação exaustora, aterramento de elementos condutores, estocagem do hexano em local com solo impermeabilizado e com dique de contenção; em locais onde o produto é manipulado, devem-se conter chuveiros e lava-olhos de emergência).

Não existe terapêutica específica para casos de neuropatia induzida por hexano. Quando a intoxicação ocorre, recomenda-se a remoção da pessoa da exposição e o emprego de medidas de suporte, tal como a fisioterapia (DeCaprio, 2000). A recuperação dos sintomas depende dos parâmetros da exposição e pode ser completa ou parcial. Essa recuperação sempre é gradual e lenta e, em casos severos, sinais residuais de neuropatia podem persistir por 2 a 5 anos em humanos (DeCaprio, 2000; WHO, 1991).

No Brasil, o Ministério do Trabalho e Emprego é responsável por legislar quanto à segurança e saúde dos trabalhadores expostos ao hexano. A Norma Regulamentadora número 7 (NR7) estabelece a obrigatoriedade do monitoramento biológico semestral dos trabalhadores expostos ao hexano, por meio da análise urinária do 2,5-HD ao final do último dia da jornada de trabalho. Parece não existir valor de referência do 2,5-HD urinária no Brasil. Entretanto, alguns países encontraram valores basais na faixa de 0,12 a 0,98 mg/l, provavelmente resultante da micro poluição ambiental ou da produção endógena do hexano (e.g., processos de peroxidação lipídica) (Brasil, 2013; Leite, 2008)

Entretanto, a NR15 do Ministério do Trabalho e Emprego não inclui o hexano entre os agentes químicos de monitoramento ambiental regular (Brasil, 2014). Nesses casos, a NR9 define que, na ausência desses valores de referência, os valores limites de exposição ocupacional da *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) devem ser adotados (Brasil, 2014).

A ACGIH é uma associação científica não governamental, privada e sem fins lucrativos, composta por profissionais de segurança do trabalho e higienistas ocupacionais. Comissões da ACGIH analisam e compilam dados referentes a níveis de exposições de vários agentes físico-químicos encontrados em ambiente ocupacional. Anualmente, a ACGIH publica os valores-

limite (Threshold Limit Values – TLVs) e os índices de exposição biológica (Biological Exposure Indices – BEIs) para facilitar a tomada de decisão em relação aos níveis seguros de exposição a esses agentes (Dekant & Anders, 2008).

Entretanto, os TVLs estabelecidos pela ACGIH não possuem valor legal nos EUA. Os valores limite de exposição ocupacional (Permissible Exposure Limits - PEL) que possuem valor legal, são definidos pela Administração de Segurança e Saúde Ocupacional (OSHA) do Departamento de Trabalho dos Estados Unidos (Dekant & Anders, 2008).

A NIOSH (National Institute of Occupational Safe and Health) também estabelece valores de exposição que não devem ser excedidos em nenhum momento (*Immediately Dangerous to Life and Health*), sendo 17.600 mg/m^3 (5.000 ppm) o parâmetro adotado, pois diz respeito à Concentração Letal do hexano (CL 50) em humanos para um intervalo de 10 minutos (NIOSH, 2013; Petrobras, 2011). Em ratos adultos, a CL 50 varia em torno de 271.040 mg/m^3 (77.000 ppm) para o período de uma hora de exposição. Já a Dose Letal (via oral) da substância (LD 50), em ratos adultos, varia entre 15.000-30.000 mg/kg (Petrobras, 2011; WHO, 1991).

Toxicologia Comportamental

A neurotoxicidade é descrita a partir do efeito adverso de toxicantes sobre a estrutura e/ou função do sistema nervoso e a disciplina que se ocupa desses estudos é a Neurotoxicologia. Toxicologia Comportamental refere-se às consequências funcionais da toxicidade, como o efeito de toxicantes, sobre os comportamentos. Portanto, investigam-se relações entre agentes tóxicos e processos comportamentais como a função psicomotora e sensoriais, a atenção, memória e percepção viso espacial, assim como processos relacionados à personalidade e o humor, ou ainda alterações eletrofisiológicas (Blake, 2004; Seeber, 2008). Pesquisas nesta área mostram que existem efeitos não observados no sistema nervoso que podem se seguir de efeitos comportamentais (Boekelheide, 1987). As investigações em toxicologia comportamental voltam-se para as consequências funcionais da toxicidade, e o comportamento é tido como indício de um efeito tóxico, tendo como complemento às informações de outras avaliações quanto ao mecanismo tóxicos dos toxicantes (Seeber, 2008).

Pesquisas com Animais

Muitos neurotoxicantes têm sido apontados como responsáveis por afetar componentes da atividade motora (e.g., equilíbrio, movimento, coordenação motora, força, marcha), dentre

os quais está o hexano (Cory-Slechta, 1989; DeCaprio, 2000). Para avaliar esses diferentes componentes, distintos testes e aparatos são utilizados. Algumas dessas tecnologias serão aqui descritas, a saber: a “*Functional Observational Battery*” – FOB, o Campo Aberto, o “*Rotarod*”, a “*automated hindlimb movement*” (avaliação automatizada do movimento de patas traseiras) e a “*response force titration*” (titulação da força da resposta). Todas essas avaliações (ver Cory-Slechta, 2008 para maior detalhamento) são alternativas comportamentais para análise do efeito tóxico sobre diferentes componentes do comportamento motor, e permitem o estudo de sinais autonômicos, motores e sensoriais que – em conjunto – favorecem uma compreensão global das propriedades da função motora.

A FOB foi utilizada para investigar efeitos da administração intraperitoneal de 2,5-HD (98%), em doses de 150, 225 ou 350 mg/kg, por dia, por 28 doses. Várias alterações comportamentais foram observadas, particularmente naquelas tarefas que testavam as funções motoras (e.g., nível de atividade do animal, marcha, reflexos, força de apreensão das patas traseiras). Isso ocorreu logo após uma semana de exposição e se intensificou com o passar do tempo (Shell, Rozum, Jortner & Elrich, 1992). Outros componentes da atividade motora também são avaliados com outros modelos animais e protocolos de observação específicos. Por exemplo, Li, Jiang, Yu, Li, Wang, Liu e Xie (2020) avaliaram a deambulação de ratos expostos por via oral a diferentes concentrações de hexano (controle, 0,5; 1,0; 2,0 e 4 g/kg dia) dissolvido em olho de milho, ao longo de 24 dias. Dentre outros, o objetivo do estudo era observar a recuperação dos prejuízos induzidos pela exposição ao toxicante. As avaliações comportamentais ocorreram uma vez por semana quando submetidos ao campo aberto ou rotarod. No campo aberto os animais eram observados por 3 min. e escores de “marcha” eram atribuídos de forma cega ao comportamento do animal. Esses escores variavam entre 1 a 4, sendo 1 a deambulação normal e não afetada, até 4, uma deambulação severamente anormal (andar de pé plano, membros posteriores apoiados na superfície, animal engatinhando ou incapaz de suportar o peso; Li et al., 2020; Wang, Li, Wang, Li, Yin, Jiang, Han, Irving, Zeng & Xie, 2017). No rotarod, os animais – previamente treinados ao equipamento – tinham de permanecer equilibrados durante o aumento suave da velocidade de 0 a 40 rpm em 200 s., e a latência de permanência no equipamento era registrada automaticamente. Como resultados os pesquisadores observaram que as concentrações de 1, 2 e 4 g/kg geraram um aumento, respectivamente, de 12,5%; 100% e 100% no grau de paralisia (índice 4 no campo aberto), atingidos na 14^a, 6^a e 3^a semana de exposição ao hexano. Essa paralisia foi revertida em todos os animais (índice 1 no campo aberto) até a 32^a semana do experimento. A latência do equilíbrio

no rotarod acompanharam a tendência observada no campo aberto, isto é, os grupos expostos a 1, 2 e 4 g/kg apresentaram maior prejuízo dose-dependente, caracterizado pela diminuição da latência quanto maior era o grau de exposição ao toxicante, sendo que em todos os cenários esse prejuízo foi revertido após 29 semanas do experimento. Em conjunto, é possível observar que a FOB, o campo aberto e o rotarod mensuram diferentes propriedades do comportamento motor, sendo medidas complementares na avaliação dessas propriedades do comportamento em animais de laboratório.

Por mais que FOB e Campo aberto favoreçam uma análise do comportamento motor, sua avaliação se dá por observadores treinados, e a transdução humana de um dado sempre coloca em risco a acurácia e fidedignidade da medida comportamental. A automação da coleta dos dados é uma alternativa que elimina possíveis vieses de medida. O “*automated hindlimb movement*” é um procedimento automatizado desenvolvido por Tanger, Vanwersch, e Wolthuis (1984) para diferenciar postura de movimento. Nesse procedimento os pesquisadores mediam o movimento da pata traseira esquerda de ratos na roda de atividade. O sistema detectava a trajetória da pata durante a travessia de um “degrau” ao outro na roda. Assim, os investigadores acessavam vários aspectos do andar, incluindo suas características topográficas (passos curtos corretos; passos longos corretos; passos em falso) e temporais (tempo total de apoio da pata esquerda traseira sobre os degraus da roda, tempo gasto nos pequenos e longos passos corretos, tempo gasto nos passos em falso e na falha em andar). Kulig, Vanwersch e Wolthuis (1985) fizeram a administração oral sub-crônica (3 semanas consecutivas, 5 dias por semana) de diferentes doses (250 e 600 mg/kg e grupo controle) de 2,5-HD em ratos que foram semanalmente avaliados, 24 horas após a última administração, no “*automated hindlimb movement*”. Os resultados demonstraram um prejuízo dose-dependente nos escores de movimentos coordenados para ambos os grupos, quando comparados ao grupo controle, durante as três semanas de tratamento com a 2,5-hexanodiona. Tão logo terminado o tratamento, os escores de movimentos coordenados passaram a se recuperar, e ao final das 8 semanas de experimentação, o grupo 250 mg/kg havia se recuperado, enquanto o 600 mg/kg não chegou a recuperar-se a ponto comparável ao grupo controle.

Os estudos *in vitro*, somados aos estudos com modelos animais e os dados clínicos, sugerem que os primeiros sinais de uma neuropatia induzida por hexano são: alteração de sensibilidade; parestesia simétrica (que pode se manifestar em forma de luva ou meia); fraqueza e redução na força de compressão. As extremidades inferiores geralmente são afetadas

primeiro. Pode ocorrer prejuízo na marcha (ataxia) com eventual progressão para paralisia flácida de membros inferiores e, em quadros muito severos, quadriplegia (WHO, 1991).

Outros estudos corroboram o prejuízo que o hexano tem sobre o comportamento motor em membros inferiores de ratos (Krasavage, O'Donoghue, DiVincenzo e Terhaar, (1980). Paralisia e enfraquecimento severo de membros inferiores, lesão em nervo tibial, edema axonal, remoção de mielina axonal e retração de mielina paranodal são os achados histológicos mais comuns (DeCaprio, 2000; WHO, 1991). Essa desmielinização paranodal é correlacionada com a diminuição da condução dos impulsos elétricos (DeCaprio, 2000), o que é empiricamente sustentado por estudos que apontam uma redução na velocidade de condução do nervo da cauda (Krasavage et al., 1980), após a administração oral e crônica de hexano.

Redução da atividade motora espontânea, diminuição da força de compressão de membros inferiores, redução na habilidade de escalada e diminuição das respostas de esquiva condicionada foram observadas em ratos Fischer-344 machos expostos (por inalação) ao n-hexano (95% puro), a uma concentração de 3520 mg/m³ (1000 ppm), por 24 horas/dia, 5 dias por semana, ao longo de 11 semanas. Houve recuperação de alguns comportamentos após 18 e 36 semanas do término da exposição, respectivamente nas medidas de esquiva condicionada e habilidade de escalada (WHO, 1991).

Ainda nesse sentido, observou-se redução na atividade motora, na resposta de sobressalto, na habilidade de escalada, na resposta de esquiva e na força de compressão em ratos Fischer-344 machos expostos (por inalação) ao n-hexano (95% de pureza), a uma concentração de 7040 mg/m³ (2000 ppm), por 14 h/dia, 7 dias/semana, ao longo de 14 semanas. Medidas eletrofisiológicas indicativas de danos no sistema nervoso periférico (e.g., potencial de ação da cauda, potencial evocado, eletromiografia de membros inferiores) também foram afetados (WHO, 1991).

Ladefoged, Roswall e Larsen (1994) trataram ratos com 0,5% de 2,5-HD dissolvidos em garrafas de água ao longo de seis semanas. Semanalmente, avaliações motoras (deambulação e levantamento no campo aberto; equilíbrio em um rotarod com gradual aumento da aceleração; medidas de força dos membros anteriores e posteriores) eram realizadas. Exames histopatológicos realizados na sexta semana de tratamento revelaram edema axonal e um gradual decréscimo nas medidas comportamentais ocorreu ao longo do tempo. A reversibilidade do efeito neurotóxico foi avaliada e, anterior ao período de 10 semanas, a deambulação no campo aberto foi revertida. Após atingir-se o período de 10 semanas, o efeito foi revertido para os levantamentos (no campo aberto) e equilíbrio no rotarod. Além de

prejuízos motores (tempo para reposição da pata traseira à posição habitual), diminuição no peso também foi observado em ratos Charles River CD expostos (via oral) ao 2,5-HD (98% de pureza), a uma concentração de 1% diluído em água *ad libitum* ao longo de 4 semanas (Weiss, 1983).

O “*response force titration*” é um procedimento desenvolvido por Elsner et al., (1988) para diferenciar alterações na força empregada para uma resposta, dos aspectos motivacionais relativos à mesma. Nesse procedimento ratos são treinados em uma caixa operante a pressionar uma barra (com uma dada força) para receberem reforço. É feita uma técnica de titulação (*titration*) onde a força exigida para pressão à barra em cada sessão experimental é aumentada ou diminuída se a exigência de força na sessão anterior foi, respectivamente, atingida ou não. O critério de sucesso de cada sessão era atendido se o animal obtivesse 50% dos reforços programados. Vários aspectos do desempenho motor podem ser mensurados nessa situação experimental, tais como: força máxima (a maior força que o animal conseguia atingir); força assintótica (reflete o desempenho que o rato consegue sustentar); soma da força (um indicativo da tolerância do rato); taxa de respostas, latência da resposta e duração da resposta, essas três últimas sendo utilizadas para avaliar aspectos motivacionais do desempenho que poderiam indiretamente afetar o comportamento motor. Elsner et al., (1988) expuseram ratos Sprague-Dawley a um tratamento subcrônico (oral via gavagem; concentração de 5ml/kg de água) com 2,5-HD (pureza não informada), a duas doses (250 ou 500 mg/kg) em dias de semana por 14 (grupo 500 mg/kg) ou 23 doses (grupos 250 mg/kg e controle). Os autores observaram efeitos distinguíveis após cerca de 7 doses, perdurando ao longo do experimento, de forma dose-dependente. De maneira geral, enquanto as medidas de força e peso diminuam, as medidas de responsividade permaneceram intactas, sugerindo uma seletividade do agente ao prejuízo motor (e não motivacional). Ademais, a histopatologia mostrou edema axonal nos lados proximais aos nodos de Ranvier, com retração paranodal da mielina no nervo ciático de dois animais (um de cada grupo experimental).

Quanto às pesquisas envolvendo esquemas de reforçamento, o efeito do hexano já foi investigado na esquia sinalizada (Sanagi, Seki, Sugimoto, & Hirata, 1980). Os experimentadores avaliaram o efeito que o hexano (99% de pureza) poderia ter com o tolueno. Para tanto, ratos Wistar foram divididos em três grupos (hexano; tolueno; hexano mais tolueno) e sofreram exposição aguda (via inalação) das substâncias ao longo de 240 minutos, em diferentes concentrações (50, 100, 200, 400 e 800 ppm, em ordem ascendente). Durante a linha de base, os animais apresentavam uma taxa de esquia acima de 80%; a taxa de respostas

também foi avaliada. No que tange ao efeito do hexano, a inspeção visual dos gráficos sugere que, no geral, concentrações entre 100 e 400 ppm, entre 60 e 180 min de exposição, diminuem a taxa de esquia e resposta, retornando gradualmente aos níveis basais entre os minutos 180 a 240 (em forma de U). Na menor concentração avaliada (50 ppm), nos primeiros 60 min., observou-se diminuição na taxa de esquia (mas não na taxa de resposta). A avaliação pós-exposição (quinta hora de experimento 240 – 300 min.) mostra uma diminuição na taxa de esquia sem alteração na taxa de respostas durante todos os 60 min. de avaliação. Alterações comportamentais nas concentrações de 100, 200 e 400 ppm não são claras em termos de tendências. Porém, a exposição a 800 ppm induziu um aumento na taxa de respostas ao longo de toda a exposição. Neste período não existiram alterações estatisticamente significativas nas taxas de esquia. Durante a pós-exposição foi observado um retorno à linha de base. O efeito disruptivo inicial ao hexano, mesmo em baixa concentração, é discutido pelos autores como efeito de irritação das substâncias sobre os olhos, garganta e nariz. Os experimentadores salientam que o efeito observado com 50 ppm, mas não com 100, 200 e 400 ppm, pode ser efeito de primeira exposição ao hexano e concluem que o hexano apresentou um efeito narcótico na concentração de 800 ppm, variável nas doses inferiores pesquisadas.

Uma vez que a exposição ocupacional aos solventes raramente ocorre isolada, trabalhos têm investigado o efeito de outras substâncias e do hexano sobre o organismo. Ikeda et al., (1993) mostraram que, em exposições agudas, o tolueno modifica o efeito neurocomportamental do hexano (concentração de 1.408 mg/m³; 400 ppm) de forma imprevisível e já foi sugerido que existe um efeito desses dois agentes sobre o sistema dopaminérgico (WHO, 1991). Ainda avaliando o efeito de interação, Lam et al., (1991) demonstraram que uma solução de acetona e 2,5-HD podem intensificar os prejuízos produzidos pela 2,5-HD em testes neurocomportamentais (rotarod e campo aberto) e neurofisiológicos. Ademais, observaram que a acetona adicionada a 2,5-HD prejudica a aquisição (mas não o desempenho) em uma atividade de aprendizagem espacial em um labirinto radial de 8 braços e, por sua vez, Mateus, Santos e Batoréu (2002) demonstraram que o zinco pode funcionar como um quimioprotetor aos efeitos neurotóxicos do 2,5-HD, o que fora obtido com ratos em testes bioquímicos e neurocomportamentais (deambulação e levantamentos no campo aberto).

Em conjunto, os resultados supracitados apontam que o hexano (ou, mais precisamente, seu metabólito 2,5-HD) prejudica a função sensório-motora sem, contudo, trazer decremento

na “motivação” para o comportamento. Quando associada a outros compostos, pode prejudicar a aprendizagem e agravar os prejuízos sensório-motores (Maurissen, 1995).

A exposição sistêmica ao hexano, em modelos animais, promove uma generalizada depressão do sistema nervoso central, levando à anestesia (dose-dependente), parada respiratória, perda de reflexos posturais e, até mesmo, à morte (exposições de 7.040 a 316.800 mg/m³; 2000 – 90.000 ppm). A letalidade depende da concentração da substância inalada, sua pureza e a temperatura a qual tal exposição ocorreu. Outros sintomas relatados são: hipotermia, ataxia, diminuição na atividade motora, sedação, apneia, crises convulsivas, irritação cutânea e redução no ganho de peso (DeCaprio, 2000; WHO, 1991). Em ratos expostos ao 2,5-HD, foram relatados aumento na concentração plasmática de acetilcolinesterase, redução do fluxo sanguíneo e na captura da glicose em várias áreas do cérebro, sendo o colículo inferior uma das regiões mais afetadas (WHO, 1991). Cabe citar que déficits eletrofisiológicos e comportamentais também foram identificados em experimentação animal após exposição ao hexano e seus metabólitos.

Corroborando essa hipótese, estudos *in-vitro* e *in-vivo* demonstraram o edema axonal, degeneração de fibras nervosas centrais e periféricas e necrose de fibras musculares, sendo que o edema e a retração de mielina paranodal desenvolveu-se primeiro em regiões distais e paranodais de fibras de grande diâmetro, com raros registros de regeneração (WHO, 1991). Um exemplo vem de Politis, Pellegrino e Spencer (1980) que, em uma preparação, expuseram diretamente o nervo ciático de ratos ao 2,5-HD (diluído ou não), por 45 min. Como resultado, observaram a formação de edemas axonais característicos, afinamento da mielina e degeneração axonal após 4 dias de tratamento.

Conclusões

Este artigo relatou os aspectos toxicocinéticos, toxicodinâmicos, de segurança do trabalho e pesquisas animais que trataram do hexano como toxicante em análise. Este ensaio tentou garantir uma apresentação ampla e geral sobre o tema, de forma que se apresentasse ao menos alguns pontos fundamentais dessa discussão. Enfoque foi dado às pesquisas sobre toxicologia comportamental, e uma descrição sobre as principais técnicas e pesquisas metodologias úteis no delineamento de pesquisas futuras foi realizada.

Diferenças qualitativas entre a biotransformação do n-hexano em animais experimentais e no homem são inexistentes, sendo a única diferença quantitativa (Leite, 2008). Dessa forma, estudos com animais demonstram os efeitos de exposição crônica e aguda ao tóxico, utilizando

processos orgânicos análogos à exposição no corpo humano. Todavia, as pesquisas animais tendem a fazer exposição ao hexano de forma bastante distinta da principal forma de exposição ao hexano em ambiente natural. Enquanto as pesquisas animais utilizam-se principalmente da administração oral do agente, em ambiente natural a principal forma de exposição ao toxicante é via inalação. Deve-se ter em evidência tais relações sempre que se for tomado conclusões de pesquisas animais quando comparado ao comportamento humano. Assim posto, esses estudos devem se somar àquelas pesquisas com humanos para a compreensão de um quadro mais completo dessa casuística. É importante salientar, ainda, que para a compreensão global dos aspectos comportamentais sobre uma dada função – a função motora, por exemplo – diferentes modelos e protocolos experimentais devem ser empregados, visto que um mesmo modelo não é capaz de abarcar todos os componentes que caracterizam uma função neurocomportamental. Assim, para avaliar a função motora, testes específicos como o rotarod podem auxiliar na compreensão do componente “equilíbrio”, componente este que de uma forma ou outra está presente na FOB ou no Campo Aberto, mas que não pode ser isolado para análise visto a natureza do comportamento observado nesses dois último modelos. Assim, a articulação entre os modelos a serem escolhidos para a condução de um experimento, devem considerar os objetivos: se um panorama sobre a função motora (como um todo), ou alguma peculiaridade dessa função (uma parte). Essa é uma discussão importante para fins de pesquisa básica.

Compreender as consequências da contaminação por este solvente pode auxiliar na prevenção de acidentes ocupacionais, e indústrias fazem o uso deste solvente podem se beneficiar de uma maior compreensão sobre as modificações comportamentais advindas da contaminação por hexano, desenvolvendo sistemas de prevenção e remediação mais eficazes.

Referências

- Blake, B. L. (2004). Toxicology of nervous system. In E. Hodgson (Ed.), *A Textbook of Modern Toxicology* (3rd ed., pp. 279–297). Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd.
- Boekelheide, K. (1987). 2,5-Hexanedione alters microtubule assembly. I. Testicular atrophy, not nervous system toxicity, correlates with enhanced tubulin polymerization. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 88(3), 370–382.
- Brasil. NR 7 - Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (2013). Presidência da República do Brasil: Ministério do Trabalho e Emprego.
- Brasil. NR 15 - Atividades e operações insalubres (2014). Presidência da República do Brasil: Ministério do Trabalho e Emprego.

- Brasil. NR 9 - Programa de prevenção de riscos ambientais (2014). Presidência da República do Brasil: Ministerio do Trabalho e Emprego.
- Cardona, A., Marhuenda, D., Prieto, M. J., Marti, J., Periago, J. F., & Sánchez, J. M. (1996). Behaviour of urinary 2,5-hexanedione in occupational co-exposure to n-hexane and acetone. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 68(2), 88–93.
- Cory-Slechta, D. A. (1989). Behavioral measures of neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 10(2), 271–295.
- DeCaprio, A. P. (2000). n-Hexane, metabolites, and derivatives. In P. S. Spencer, H. H. Schaumburg, & A. C. Ludolph (Eds.), *Experimental and Clinical Neurotoxicology* (2nd ed., pp. 633–648). New York: Oxford University Press.
- Dekant, W., & Anders, M. W. (2008). Toxicology of solvents. In H. Greim & R. Snyder (Eds.), *Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction* (pp. 604–620). West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- Eckert, G. P., & Müller, W. E. (2008). The nervous system. In H. Greim & R. Snyder (Eds.), *Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction* (pp. 244–264). West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- Elsner, J., Fellmann, C., & Zbinden, G. (1988). Response force titration for the assessment of the neuromuscular toxicity of 2,5-Hexanedione in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 10(1), 3–13.
- Ikeda, T., Katakura, Y., Kishi, R., & Miyake, H. (1993). Acute neurobehavioral effects of co-inhalation of toluene and n-hexane on schedule-controlled behavior in rats. *Environmental Research*, 63(1), 70–81.
- Joshi, D. R., & Adhikari, N. (2019). An overview on common organic solvents and their toxicity. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 28(3), 1-18.
- Krasavage, W. J., O'Donoghue, J. L., DiVincenzo, G. D., & Terhaar, C. J. (1980). The relative neurotoxicity of methyl-n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 52(3), 433–441.
- Kulig, B. M., Vanwersch, R. A. P., & Wolhuis, O. L. (1985). The automated analysis of coordinated hindlimb movement in rats during acute and prolonged exposure to toxic agents. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 80(1), 1–10.
- Ladefoged O., Roswall K., & Larsen J. J. (1994). Acetone potentiation and influence on the reversibility of 2,5-hexanedione-induced neurotoxicity studied with behavioural and morphometric methods in rats. *Pharmacology & Toxicology*, 74(4-5), 294-299.

- Lam, H. R., Larsen, J. J., Ladefoged, O., Moller, A., Strange, P., & Arlien-Soborg, A. (1991). Effects of 2,5-hexanedione alone and in combination with acetone on
- Leite, E. M. A. (2008). Soventes orgânicos. In S. Oga, M. M. A. Camargo, & J. A. O. Batistuzzo (Eds.), *Fundamentos de Toxicologia* (3rd ed., pp. 275–324). São Paulo: Atheneu Editora.
- Li, X., Jiang, L., Yu, T., Li, M., Wang, Q., Liu, Z., & Xie, K. (2020). No-observed-adverse-effect level of hair pyrrole adducts in chronic n-hexane intoxication in rats. *Neurotoxicology*, 78(1), 11-20.
- Mateus, M. L., Santos, A. P. M., & Batoréu, M. C. C. (2002). Evidence of zinc protection against 2,5-hexanedione neurotoxicity: Correlation of neurobehavioral testing with biomarkers of excretion. *Neurotoxicology*, 23(6), 747–754.
- Maurissen, J. P. J. (1995). Neurobehavioral methods for the evaluation of sensory functions. In L. W. Chang & W. Slikker Jr. (Eds.), *Neurotoxicology: Approach and Methods* (pp. 239–264). San Diego: Academic Press.
- NIOSH - National Institute of Occupational Safety and Health. (1983). *Health Hazard Evaluation Report (HETA 80-256-1386)*. Cincinnati, Ohio.
- NIOSH - National Institute of Occupational Safety and Health. (2013). *TLVs and BEIs*. Cincinnati, Ohio: ACGIH.
- Petrobras. (2011). *Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ BR 608 - Hexano)*. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Politis, M. J., Pellegrino, R. G., & Spencer, P. S. (1980). Ultrastructural studies of the dying-back process. V. Axonal neurofilaments accumulate at sites of 2,5-hexanedione application: Evidence for nerve fibre dysfunction in experimental hexacarbon neuropathy. *Journal of Neurocytology*, 9(4), 505–516.
- Sanagi, S., Seki, Y., Sugimoto, K., & Hirata, M. (1980). Peripheral nervous system functions of workers exposed to n-hexane at a low level. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 47(1), 69–79.
- Seeber, A. (2008). Behavioral neurotoxicology. In H. Greim & R. Snyder (Eds.), *Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction* (pp. 265–279). West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- Shell, L., Rozum, M., Jortner, B. S., & Ehrich, M. (1992). Neurotoxicity of acrylamide and 2,5-Hexanedione in rats evaluated using a functional observational battery and pathological examination. *Neurotoxicology and Teratology*, 14(4), 273–283.
- Tanger, H. J., Vanwersch, R. A. P., & Wolthuis, O. L. (1984). Automated quantitative analysis

of coordinated locomotor behaviour in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 10(3), 237–245.

Weiss, B. (1983). Behavioral toxicology and environmental health science. Opportunity and challenge for psychology. *The American Psychologist*, 38(11), 1174–1187. Retrieved from <http://psycnet.apa.org/index.cfm?fa=buy.optionToBuy&id=1984-18192-001>

Wang, S., Li, M., Wang, X., Li, X., Yin, H, Jiang, L., Han, W., Irving, G., Zeng, T. & Xie, K. (2017). Diallyl trisulfide attenuated n-hexane induced neurotoxicity in rats by modulating P450 enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 265(1), 1-7.

WHO - World Health Organization. (1991). *Environmental Health Criteria 122: n-Hexane*. Vammala: WHO.

Enviado em: 01/08/2020

Aceito em: 25/11/2020

ⁱ **Agradecimentos:** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Código de Financiamento 001.