UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação hematológica, atividade enzimática e níveis de metais na exposição ocupacional aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Eduardo Rodrigo Saraiva

Ribeirão Preto
2009

Eduardo Rodrigo Saraiva

Avaliação hematológica, atividade enzimática e níveis de metais na exposição ocupacional aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.

Orientadora: Prof[a] Dra. Regina Helena Costa Queiroz

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FÍNS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

SARAIVA, EDUARDO RODRIGO

Avaliação hematológica, atividade enzimática e níveis de metais na exposição ocupacional aos defensivos agrícolas e fertilizantes. Ribeirão Preto, 2009.

62 pag.:Il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP- Área: Toxicologia.

Orientadora: Queiroz, Regina Helena Costa.

1. Organofosforados. 2. Carbamatos. 3..Acetilcolinesterase. 4. Monitoramento. 5. Intoxicação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eduardo Rodrigo Saraiva
Avaliação hematológica, atividade enzimática e níveis de metais na exposição ocupacional aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.

Orientado: Eduardo Rodrigo Saraiva

Orientadora: Prof[a] Dra. Regina Helena Costa Queiroz

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedico este trabalho a minha querida e amada esposa pela paciência e compreensão e a minha filha por fazer parte da minha vida

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora pela confiança depositada em mim.

Agradeço a Sônia do laboratório de Toxicologia da FCFRP-USP pela inestimada ajuda.

Agradeço ao Dr. Geraldo pela doação das amostras utilizadas neste trabalho.

Agradeço a meu tio José Roberto Saraiva pelos conselhos e ajuda.

Agradeço A todos os meus familizares.

Agradeço a Deus, sempre.

RESUMO

Saraiva, E. R. **Avaliação** hematológica, enzimática e níveis de metais na exposição ocupacional aos defensivos agrícolas e fertilizantes. 2009. 62f. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O desenvolvimento na área agroquímica associado as novas técnicas de plantio, asseguram ao país recordes anuais na produção agrícola. Entretanto, os defensivos agrícolas e fertilizantes utilizados para aumentar a produção das lavouras não são inertes a saúde humana. Exposições contínuas e inadequadas a esses compostos químicos podem causar sua absorção e resultar em intoxicações agudas ou crônicas. Com o objetivo de avaliar essas exposições, dosamos a atividade da enzima acetilcolinesterase, assim como, avaliamos os hemogramas e dosamos os níveis sanguíneos dos metais arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e o não metal selênio (Se) em trabalhadores rurais e moradores da área urbana da região de Rio Verde-GO e comparamos esses resultados. A atividade média da enzima colinesterase eritrocitária nos trabalhadores rurais apresentou uma depressão significativa indicando uma exposição inadequada aos inseticidas inibidores das colinesterases. As concentrações sanguíneas médias dos metais As, Cd, Mn, e Zn nos trabalhadores rurais são maiores do que na população urbana, indicando que as exposições inadequadas aos fertilizantes e defensivos agrícolas podem causar absorção desses metais. A concentração sanguínea média de Se na população urbana é maior do que nos trabalhadores agrícolas. Esse fato pode estar ligado a alimentação, sendo que, uma provável causa seria o baixo consumo de alimentos ricos em selênio (castanha-do-pará, salmão, farelo de trigo, ostras e fígado bovino). Os hemogramas não apresentaram alterações, indicando que, sua utilização isolada na monitorização das exposições ocupacionais aos defensivos agrícolas e fertilizantes é inadequada.

Palavras chave: Organofosforados, carbamatos, acetilcolinesterase, monitoramento, intoxicação.

ABSTRACT

Saraiva, E. R. **Hematological** and enzymatic evaluation and measurement of metal levels in occupational exposure to agricultural chemicals and fertilizers. 2009. 62f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Advancements in the agrochemical industry associated with new seeding techniques make it possible for the country to reach annual crop records in production. However, the chemicals and fertilizers used for increasing productions are by no means harmless to human health. Repeated and inadequate exposures to such chemicals may result in their absorption and cause acute and chronic poisoning. In order to assess these exposures, we measured the activity of the acetylcholinesterase enzyme and evaluated hemograms. In addition, we measured blood levels of metals such as arsine (As), cadmium (Cd), lead (Pb), manganese (Mn), zinc (Zn), copper (Cu), and the non metallic selenium in farm workers and urban residents in a region of Rio Verde- GO- Brazil and compared the results. Mean activity of the erythrocyte cholinesterase enzyme in the rural workers presented a significant decrease, indicative of inadequate exposure to cholinesterase inhibiting insecticides. Mean concentrations of the metals As, Cd, Mn, and Zn were higher in rural workers compared to urban residents, which suggests that inadequate exposure to fertilizers and agricultural chemicals may result in their absorption. Mean blood concentration of Se in urban residents was higher compared to rural workers. That can be associated with diet and a possible cause may be a low consumption of high Se foods (Brazil's nuts, salmon, oysters, wheat bran, and bovine liver). The hemograms did not present any changes, indicating that its use for monitoring occupational exposures to fertilizers and agricultural chemicals is inadequate.

KEY WORDS: Organophosphorates, carbamates, acetylcholinesterase,, monitoring, poisoning

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conversão da forma “tion” em “oxon” pelo citocromo p450.....7

Figura 2. Representação da enzima acetilcolinesterase 9

Figura 3. Hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase.....11

Figura 4. Médias e os desvios padrões das atividades enzimáticas dos moradores da área urbana (não expostos) e dos trabalhadores rurais antes da exposição.....35

Figura 5. Médias e os desvios padrões das atividades enzimáticas dos trabalhadores rurais após a exposição e dos moradores da área urbana.....35

Figura 6. Médias e os desvios padrões das atividades das colinesterases eritrocitárias nos trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.....36

Figura 7. Médias e os desvios padrões do número de eritrócitos por microlitros em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.....39

Figura 8. Médias e os desvios padrões da concentração de hemoglobina (Hb) em gramas por decilitros em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.....39

Figura 9. Médias e os desvios padrões do hematócrito, expresso em porcentagem (%), em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.....40

Figura 10. Médias e os desvios padrões do número de leucócitos por 100mL, em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.....40

Figura 11. Médias e os desvios padrões das porcentagens das células brancas: bastonetes (Bast.), segmentados (Seg.), eosinófilos (Eos.), linfócitos (Linf.), monócitos (Mon.) e basófilos (Bas.), em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.....41

Figura 12. Médias e os desvios padrões do número de plaquetas por mL, em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.....42

Figura 13. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de arsênio (As) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais 45

Figura 14. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de cádmio (Cd) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais.....45

Figura 15. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de chumbo (Pb) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais 46

Figura 16. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de manganês (Mn) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais....46

Figura 17. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de zinco 64 (Zn 64) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais...47

Figura 18. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de zinco 66 (Zn 66) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais...47

Figura 19. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de cobre 63 (Cu 63) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais..48

Figura 20. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de cobre 65 (Cu 65) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais..48

Figura 21. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de selênio (Se) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indicadores biológicos de exposição ao arsênio 14

Tabela 2 - Concentrações sanguíneas de chumbo e efeitos tóxicos 15

Tabela 3 - Valores de b e f para correção da atividade da colinesterase eritrocitária 24

Tabela 4 - Atividade da acetilcolinesterase (ΔpH/h) em indivíduos residente na zona urbana não expostos ocupacionalmente aos defensivos agrícolas e fertilizantes 31

Tabela 5 - Atividade da acetilcolinesterase (ΔpH/h) em trabalhadores rurais antes da exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes 32

Tabela 6 - Atividade da acetilcolinesterase (ΔpH/h) em trabalhadores rurais antes após a exposição aos defensivos agrícolas 33

Tabela 7 - Atividade da enzima acetilcolinesterase (ΔpH/h), porcentagem da atividade inicial e depressão da atividade inicial dessa enzima em trabalhadores rurais antes e após a exposição a um ciclo de plantio e colheita de várias culturas 34

Tabela 8 - Resultados dos hemogramas dos trabalhadores rurais antes da exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes 37

Tabela 9 - Resultados dos hemogramas dos trabalhadores rurais após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes 38

Tabela 10 - Concentrações sanguíneas, em parte por bilhão (ppb), dos metais arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e o não metal selênio (Se) nos trabalhadores rurais após exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes 43

Tabela 11 - Concentrações sanguíneas, em parte por bilhão (ppb), dos metais arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e o não metal selênio (Se) na população urbana, não exposta ocupacionalmente aos defensivos agrícolas e fertilizantes 44

SUMÁRIO

Resumo ..... **i**

Abstract ..... **ii**

Lista de figuras ..... **iii**

Lista de tabelas ..... **v**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1 Fertilizantes e defensivos agrícolas 2

1.2 Organofosforados e carbamatos 4

1.3 Toxicocinética dos organofosforados e carbamatos 5

1.4 Toxicodinâmica dos organofosforados e carbamatos 8

1.5 Metais 13

1.6 Selênio 16

2. OBJETIVOS **18**

3. MATERIAIS E MÉTODOS **20**

3.1 Amostragem e coleta 21

3.2 Armazenamento da amostra e dosagem da atividade enzimática 22

3.3 Armazenamento da amostra e hemograma 24

3.4 Armazenamento da amostra e determinação do selênio e metais 29

4. RESULTADOS **30**

4.1 Resultados das atividades da enzima acetilcolinesterase 31

4.2 Resultados dos hemogramas 37

4.3 Resultados das dosagens sanguíneas dos metais e do selênio 42

5. DISCUSSÃO **50**

6. CONCLUSÃO **56**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **58**

Introdução

1.1 Fertilizantes e defensivos agrícolas

O desenvolvimento de novos compostos químicos utilizados como fertilizantes e defensivos agrícolas aliados ao desenvolvimento tecnológico de máquinas agrícolas e novas técnicas de plantio asseguram ao país, a cada ano, recordes na produção de alimentos. Os defensivos agrícolas são compostos pelos herbicidas, inseticidas e fungicidas. Esses compostos melhoram a produção agrícola porque protegem as lavouras dos ataques de insetos, fungos e invasões de outros vegetais que não são de interesse para a cultura (Meirelles, L. C., 2005).

Os fertilizantes são compostos químicos aplicados aos solos com o objetivo de fornecer as culturas de vegetais os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento e produção. Esses nutrientes podem ser classificados como macronutrientes primários que são compostos pelo nitrogênio, fósforo e potássio (N, P e K), macronutrientes secundários, como o cálcio, magnésio e o enxofre (Ca, Mg e S) e os micronutrientes boro, cloro, cobre, ferro, manganês, molibdênio, zinco e cobalto (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn e cobalto) de acordo com sua importância no desenvolvimento dos vegetais (Kulaif, 1999).

De acordo com sua composição, os fertilizantes são classificados como nitrogenados, potássicos ou fosfatados. A denominação fertilizante fosfatado é utilizada quando ocorre em sua formulação uma maior proporção de fosfato. Os fertilizantes fosfatados são os mais importantes para a agricultura, contribuindo com um aumento de produtividade de 30 a 50% quando corretamente aplicados (Kulaif, 1999).

Desde pequenos produtores até grandes empresas agrícolas utilizam os fertilizantes para aumentar a sua produção. No Brasil, a utilização desses compostos vem aumentando continuamente (Kulaif, 1999).

As rochas fosfáticas apresentam em sua constituição metais pesados como Cd, Cr, Pb e Hg, incluindo-se os micronutrientes Fe, Cu e Mn. No processo de manufatura dos fertilizantes, esses metais não são extraídos e permanecem em sua formulação (Sharpley & Menzel, 1987), sendo que, sua presença oferece um risco de intoxicação, para o trabalhador rural, no momento de sua aplicação na lavoura.

Os defensivos agrícolas estão sendo utilizados em escala mundial desde a 2ª grande guerra. De acordo com o Ministério da Saúde, esses compostos estão entre os mais importantes fatores de risco para a saúde dos trabalhadores e para o meio ambiente. Sua utilização na agricultura nacional em larga escala ocorreu a partir da década de 70, sendo que, o Brasil é um dos maiores consumidores do mundo com um gasto anual médio de 2,5 bilhões de dólares. A avaliação e análise das condições de exposição aos produtos químicos em geral, e aos defensivos agrícolas em particular, representam um grande desafio aos estudiosos da relação saúde/trabalho/exposição a substâncias químicas (Ministério da Saúde, 2006).

Um dos principais aspectos que dificultam a avaliação da exposição e dos efeitos à saúde humana causados por esses compostos, diz respeito ao número de substâncias e produtos que estão agrupados sob o termo defensivo agrícola. Atualmente, existem no Brasil, 470 princípios ativos de defensivos agrícolas, 572 produtos técnicos e 1079 produtos formulados no mercado nacional, sendo 45% de herbicidas, 27% de inseticidas e 28% de fungicidas (Meirelles, L. C., 2005).

Outra dificuldade reside no fato de os trabalhadores não registrarem dados referentes à freqüência, modo (se há contato com a pele, inspirado com o ar) e tempo de exposição, variáveis fundamentais na análise da exposição para identificação do risco e que não permanecem imutáveis no cotidiano do trabalho (Ministério da Saúde, 2006). Dados como o número de aplicações por mês, horas de aplicação por dia, o horário do dia em que são feitas as aplicações, as doses, assim como os produtos utilizados não são sistematicamente registrados. Finalmente, e não menos importante, a maioria das pequenas propriedades rurais utiliza, simultaneamente, misturas de produtos com características químicas e toxicológicas diferentes, cujos efeitos para a saúde são pouco conhecidos pela ciência (Ministério da Saúde, 2006).

É importante salientar que os dados oficiais brasileiros sobre intoxicações por agroquímicos não retratam a realidade do país. São insuficientes, parciais, fragmentados, desarticulados e dispersos em várias fontes de dados, por exemplo: Comunicação de Acidentes do Trabalho (CAT), Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica (SINITOX), Sistema de Mortalidade (SIM), Sistema de Internação Hospitalar (SIH), Sistema Nacional

de Informações de Agravos Notificáveis (SINAN) e outros. A portaria nº 777, do Ministério da Saúde, publicada em 28 de abril de 2004, entre outros pontos, define as intoxicações exógenas, entre elas, aquelas causadas pelos defensivos agrícolas, como de notificação compulsória (Ministério da Saúde, 2006).

1.2 Organofosforados e carbamatos

Em 1820, Lassaigne sintetizou o primeiro éster fosforado. As propriedades inseticidas desses compostos foram descobertas em 1937 por Shrader, que após 4 anos, desenvolveu o inseticida sistêmico OMPA – octametil pirofosforamida e em 1944 o primeiro praguicida organofosforado a ser comercializado: TEPP – tetraetil pirofosfato. Posteriormente foram sintetizados compostos com maior estabilidade como o paration e o paraoxon e compostos de menor toxicidade, entre eles, o fention e o clortion (Jeyaratnam, J.; Maroni, M., 1994). Os inseticidas organofosforados são ésteres amido tiol derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosforotióico e fosfonotióico. São rapidamente hidrolisados, tanto no meio ambiente, como nos meios biológicos, e altamente lipossolúveis, com alto coeficiente de partição óleo/água (Alonzo, H. G. A. & Corrêa, C. L., 2003).

Um grande número de organofosforados foi descoberto no início do século XX, e o conhecimento de seus efeitos deletérios sobre mamíferos foi observado em 1932 por Lang e Kreuger em estudos com ratos. A descoberta de seus efeitos tóxicos resultou em um grande número de novos usos potencias para esses compostos, icluindo o seu uso bélico. Os gases *sarin, soman e tabun* foram utilizados na II Guerra Mundial e são conhecidos como *"gases dos nervos"* (Rosati *et al*., 1995).

Na guerra do Golfo houve rumores da utilização desses gases o que motivou a distribuição de máscaras contra gases e atropina para a população civil (Rosati *et al*., 1995). Recentemente, esses gases tornaram-se notórios, pelo seu uso como agente químico para ataques terroristas, como o que ocorreu em 19 de março de 1995, no metrô de Tókio, no Japão, envolvendo o gás *sarin* (Carlton, Simpson e Haddad, 1998).

Os compostos organoclorados foram até 1957 amplamente utilizados na agricultura como inseticidas. Entretanto, a partir deste ano, devido a elevada meia-vida ambiental desses compostos, acúmulo na cadeia alimentar, o alto poder inseticida dos organofosforados aliado a sua baixa meia-vida no meio ambiente, os organoclorados foram substituídos pelos organofosforados e posteriormente, em parte, pelos carbamatos (Gallo & Lawryk, 1991). Os organofosforados e carbamatos são classes de compostos químicos utilizados como defensivos agrícolas, com amplo emprego na agricultura e também em saúde pública no controle de vetores como o da malária e da dengue (Carlton, Simpson e Haddad, 1998).

O grupo dos carbamatos é formado por derivados do ácido N-metil carbâmico e dos ácidos tiocarbamatos e ditiocarbamatos, sendo que, estes últimos não são inibidores das colinesterases, têm usos e toxicidades diferentes. Estes compostos apresentam baixa pressão de vapor e pouca solubilidade em água, são moderadamente solúveis em benzeno e tolueno e altamente solúveis em metanol e acetona. Entre os derivados do ácido N-metil carbâmico se incluem os N-substituídos ou metil carbamatos (carbaril); carbamatos fenil substituídos (propoxur) e os carbamatos cíclicos (carbofuran). São utilizados como inseticidas e nematicidas domésticos e agrícolas (Alonzo, H. G. A. & Corrêa, C. L., 2003).

A Organização Mundial de Saúde estima que ocorra cerca de aproximadamente três milhões de envenenamentos humanos com inseticidas e cerca de mais de duzentas mil mortes em todo o mundo por ano. Estas intoxicações representam um grande problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento onde ocorrem os maiores índices de morbidade e mortalidade relacionados ao uso de organofosforados, carbamatos e outros inseticidas sem as orientações adequadas de técnicas de manejo (Saadeh *et a*l, 1996).

1.3 Toxicocinética dos organofosforados e carbamatos

Os inseticidas do grupo organofosforados e carbamatos apresentam absorção pela pele, pelo trato respiratório e pelo trato gastrintestinal sendo que muitas vezes sua absorção é favorecida pelos

solventes presentes na formulação (Jeyaratnam e Maroni, 1994, Mendes, 1995. Carlton, Simpson e Haddad, 1998). A absorção cutânea é favorecida em temperaturas elevadas ou quando existem lesões na pele. As principais vias de exposições relacionadas ao uso agrícola são a cutânea e a respiratória, porém, quando ocorre higiene precária no ambiente de trabalho ou quando os trabalhadores se alimentam em áreas contaminadas, o trato digestivo também se torna uma via importante na intoxicação (Alonzo, H. G. A. & Corrêa, C. L., 2003).

Após absorvidos, os carbamatos, organofosforados e seus produtos de biotransformação são rapidamente distribuídos por todos os tecidos e sofrem biotransformação, principalmente no fígado, formando produtos menos tóxicos e mais polares, que são eliminados facilmente do organismo, não havendo evidências de bioacumulação (Baron, 1991). Os organofosforados podem ser hidrolisados por um grupo de enzimas conhecidas como A-esterases ou paraoxonases hepáticas e plasmáticas. Existem amplas variações na atividade das paraoxonases entre as espécies animais e essas enzimas não apresentam relação estrutural com as colinesterases e aparentemente não formam intermediários estáveis com os organofosforados (Adkins *et al.*, 1993; Humbert *et al.,* 1993).

De acordo com Alonzo e Corrêa os compostos fosforados também podem ser atacados por outras enzimas em diferentes pontos da molécula. A reação de dessulfuração oxidativa que converte formas *tion* (P=S) em *oxon* (P=O) resulta na formação de metabólitos com maior toxicidade para insetos e mamíferos, por exemplo, a conversão do paration, que apresenta DL_{50} aguda oral em ratos entre 4,0 e 7,0mg/Kg, em paraoxon cuja DL_{50} aguda oral em ratos é de 0,8mg/Kg (Fig. 1).

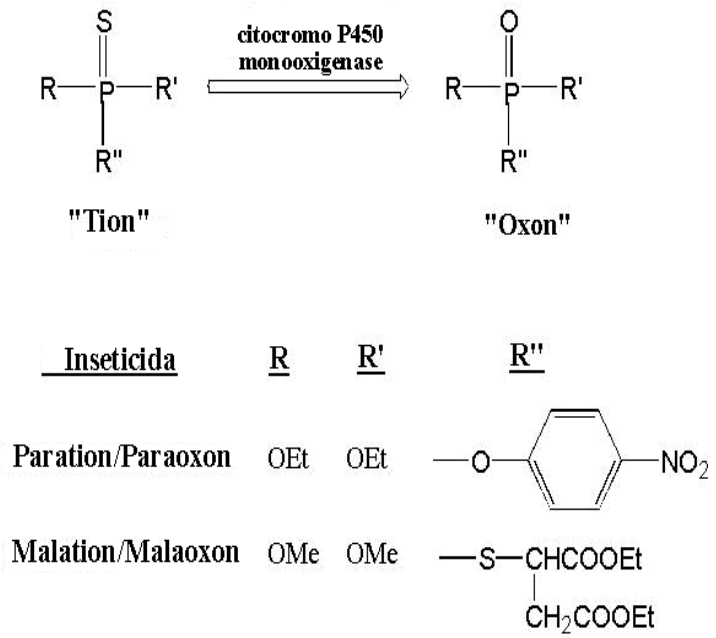

Figura 1. Conversão da forma “tion” em “oxon” pelo citocromo p450.

Porém, estes análogos oxidados são menos lipofílicos e acumulam-se menos nos tecidos adiposos além de serem rapidamente hidrolisados por hidrolases (carboxiesterases não específicas, arilesterases, fosforilfosfatases, fosfotriesterases e carboxiamidas) encontradas nos tecidos dos mamíferos. Os insetos são mais sensíveis a estes agentes porque freqüentemente apresentam deficiências dessas enzimas. Também ocorrem reações de desalquilação e desarilação oxidativa envolvendo a coenzima NADPH, o sistema citocromo p450 e o sistema de regeneração NADPH como provedores de elétrons e oxigênio para produzir metabólitos polares (Alonzo, H. G. A. & Corrêa, C. L., 2003).

Os carbamatos, após serem distribuídos, se encontram em concentrações maiores nos órgãos e tecidos envolvidos na sua biotranformação (Baron, 1991). Os compostos mais lipofílicos podem alcançar concentrações significativas no SNC e/ou outros tecidos ricos em lipídeos (Soares, 1998). Entretanto, a maioria dos carbamatos, não desencadeia sintomatologia excessiva proveniente de estimulação colinérgica no SNC, sendo que, quando estes sintomas estão presentes, são sinais de gravidade da intoxicação (Larini, 1993).

Os ésteres carbâmicos podem sofrer ataques em vários pontos da molécula, dependendo do tipo de radical acoplado na estrutura básica. Além da hidrólise do grupo éster-carbâmico (espontânea ou pelas carboxilases teciduais) com liberação de fenol substituído, de dióxido de carbono e de metilamina, acontecem várias outras reações de oxidação e redução envolvendo o citocromo P450 (Alonzo, H. G. A. & Corrêa, C. L., 2003).

As reações de maior importância na biotransformação dos carbamatos, de acordo com Larini (1993) são: hidrólise com a formação do ácido N-metilcarbâmico e o fenol correspondente, hidroxilação do grupamento metil ligado ao nitrogênio com formação de compostos menos tóxicos, hidroxilação do anel aromático, N-desmetilação e conjugação com o UDPGA (uridil difosfato ácido alfa glicurônico) e PAPS (3-fosfoadenosina e 5-fosfosulfato) especialmente dos compostos hidroxilados.

A eliminação dos organofosforados e carbamatos ocorre principalmente pela urina e fezes. No caso de eliminação pela via biliar, ocorre circulação entero-hepática prolongando a sintomatologia (Larini, 1993). A meia-vida destes praguicidas, após administração única, varia de minutos a poucas horas, dependendo do composto e da via de entrada, sendo que, 80 a 90% da dose absorvida são eliminadas em 48 horas (Alonzo, H. G. A. & Corrêa, C. L., 2003). No caso do paration etílico, após ação do citocromo p450, 85% do p-nitrofenol formado é eliminado na urina após as primeiras 6 horas da ingestão do inseticida (Larini, 1993).

1.4 Toxicodinâmica dos organofosforados e carbamatos

A toxicidade exercida pelos organofosforados deve-se essencialmente a inibição estável e em alguns casos irreversível de uma classe de enzimas denominadas colinesterases (acetilcolinesterase, colinesterase plasmática e esterase neurotóxica) que hidrolisam a acetilcolina. Os carbamatos são “inibidores reversíveis” das colinesterases quando se compara sua constante de hidrólise com a dos organofosforados. Porém, esse conceito não é correto porque implicaria que esses compostos seriam dissociados da enzima de maneira intacta, o que não ocorre (Larini, 1993).

Eles se ligam covalentemente no sítio esterásico da enzima e sofrem hidrólise, com recuperação da enzima, de maneira similar a acetilcolina, que é o substrato endógeno das colinesterases. A principal colinesterase envolvida no mecanismo de toxicidade desses praguicidas é a acetilcolinesterase ou colinesterase eritrocitária (Fig. 2) que se encontra nos tecidos nervosos, nas junções neuromusculares e nos eritrócitos (Larini, 1993).

A colinesterase plasmática localiza-se no plasma, fígado, intestino e nas células gliais, enquanto que a esterase neurotóxica encontra-se nos tecidos nervosos, fígado, tecido linfático, linfócitos e plaquetas. A colinesterase eritrocitária é sintetizada na eritropoiese com renovação entre 60 e 90 dias, regenera-se em média 1% ao dia. A síntese da colinesterase plasmática ocorre no fígado e sua renovação ocorre em média em 30 dias. A inibição da aceticolinesterase leva ao acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas (Schvartsman, 1991, Moraes *et al*, 1998).

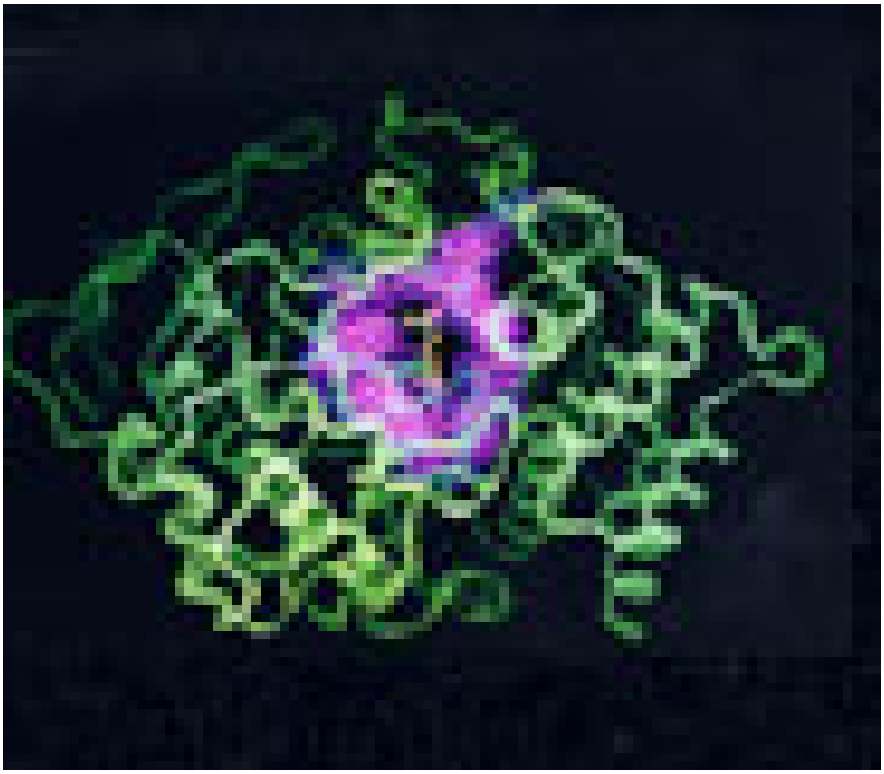

Figura 2. Representação da enzima acetilcolinesterase.
Fonte: Weizmann institute of science.

A enzima acetilcolinesterase apresenta em sua estrutura um centro que contém um sítio aniônico e um esterásico. De um modo geral, as interações enzima-substrato ocorrem através de forças eletrostáticas, interações dipolo-dipolo, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e forças de van der Waals (Larini, 1993). A acetilcolina aproxima-se da acetilcolinesterase (Fig. 3) e ocorre atração eletrostática entre o nitrogênio quaternário positivo presente no neurotransmissor com os resíduos de ácido glutâmico ou aspártico presentes no sítio aniônico da enzima, fixando e orientando a posição espacial do substrato de maneira que o centro esterásico possa exercer sua ação hidrolítica. No centro esterásico ocorrem interações entre os resíduos de serina e a carbonila da acetilcolina (Schvartsman, 1991, Moraes *et al*, 1998).

Resumidamente, a ocorrência de ligações de hidrogênio entre o grupo carboxilato do Glu e o N-1 do imidazol da His aumentam a habilidade do N-3 da His para atuar como uma base e extrair o hidrogênio do grupo hidroxila da Ser. Esta cooperação torna o oxigênio da Ser um nucleófilo forte que ataca facilmente o carbono da carbonila da acetilcolina. Esta reação resulta na formação de um intermediário tetraédrico que é, provavelmente, estabilizado pela ligação de hidrogênio em um “orifício oxiânion” (Schvartsman, 1991, Moraes *et al*, 1998).

A razão principal pela qual a acetilcolinesterase é capaz de catalisar esta reação é o fato de que a ligação do intermediário tetraédrico com o sítio ativo da enzima é mais estável do que a da própria acetilcolina. O colapso do intermediário tetraédrico e a liberação de colina formam a acil-enzima. A acil-enzima é atacada por uma molécula de água, ocasionando a liberação de acetato (isto é, por hidrólise) e a regeneração do sítio ativo da Ser que, agora, está ativada para outro ciclo catalítico (Schvartsman, 1991, Moraes *et al*, 1998).

.

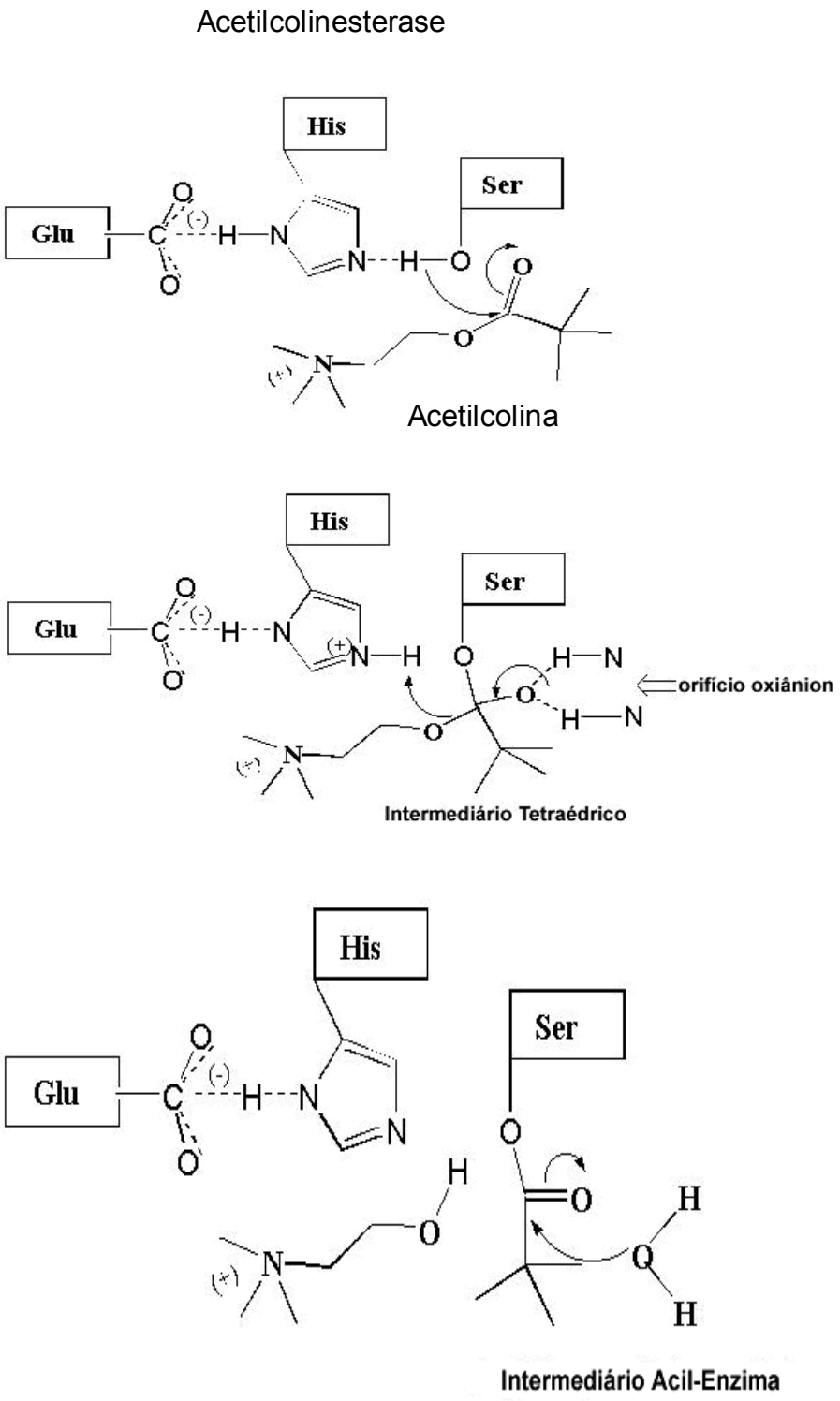

Figura 3. Hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase.

Os organofosforados se ligam nas colinesterases no sítio esterásico onde o fósforo faz uma ligação covalente estável formando a enzima fosforilada. Quando há inibição prolongada, ocorrem alterações nos grupos básicos e a enzima fosforilada não pode ser recuperada com a ajuda de reativadores. Este fenômeno de desnaturação da enzima é conhecido como *envelhecimento* e ocorre somente com os organofosforados dos grupos dos fosfatos, fosfonatos e dos fosforamidatos (Alonzo, H. G. A. & Corrêa, C. L., 2003).

O período de tempo que esse fenômeno leva para ocorrer é chamado de *intervalo critico* porque durante esse tempo a administração de um antídoto que regenere a enzima, ainda é eficaz. Este fato é importante na terapêutica, pois dele depende a utilização ou não de oximas (reativador enzimático). Se o processo de *envelhecimento* estiver completo a enzima não poderá mais ser reativada e a atividade enzimática normal será reconstituída quando for sintetizada uma nova enzima (Quinby & Wash, 1964; Mortensen, 1986; Gallo & Lawryk, 1991; Moraes *et al*, 1995; Soares, 1998; Carlton, Simpson e Haddad, 1998). Alguns compostos como as oximas, tem a capacidade de reativar a enzima fosforilada, porque podem exercer uma atração nucleofílica para o centro ativo da enzima maior do que a dos organofosforados (Alonzo, H. G. A. & Corrêa, C. L., 2003).

A acetilcolina é o mediador químico necessário para a transmissão do impulso nervoso em todas as fibras pré-ganglionares do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), todas as fibras parassimpáticas pós-ganglionares e em algumas fibras simpáticas pós-ganglionares. A transmissão neuro-humoral do nervo motor do músculo estriado também é mediada pela acetilcolina, assim como, algumas sinapses interneuroniais do Sistema Nervoso Central – SNC - (Alonzo, H. G. A. & Corrêa, C. L., 2003). A transmissão do impulso nervoso requer que a acetilcolina seja liberada no espaço intersináptico ou entre a fibra nervosa e a célula efetora (Schvartsman, 1991, Gallo & Lawryk, 1991).

Posteriormente, a acetilcolina se liga a um receptor colinérgico (nicotínico ou muscarínico), gerando, desta forma, um potencial pós-sináptico e a propagação do impulso nervoso (Alonzo, H. G. A. & Corrêa, C. L., 2003). Para que não ocorra uma super estimulação nos receptores colinérgicos devido

a um acúmulo de aceticolina na fenda sináptica, esse mediador sofre hidrólise sob a ação da acetilcolinesterase e se decompõe em colina e ácido acético. A colina volta para a célula e reage com a acetilcoenzima A sob a catalise da colina acetiltranferase formando novamente a molécula do neurotransmissor que, dentro da célula, é armazenado em vesículas presentes principalmente nas terminações do axônio (Schvartsman, 1991, Gallo & Lawryk, 1991).

As intoxicações por organofosforados e carbamatos levam a um quadro clínico de estimulação colinérgica excessiva no SNC, SNA e músculos estriados devido ao aumento da concentração de acetilcolina nas sinapses interneuroniais, com órgãos efetores e na placa motora. Alguns alcalóides da *Atropa belladonna* como a atropina e a escopolamina são antagonistas naturais dos receptores muscarínicos da aceticolina. A atropina é utilizada para bloquear os efeitos muscarínicos da acetilcolina nas intoxicações com inseticidas inibidores das colinesterases. e a escopolamina são ésteres orgânicos formados pela combinação de um ácido aromático (ácido trópico) e bases orgânicas complexas, seja tropina ou escopina (Brown, J. H. & Taylor, P. 1996).

1.5 Metais

O arsênio apresenta-se na natureza em diferentes formas: compostos trivalentes, tetravalentes e metilados (biometilação). As formas trivalentes apresentam maior toxicidade devido a alterações em proteínas e sistemas enzimáticos que contém grupos sulfidrilas. A metalotioneína apresenta efeito protetor na toxicidade do arsênio. As enzimas mitocôndriais são os principais alvos da ação tóxica desse elemento. As alterações nas funções das mitocondrias levam a um aumento da produção de peróxido de hidrogênio causando um estresse oxidativo na célula com formação de espécies reativas do oxigênio. Esses compostos podem causar danos ao DNA e dar início a um processo de carcinogênese (Goyer & Clarkson,1996).

A ingestão de altas doses (70 – 180mg) pode ser fatal. Os sintomas agudos incluem febre, anorexia, hepatomegalia, melanose e arritmias cardíacas. Pode ocorrer neuropatia periférica, alterações hematopoéticas, sintomas no trato gastro intestinal e trato respiratório. As exposições crônicas

causam neurotoxicidade periférica e no sistema nervoso central, lesão hepática e podem estar relacionadas a neoplasias (Goyer & Clarkson,1996).

A meia-vida do arsênio inorgânico, quando ingerido, é 10h e 50 a 80% de sua eliminação ocorrem dentro de 3 dias, sendo que, a forma metilada apresenta meia-vida de 30h (Goyer & Clarkson,1996). Os indicadores biológicos de exposição são: concentrações de arsênio na urina, no sangue e nos cabelos (tab. 1).

Tabela 1. Indicadores biológicos de exposição ao arsênio.

	Normal	Exposição excessiva
Urina µg/L	5 – 50	> 100
Sangue µg/L	1 – 4	50
Cabelo µg/L	< 1	

Modificado de Goyer & Clarkson

O cádmio, quando ingerido através das bebidas ou alimentos, pode causar toxicidade aguda em doses relativamente altas. De acordo com Nordberg (1972) concentrações de 16mg / L em bebidas podem causar náusea, vômito e dor abdominal. A inalação pela via pulmonar pode produzir uma pneumonite aguda e edema pulmonar. Exposições crônicas ao cádmio podem causar doença pulmonar obstrutiva, enfisema pulmonar, doenças renais crônicas, efeitos cardiovasulares e no sistema esquelético (Goyer & Clarkson,1996).

O indicador biológico mais importante de exposição ao cádmio é a excreção urinária desse metal. A maioria do cádmio presente na urina está ligado a metalotioneina. De acordo com Jarup *et al*., (1988) sua meia-vida não é exatamente conhecida, mas é extremamente longa, aproximadamente 30 anos, com acumulação no tecido renal. Níveis sanguíneos elevados de cádmio refletem exposições recentes, sendo que, em indivíduos não fumantes, as

concentrações variam entre 0,4 a 1,0μ / L. Concentrações de 10,0μ / L estão relacionadas a 14% de incidência de disfunção renal (Jarup *et al*., 1988).

O chumbo apresenta toxicidade mediada através de diversos mecanismos bioquímicos, sendo que, sua ação tóxica ocorre em diversos tecidos. Ele apresenta alta afinidade pelo tecido ósseo, sendo que, nesse tecido sua meia-vida é superior a 20 anos. Nos tecidos moles sua meia-vida é bem menor (Goyer & Clarkson,1996). A tabela 2 apresenta uma correlação entre concentrações sanguíneas de chumbo e efeitos tóxicos.

Tabela. 2. Concentrações sanguíneas de chumbo e efeitos tóxicos.

Efeito	Concentração sanguínea (μ / L)	
	Adultos	Crianças
Encefalopatia	80 – 100	100 - 120
Diminuição de QI	10 - 15	-----
Diminuição do aprendizado	20	-----
Nefropatia	40	40 - 60
Anemia	80 – 100	80 - 100

Modificado de Goyer & Clarkson

O manganês apresenta uma absorção pela via oral menor que 5%. Intoxicações ocupacionais com manganês frequentemente ocorrem através da via pulmonar. Sua meia-vida no sistema nervoso central (SNC) é maior do que nos outros órgãos que apresenta um valor em torno de 37 dias. Exposições agudas com doses elevadas de manganês podem causar alterações hepáticas, biliares e irritação gastrointestinal. Exposições crônicas aumentam mais de trinta vezes a incidência de doenças pulmonares. Ocorrem também alterações no SNC que levam as desordens psiquiátricas, como irritabilidade, distúrbios da fala e comportamento compulsivo. Pode ocorrer também o desenvolvimento de uma síndrome semelhante a doença de Parkinson (Goyer & Clarkson,1996).

O zinco é essencial na alimentação, sendo que, sua deficiência causa sérios danos a saúde, pois ele é importante para o metabolismo. Muitas

enzimas necessitam do zinco como co-fator. Para causar intoxicação aguda é necessária uma dose oral muito elevada desse metal, como 12 gramas (Goyer & Clarkson,1996). A via pulmonar é a mais importante nas intoxicações ocupacionais. As inalações do fumo de zinco nas indústrias causam uma patologia pouco conhecida que causa febre elevada. Existem estudos que evidenciam uma relação entre câncer e zinco (Logue *et al.*, 1982). Tumores em testículos foram observados em ratos e galinhas que receberam injeções de zinco. Este efeito provavelmente está relacionado a ação do zinco em gônadas que são estimuladas por ação hormonal (Walshe *et al.*, 1994).

O cobre é um metal essencial na dieta humana e sua carência nutricional causa alterações como anemia, baixa estatura em crianças e outras alterações. Estudos mostram que doses maiores que 3mg Cu / L causam náuseas, vômitos e diarréia. Ingestões de altas doses de sulfato de cobre causa necrose hepática, A doença de Wilson é caracterizada pelo acúmulo de cobre no fígado, cérebro, rins e córnea. Estudos epidemiológicos não encontraram relação entre câncer e cobre (Goyer & Clarkson,1996).

1.6 Selênio

Esse elemento apresenta forte ação antioxidante, ele encontra-se associado a enzima glutationa peroxidase. Além de atuar na detoxificação do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos, a glutationa peroxidase atua também na manutenção de grupos sulfidrilas vitais na forma reduzida, na síntese de hormônios derivados do ácido araquidônico e no metabolismo de compostos estranhos ao organismo, por exemplo, compostos aromáticos derivados de plantas e inseticidas; atua, ainda, como co-fator no metabolismo de certos aldeídos, por exemplo, o formaldeído e o metilglioxal e, supostamente, no transporte de alguns aminoácidos nos rins (Silva, 1993).

Recentemente, constatou-se que o selênio é um constituinte da 5'-iodinase, enzima atuante no metabolismo dos hormônios da tireóide, e que as síndromes de deficiência de iodo são mais graves quando há deficiência simultânea de selênio (Silva, 1993).

Intoxicações agudas com o selênio podem causar alteração da visão, supressão do apetite e alterações da coordenação motora. Dependendo

da dose ingerida, podem ocorrer paralisia e morte devido a falência respiratória. AsiIntoxicações crônicas causam uma patologia denominada doença alcalina, caracterizada por perda da vitalidade, queda de cabelos, lesão nas articulações e ossos longos, sintomas neurológicos, dor e hiperreflexia. Em alguns indivíduos esses sintomas evoluem para convulsões, paralisias e alteração da coordenação motora (Goyer & Clarkson,1996).

Objetivos

O trabalho teve como principal objetivo avaliar a exposição de trabalhadores rurais da região de Rio Verde-GO a defensivos agrícolas e fertilizantes durante o período de plantio e colheita de diversas culturas (cana de açucar, soja e milho). As principais metas foram:

1. Determinar a atividade da enzima colinesterase eritrocitária dos trabalhadores rurais, antes e após a exposição a um ciclo de plantio e colheita, comparando-a com a atividade da acetilcolinesterase da população urbana do mesmo município não exposta ocupacionalmente.

2. Avaliar o hemograma dos trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas.

3. Determinar a concentração sanguínea do selênio e dos metais arsênio, cádmio, chumbo, manganês, zinco e cobre nesses trabalhadores após o ciclo de plantio e colheita e comparar com a concentração sanguínea desses metais e o selênio na população urbana.

Materiais e Métodos

3.1 Amostragem e coleta

Para a realização deste trabalho foram selecionados dois grupos, compostos por homens e mulheres, com idade que variam entre 18 e 45 anos, divididos de acordo com o esquema a seguir:

- Grupo A (n=30): indivíduos que moram na zona urbana e não tem contato ocupacional com defensivos agrícolas e fertilizantes.

- Grupo B (n=33): indivíduos que trabalham na zona rural e são expostos ocupacionalmente aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Nos grupos A e B foram determinadas atividades da enzima colinesterase eritrocitária de acordo com Michel (1949), sendo que, no grupo A foi efetuada apenas uma análise e no grupo B foram realizadas duas análises. A primeira análise ocorreu antes do início do plantio (pré-exposição) e a segunda análise, 5 meses depois, após o fim da colheita (pós-exposição). Os hemogramas foram realizados manualmente no grupo B, antes do plantio (pré-exposição) e 5 meses depois, após a colheita (pós-exposição), de acordo com Lee; *et al,* (2004). Nos grupos A e B foram dosados no sangue o selênio e os metais arsênio, cádmio, chumbo, manganês, zinco e cobre através do método de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, de acordo com Palmer; *et al,* (2006), sendo que, no grupo B, a dosagem foi realizada após o fim da colheita (pós-exposição).

Nas coletas de sangue foram utilizados tubos de vidro (7,0mL) heparinizados (Vacutainer®) para dosagem da atividade da colinesterase eritrocitária e tubos de vidro (7,0mL) com EDTA (Vacuette®) para determinação do hemograma e dosagens de metais, ambos os tubos livres de contaminação por detergentes e metais. A assepsia para a coleta foi realizada com a utilização de álcool 70%, sendo que, a punção foi feita após evaporação do álcool para que não houvesse interferência nas análises.

3.2 Armazenamento da amostra e dosagens da atividade enzimática

O armazenamento da amostra para a determinação da colinesterase eritrocitária foi realizada de acordo com o esquema a seguir: após a coleta o sangue foi imediatamente centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos e o plasma separado das células. Os eritrócitos foram lavados com NaCl 0,9% e volume 2 ou 3 vezes maior do que as células. Os tubos foram agitados lentamente por inversão e centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e esse procedimento foi repetido até que a solução de NaCl 0,9% apresentou-se límpida (cerca de 3 vezes). Após a lavagem dos eritrócitos, foi adicionado um volume igual ao de células remanescentes de NaCl 0,9% e a amostra de eritrócitos foi armazenada em geladeira entre 2ºC e 5ºC até o momento da análise, no máximo 3 dias após a coleta.

Para a determinação da atividade da enzima as hemácias após serem lavadas e em volume igual entre células e NaCl 0,9% foram agitadas por inversão lenta e uma alíquota de 0,2mL dessa suspensão de células foram transferidas para outro tubo de vidro. Nesse tubo foi acrescentado 4,8mL de solução de saponina 0,01% seguido de agitação por inversão para promover a hemólise da amostra, em seguida, foi adicionado nesse tubo 5,0mL do tampão barbital e, após agitação manual, o tubo foi colocado em banho-maria a 25ºC por 10min. Em seguida, verificou-se o pH inicial, que foi admitido como pH_1, com um medidor de pH modelo pH-21 da *HANNA*® instruments. Em seguida adicionou-se no tubo 1,0mL da solução para eritrócitos (acetilcolina sigma®), e após agitação manual, o tubo foi imediatamente recolocado no banho-maria a 25ºC e após 1 hora foi medido o pH final, admitido como pH_2.

O método utilizado para a avaliação da atividade da acetilcolinesterase é o potenciométrico e baseia-se na medida da variação do pH de um meio tamponado no qual se coloca a amostra (solução de eritrócitos) e o substrato acetilcolina onde será medida a atividade enzimática. A enzima presente na amostra deverá hidrolisar o substrato, liberando ácido acético, responsável pela acidificação do meio e, portanto, da variação de pH (Michel, H.O., 1949).

3.2.1 Cálculo

A atividade da colinesterase, em unidades de **ΔpH/h** é calculada através da fórmula:

$$\Delta pH/h = \left(\frac{pH_1 - pH_2}{T_2 - T_1} - b \right) x\ f$$

Onde: **pH_1** = pH inicial

pH_2 = pH final

T_1 = hora da adição da acetilcolina

T_2 = hora da leitura do pH 2

b = correção da hidrólise não enzimática (tabela 3)

f = correção das variações, em ΔpH/h, devido à alteração do pH durante a reação (tabela 3).

Valores de referência para o método: H: 0,58 – 0,95ΔpH/h / M: 0,56 – 0,94ΔpH/h

Tabela 3. Valores de b e f para correção da atividade da colinesterase eritrocitária.

pH 2	**Colinesterase Eritrocitária**	
	b	**f**
7,9	0,03	0,94
7,8	0,02	0,95
7,7	0,01	0,96
7,6	0,00	0,97
7,5	0,00	0,98
7,4	0,00	0,99
7,3	0,00	1,00
7,2	0,00	1,00
7,1	0,00	1,00
7,0	0,00	1,00
6,8	0,00	0,99
6,6	0,00	0,97
6,4	0,00	0,97
6,2	0,00	0,97
6,0	0,00	0,99

3.3 Armazenamento da amostra e hemogramas

Para determinação do hemograma, a amostra foi armazenada entre 2ºC e 5ºC em geladeira por no máximo 3 dias até o momento do desenvolvimento da análise que foi realizada manualmente.

Para contagem global de leucócitos foi realizada uma diluição 1:20, em tubo de ensaio, com o diluente de Turk[1], que lisa praticamente todos os eritrócitos e preserva as células nucleadas. Os leucócitos foram contados nos 4 quadrados externos A, B, C e D da câmara de Neubauer em aumento de 100 (ocular 10 x objetiva 10 x). Cada quadrado está sub-dividido em 16 quadrados de 1/16mm^2 de área. A área total da contagem é de 64/16mm^2. A altura entre o retículo gravado na câmara e a parte inferior da lamínula é de 1/10mm. O volume total será, portanto, igual a 64/16mm^2 x 1/10mm = 64/160mm^3 (volume=2/5 mm^3). O princípio geral da contagem para qualquer tipo de câmara diz: o número total de partículas/mm^3 está na razão inversa do produto da diluição pelo volume (onde foram contadas) e na razão das partículas encontradas nesse volume, ou seja:

$$n^{\circ} \text{ partículas} = A / D \times V$$

Onde:

A: partículas encontradas no volume

D: diluição utilizada

V: volume onde foi realizada a contagem (para qualquer retículo convencionaram-se dois lados sobre os quais as partículas são contadas e dois opostos sobre os quais não são contadas).

Substituindo as dimensões da câmara e a diluição utilizada na fórmula acima teremos:

$$n^{\circ} \text{ leucócitos } /mm^3 = A \times 50$$

[1] Turk: ácido acético glacial (30mL) + água destilada (q.s.p. 1000mL) + 2 gotas de solução de violeta de genciana 1%.

Para a contagem dos eritrócitos foi realizada uma diluição 1:200, em tubo de ensaio, com diluente de Gower[2] para a preservação das células. As hemácias foram contadas nos quadrados 1, 2, 3, 4 e 5 do quadrado central da câmara de Neubauer em aumento de 400 (ocular 10 x objetiva 40 x). Cada um dos quadrados está sub-dividido em 16 quadrados, com 1/400mm^2 de área cada um. A área total de contagem será 16 x 5 x 1/400 = 80/400mm^2. A altura entre o retículo gravado na câmara e a parte inferior da lamínula é de 1/10mm. O volume total será, portanto, igual a 80/400mm^2 x 1/10mm = 80/4000mm^3 (volume=1/50 mm^3). Substituindo as dimensões da câmara e a diluição utilizada na fórmula anteriormente descrita teremos:

$$n^{\circ} \text{ eritrócitos } /mm^3 = A \times 10000$$

As plaquetas foram contadas da mesma maneira que os eritrócitos, entretanto, o diluente utilizado foi: citrato de sódio (3,8g) + formalina (0,2mL) + azul de cresil brilhante (0,1g) + água destilada q.s.p. 100mL.

Para a diferenciação e avaliação dos leucócitos, hemácias e plaquetas foram feitos esfregaços em lâminas. Essas foram lavadas com detergente, enxaguadas com água destilada e armazenadas em álcool 96. Foi adicionada, na lâmina, uma pequena gota de sangue aproximadamente a 1 ou 2 cm da extremidade da lâmina, em seguida, foi colocado o lado da lâmina com o qual se fez o esfregaço num ângulo de 45º com a face superior da outra lâmina. Fez-se com a lâmina um ligeiro movimento para traz até encostar na gota de sangue, deixando então, que a gota se difundisse uniformemente, ao longo de toda borda por capilaridade. A lâmina foi conduzida para frente de modo que ela carregasse a gota de sangue, que se estendeu numa camada delgada e uniforme. Para a elaboração do esfregaço, é essencial escorregar a lâmina de uma vez. Em seguida, o esfregaço foi seco imediatamente com o auxilio de um ventilador.

---

[2] Gower: ácido acético glacial (666mL) + Na_2SO4 anidro (250g)+ água destilada (q.s.p. 4000mL).

A coloração da lâmina foi realizada de acordo com a técnica de May-Grünwald- Giensa de acordo com o esquema descrito a seguir:

- O esfregaço foi coberto com 10 gotas de solução de May-grünwald que agiu durante 3 minutos. Para evitar a precipitação, não foi permitido que o líquido secasse.
- Acrescentou-se ao esfregaço 10 gotas de água destilada neutra misturada com líquido May-grünwald, mexendo-se cuidadosamente a lâmina. Em seguida a lâmina ficou em repouso por 3 minutos.
- Foi despejada a solução corante sem lavar.
- Cobriu-se o esfregaço com líquido de Giemsa diluído em água destilada (1 a 2 gotas de solução Giemsa para 1 mL de água destilada).
- A lâmina ficou em repouso por 5 minutos. Na seqüência o esfregaço foi lavado com um jato de água, sem despejar o corante da lâmina.
- A lâmina foi seca verticalmente.
- Em seguida foi realizada a análise microscópica em imersão.

O hematócrito realizado foi o microhematócrito. Um tubo capilar foi preenchido com sangue homogeneizado, até ¾ de sua altura. Uma das extremidades do tubo foi fechada em chama de lamparina. Em seguida o tubo foi colocado em uma centrífuga apropriada por 5 minutos a 10000 rpm. O cálculo do hematócrito foi realizado da seguinte maneira: altura da coluna de eritrócitos / altura total. O resultado foi expresso em porcentagem (%).

Para a determinação da hemoglobina, foi utilizado o método da cianometahemoglobina. Inicialmente, foi elaborada uma curva de calibração com padrões comerciais confiáveis. Em seguida, uma alíquota de 0,02mL de sangue foi adicionada em 5,0mL de solução de Drabkin (modificada) e em seguida homogeneizada. Após 3 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro (λ=540nm) contra a solução de Drabkin.

O cálculo para a determinação da concentração da hemoglobina (Hb), em g/dL, foi realizado da seguinte forma:

3.3.1 Cálculo

$$g/dL\ Hb = A \times fc$$

Onde:

A = absorbância

fc = fator de calibração

Referências para o método:

- Leucócitos: 5.000 – 10.000/ 100mL

Células	(%)
Bastonete	1 - 4
Segmentados	40 - 70
Eosinófilo	1 - 6
Basófilo	0 - 3
Linfócito	18 - 48
Monócito	3 - 10

- Hemácias: H: 5,0 – 5,5/µL
  M: 4,5 – 5,0/µL
- Hb: > 12,5g/dL
- Hematócrito:H:40 – 50%
  M:36 – 45%
- Plaquetas: 150.000 – 400.000/µL

3.4 Armazenamento da amostra e determinação do selênio e metais no sangue

Para a determinação das concentrações sanguíneas do selênio e dos metais as amostras foram armazenadas em *freezer* a -18ºC por 5 meses até o momento das dosagens. As análises foram realizadas com a utilização do equipamento ELAN DRC II da Perkin Elmer. O método utilizado para as dosagens foi o de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) de acordo com Palmer *et all* (2006). Para as análises, as amostras de sangue foram diluídas 1:50 em HNO_3 bi destilado 0,5% e triton® 0,01%.

Foram elaboradas curvas de calibração com calibradores da Prekin® nas concentrações de 1, 5, 10, e 20 parte por bilhão (ppb) dos metais analisados: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), Manganês (Mn), Zinco (Zn), cobre (Cu) e o não metal selênio (Se). Como padrão interno, para correção das flutuações do aparelho, foi utilizado o irídio (Ir) na concentração de 10ppb.

As condições operacionais da análise estão descritas no quadro abaixo:

RF (tensão)	1.1 KW
Fluxo do gás nebulizador	Entre 0,8 e 1,0 L / min. (otimizado diariamente)
Gás plasma	15 L/min.
Gás auxiliar	1.1 L/min.
Modo de detecção	Dual
Unidade de medida	Contagem por segundo
Tipo da curva	Linear com o zero
Unidade das amostras	Parte por bilhão (ppb)
Número de leituras por análise	20 por replicata
Número de replicatas	03

Resultados

4.1 Resultados das atividades da enzima acetilcolinesterase.

A tabela 4 apresenta valores da atividade da colinesterase eritrocitária em indivíduos residentes na zona urbana que não são expostos ocupacionalmente aos defensivos agrícolas e fertilizantes. A média desse grupo encontra-se dentro do intervalo de normalidade para o método (0,56-0,95 ΔpH/h)

Tabela 4. Atividade da acetilcolinesterase (ΔpH/h) em indivíduos residente na zona urbana não expostos ocupacionalmente aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Amostra	pH1	pH2	Resultado (ΔpH/h)
1	8,08	7,21	0,87
2	8,06	7,29	0,77
3	8,09	7,23	0,86
4	8,10	7,40	0,70
5	8,12	7,33	0,79
6	8,05	7,15	0,90
7	8,09	7,22	0,87
8	8,08	7,39	0,69
9	8,03	7,39	0,64
10	8,02	7,26	0,76
11	8,09	7,31	0,78
12	8,11	7,27	0,84
13	8,07	7,46	0,61
14	8,15	7,32	0,83
15	8,09	7,47	0,62
16	8,05	7,49	0,56
17	8,13	7,52	0,61
18	8,04	7,38	0,66
19	8,11	7,47	0,64
20	8,09	7,49	0,60
21	8,12	7,58	0,54
22	8,16	7,25	0,91
23	8,09	7,43	0,66
24	8,04	7,18	0,86
25	8,12	7,37	0,75
26	8,10	7,25	0,85
27	8,09	7,61	0,48
28	8,12	7,46	0,66
29	8,08	7,57	0,51
30	8,06	7,45	0,61
			Média: 0,71

Os resultados da atividade da colinesterase eritrocitária em trabalhadores rurais antes da exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes apresentaram valores (tabela 5), em média, dentro do intervalo de referência (0,56–0,95ΔpH/h) para o método utilizado.

Tabela 5. Atividade da acetilcolinesterase (ΔpH/h) em trabalhadores rurais antes da exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Amostra	pH1	pH2	Resultado (ΔpH/h)
1	8,06	7,22	0,84
2	8,09	7,34	0,75
3	8,07	7,14	0,93
4	8,12	7,40	0,72
5	8,10	7,37	0,73
6	8,13	7,44	0,69
7	8,11	7,33	0,78
8	8,10	7,31	0,79
9	8,14	7,47	0,67
10	8,09	7,41	0,68
11	8,13	7,29	0,84
12	8,05	7,20	0,85
13	8,10	7,51	0,59
14	8,09	7,25	0,84
15	8,14	7,63	0,51
16	8,12	7,48	0,64
17	8,08	7,50	0,58
18	8,13	7,58	0,55
19	8,06	7,49	0,57
20	8,11	7,47	0,64
21	8,17	7,55	0,62
22	8,08	7,23	0,85
23	8,13	7,51	0,62
24	8,04	7,52	0,52
25	8,15	7,46	0,69
26	8,07	7,19	0,88
27	8,14	7,72	0,42
28	8,09	7,33	0,76
29	8,06	7,38	0,68
30	8,03	7,32	0,71
31	8,05	7,46	0,59
32	8,09	7,38	0,71
			Média=0,69

A avaliação da atividade da colinesterase eritrocitária em trabalhadores rurais após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes apresentou valores (tabela 6), em média, dentro do intervalo de referência (0,56–0,95ΔpH/h) para o método utilizado.

Tabela. 6. Atividade da acetilcolinesterase (ΔpH/h) em trabalhadores rurais antes após a exposição aos defensivos agrícolas.

Amostra	pH1	pH2	Resultado (ΔpH/h)
1	8,08	7,16	0,92
2	8,14	7,38	0,76
3	8,06	7,12	0,94
4	8,10	7,60	0,50
5	8,08	7,57	0,51
6	8,12	7,65	0,47
7	8,09	7,30	0,79
8	8,16	7,36	0,80
9	8,08	7,40	0,68
10	8,16	7,69	0,47
11	8,09	7,20	0,89
12	8,09	7,26	0,83
13*	8,08	7,79	0,29
14	8,07	7,67	0,40
15	8,12	7,58	0,54
16	8,16	7,53	0,63
17*	8,11	7,80	0,31
18	8,16	7,62	0,54
19	8,13	7,48	0,65
20	8,12	7,45	0,67
21	8,14	7,51	0,63
22	8,09	7,28	0,81
23	8,10	7,48	0,62
24	8,14	7,55	0,59
25	8,09	7,42	0,67
26	8,12	7,17	0,95
27	8,09	7,70	0,39
28	8,12	7,32	0,80
29	8,15	7,58	0,57
30	8,13	7,71	0,42
31	8,15	7,78	0,37
32	8,12	7,50	0,62
			Média=0,64

A tabela 7 apresenta os resultados da dosagem da atividade da enzima acetilcolinesterase, em trabalhadores rurais, antes e após o ciclo de plantio e coleita, a porcentagem da atividade inicial da enzima e a depressão da atividade enzimática após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Tabela 7. Atividade da enzima acetilcolinesterase (ΔpH/h), porcentagem da atividade inicial e depressão da atividade inicial dessa enzima em trabalhadores rurais antes e após a exposição a um ciclo de plantio e colheita de várias culturas.

Amostra	Atividade enzimática pré-exposição (ΔpH/h)	Atividade enzimática pós-exposição (ΔpH/h)	% da atividade inicial	Depressão da atividade inicial (%)
1	0,84	0,92	109,52	-
2	0,75	0,76	101,33	-
3	0,93	0,94	101,07	-
4*	0,72	0,50	69,44	30,56
5*	0,73	0,51	69,86	30,14
6*	0,69	0,47	68,12	31,88
7	0,78	0,79	101,28	-
8	0,79	0,80	101,27	-
9	0,67	0,68	101,49	-
10*	0,68	0,47	69,12	30,88
11	0,84	0,89	105,95	-
12	0,85	0,83	97,65	2,35
13*	0,59	0,29	49,15	50,85
14*	0,84	0,40	47,62	52,38
15	0,51	0,54	105,88	-
16	0,64	0,63	98,44	1,56
17*	0,58	0,31	53,45	46,55
18	0,55	0,54	98,18	1,82
19	0,57	0,65	114,03	-
20	0,64	0,67	104,69	-
21	0,62	0,63	101,61	-
22	0,85	0,81	95,29	4,71
23	0,62	0,62	100,00	-
24	0,52	0,59	113,46	-
25	0,69	0,67	97,10	2,9
26	0,88	0,95	107,95	-
27	0,42	0,39	92,86	7,14
28	0,76	0,80	105,26	-
29	0,68	0,57	83,82	16,18
30*	0,71	0,42	59,15	40,85
31*	0,59	0,37	62,71	37,29
32	0,71	0,62	87,32	12,68

Legenda: (*) amostras que apresentam depressão maior ou igual a 30% da atividade enzimática inicial.

A figura 4 representa as médias e os desvios padrões das atividades enzimáticas dos moradores da área urbana e dos trabalhadores rurais antes da exposição. Podemos observar que não houve diferenças estatísticas entre as médias (p=0,5393).

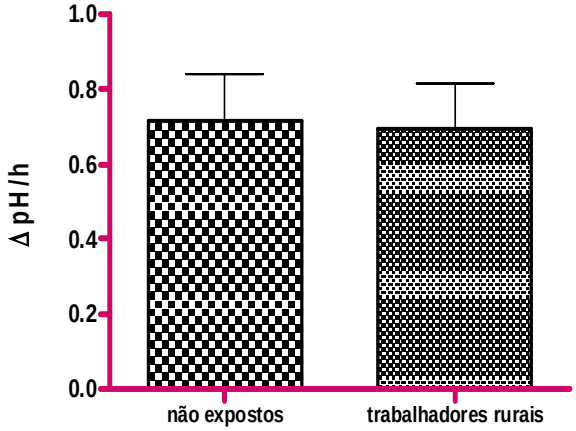

Figura 4. Médias e os desvios padrões das atividades enzimáticas dos moradores da área urbana (não expostos) e dos trabalhadores rurais antes da exposição.

A figura 5 representa as médias e os desvios padrões das atividades enzimáticas dos trabalhadores rurais após a exposição e dos moradores da área urbana. Podemos observar que após a exposição aos defensivos agrícolas ocorrem diferenças estatísticas significantes (p=0,031) entre as médias.

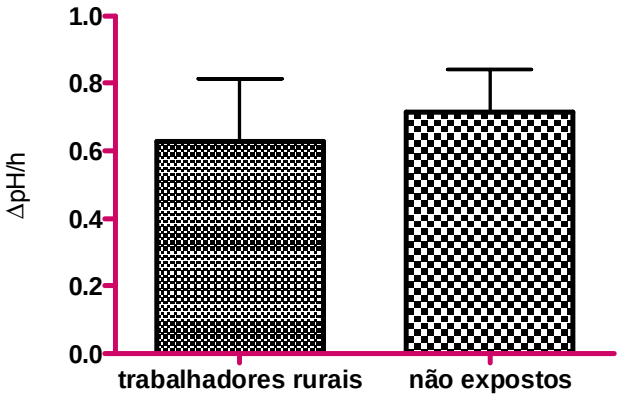

Figura 5. Médias e os desvios padrões das atividades enzimáticas dos trabalhadores rurais após a exposição e dos moradores da área urbana.

As médias e os desvios padrões das atividades das colinesterases eritrocitárias nos trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes estão representados na figura 6. Podemos observar que ocorrem diferenças estatísticas significantes (p=0,0075).

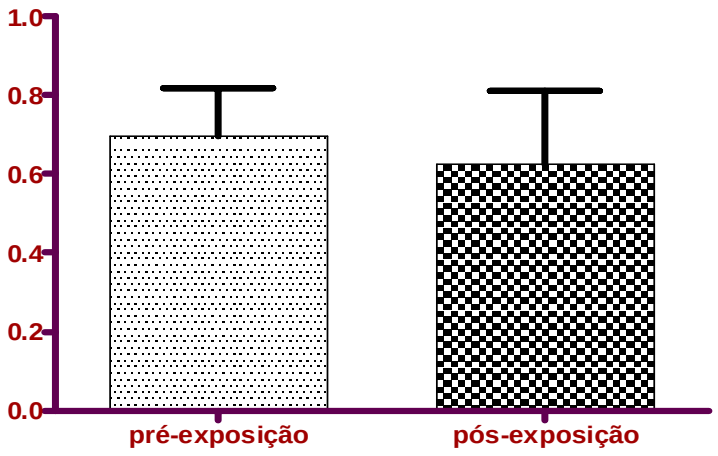

Figura 6. Médias e os desvios padrões das atividades das colinesterases eritrocitárias nos trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

4.2 Resultados dos hemogramas dos trabalhadores rurais

Os resultados dos hemogramas dos trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes estão descritos nas tabelas 8 e 9 respectivamente.

Tabela 8. Resultados dos hemogramas dos trabalhadores rurais antes da exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Amostra	SB	Bast	Seg	Eos	Bas	LT	Mon	Plaq	Eritr	Hb	Hema
1	8200	2	62	4	0	28	4	240000	4,2	13,0	39
2	9500	1	54	4	0	37	4	320500	4,3	13,0	39
3	9800	3	65	3	0	27	2	315000	4,8	14,6	44
4	7500	1	66	1	0	30	2	260000	4,6	14,0	42
5	6800	4	60	1	0	29	6	298000	4,5	13,6	41
6	7200	1	52	4	0	39	4	370000	4,7	14,3	43
7	8300	9	58	2	0	27	4	343000	4,9	15,0	45
8	9100	-	64	2	0	30	3	235000	4,6	14,0	42
9	9600	1	49	4	1	40	6	290000	4,4	13,3	40
10	9400	2	50	2	0	40	6	301600	4,9	15,0	45
11	8100	3	28	3	0	62	4	302200	4,5	13,6	41
12	4900	-	44	2	0	52	2	208000	4,7	14,3	43
13	8900	1	56	1	0	41	1	255200	4,4	13,3	40
14	6900	2	68	4	0	23	3	296000	4,5	13,6	41
15	4700	-	60	5	0	31	4	297000	4,8	14,6	44
16	4600	2	67	1	0	27	2	301000	4,6	14,0	42
17	7700	4	56	1	0	35	4	288000	4,3	13,0	39
18	6900	-	65	4	0	25	6	360000	4,8	14,6	44
19	8700	2	46	2	0	48	2	291000	4,2	12,6	38
20	6300	1	57	4	0	36	2	299000	4,5	13,6	41
21	4800	-	60	1	0	35	4	250000	4,1	12,3	37
22	6000	3	64	2	0	27	6	294000	4,4	13,3	40
23	5300	2	65	3	0	26	4	265000	4,9	15,0	45
24	6200	3	55	2	1	37	3	390000	4,5	13,6	41
25	5300	4	53	1	0	40	2	298000	4,7	14,3	43
26	7100	2	50	1	0	40	7	299000	4,6	14,0	42
27	6900	1	55	4	1	39	1	302000	4,8	14,6	44
28	7300	6	56	1	0	31	6	285000	4,5	13,6	41
29	6300	2	53	3	0	37	5	364000	4,0	12,0	36
30	6300	4	42	2	0	50	2	295000	4,3	13,0	39
31	5900	4	62	2	1	30	2	279000	4,8	14,6	44
32	9000	5	60	1	1	29	5	260000	4,7	14,3	43

Legenda: SB=Série Branca, Bast=Bastonetes, Seg=Segmentados, Eos=Eosinófilos, Bas=Basófilos, LT=Linfócitos típicos, Mon=Monócitos, Plaq=Plaquetas, Eritr=Eritrócitos, Hb=Hemoglobina, Hema=Hematócrito.

Tabela 9. Resultados dos hemogramas dos trabalhadores rurais após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Amostra	SB	Bast	Seg	Eos	Bas	LT	Mon	Plaq	Eritr	Hb	Hema
1	10900	1	63	3	0	30	3	322000	4,1	12,3	37
2	9300	2	50	5	0	40	3	300000	4,2	13,0	39
3	15000	5	75	2	0	16	2	279500	4,7	14,3	43
4	8200	2	65	1	1	30	2	210000	4,5	13,6	41
5	9600	-	65	3	0	30	2	217000	4,6	14,0	42
6	4600	2	48	2	0	45	3	233000	4,3	13,0	39
7	5000	11	60	-	0	28	1	262500	4,8	14,6	44
8	7200	1	63	3	0	32	1	332000	4,3	13,0	39
9	10000	-	18	4	1	76	2	212000	4,3	13,0	39
10	8100	1	56	4	0	36	3	289700	4,7	14,3	43
11	10000	2	34	1	0	60	3	391000	4,4	13,3	40
12	4000	1	45	3	0	50	1	238000	4,5	13,6	41
13	5500	1	53	4	0	40	2	261400	4,3	13,0	39
14	9600	1	69	5	0	23	2	244000	4,3	13,0	39
15	6200	1	60	4	1	33	2	273000	4,6	14,0	42
16	5400	1	68	2	0	27	2	240500	4,5	13,6	41
17	5000	1	55	3	0	40	1	252000	4,1	12,3	37
18	8200	1	70	5	0	23	1	310000	4,6	14,0	42
19	7200	1	29	4	0	64	2	238000	4,3	13,0	39
20	7600	3	53	2	0	40	2	277000	4,2	12,6	38
21	5400	1	59	1	0	38	1	203500	4,0	12,0	36
22	5100	1	67	3	0	26	3	313000	4,9	15,0	45
23	6200	1	70	5	1	20	4	200000	4,8	14,6	44
24	6200	1	50	4	0	42	3	288000	4,0	12,0	36
25	6400	2	50	1	0	43	4	263000	4,4	13,3	40
26	8900	1	48	2	0	46	3	250000	4,3	13,3	39
27	7500	2	57	3	1	37	1	201000	4,9	15,0	45
28	8800	1	53	2	0	40	4	270000	4,3	13,0	39
29	7200	1	55	4	0	39	1	318000	4,1	12,3	37
30	5900	3	40	3	0	53	1	290000	4,0	12,0	36
31	7700	2	61	4	0	30	3	248000	4,9	15,0	45
32	7900	4	61	3	0	30	2	248000	4,8	14,6	44

Legendas: SB=Série Branca, Bast=Bastonetes, Seg=Segmentados, Eos=Eosinófilos, Bas=Basófilos, LT=Linfócitos típicos, Mon=Monócitos, Plaq=Plaquetas, Eritr=Eritrócitos, Hb=Hemoglobina, Hema=Hematócrito.

Os resultados da avaliação da série vermelha (eritrócitos, hemoglobina e hematócrito) antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes, estão representados nas próximas três figuras. Podemos observar na figura 7 que os resultados das médias, antes e após a exposição, do número de eritrócitos apresentaram-se dentro do intervalo de normalidade para o método utilizado. Entretanto, ocorre uma diferença estatística significante entre as médias (p=0,0012) antes e após a exposição.

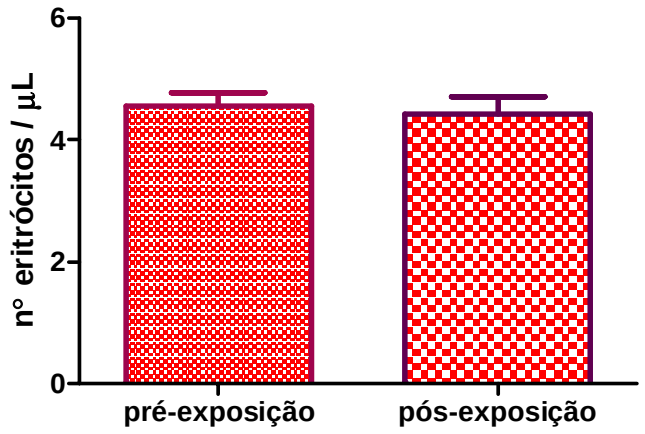

Figura 7. Médias e os desvios padrões do número de eritrócitos por microlitros em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Na figura 8 estão representados os valores médios da hemoglobina (Hb) nos trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes. Podemos observar nessa figura que os resultados das médias da Hb, antes e após a exposição, apresentaram-se dentro do intervalo de normalidade para o método utilizado. Entretanto, ocorre uma diferença estatística significante entre as médias (p=0,0021) antes e após a exposição.

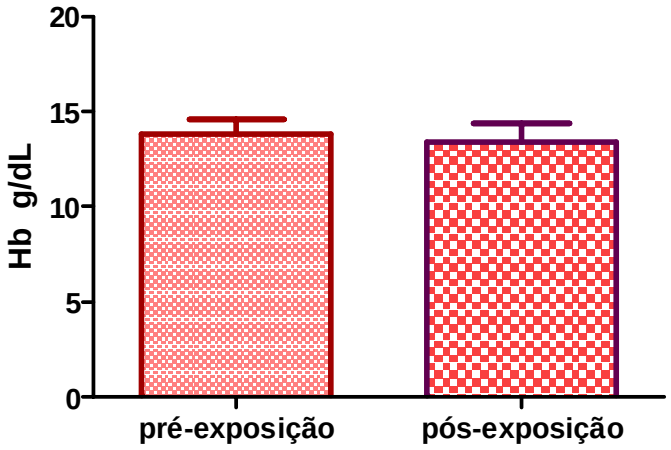

Figura 8. Médias e os desvios padrões da concentração de hemoglobina (Hb) em gramas por decilitros em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Na figura 9 estão representados os valores médios do hematócrito nos trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e

fertilizantes. Podemos observar nessa figura que os resultados das médias do hematócrito, antes e após a exposição, apresentaram-se dentro do intervalo de normalidade para o método utilizado. Entretanto, ocorre uma diferença estatística significante entre as médias (p=0,0021) antes e após a exposição.

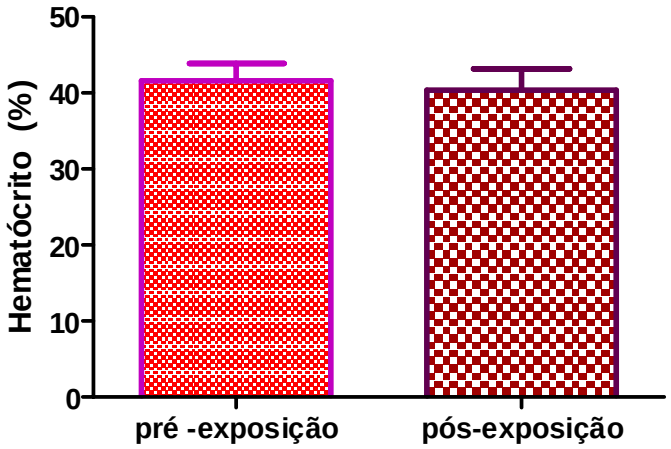

Figura 9. Médias e os desvios padrões do hematócrito, expresso em porcentagem (%), em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Os resultados da avaliação da série branca (leucócitos) antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes estão representados nas próximas duas figuras. Podemos observar na figura 10 que os resultados das médias, antes e após a exposição, do número de leucócitos apresentaram-se dentro do intervalo de normalidade para o método utilizado. Não houve, nesse caso, diferenças estatísticas significantes (p=0,3539) no número de leucócitos antes e após a exposição.

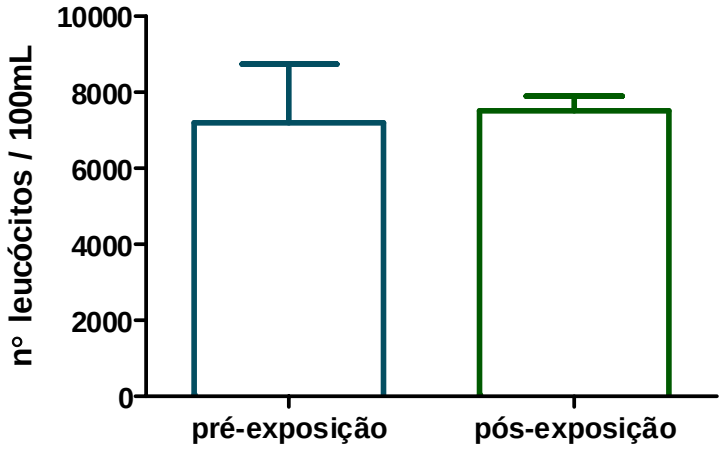

Figura 10. Médias e os desvios padrões do número de leucócitos por 100mL, em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Na figura 11 está representado as porcentagens (%) das células brancas bastonetes (Bast.), segmentados (Seg.), eosinófilos (Eos.), linfócitos (Linf.), monócitos (Mon.) e basófilos (Bas.) nos trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes. Podemos observar nessa figura que os resultados das médias dessas porcentagens, antes e após a exposição, apresentaram-se dentro do intervalo de normalidade para o método utilizado. Entretanto, ocorre uma diferença estatística significante entre as médias da porcentagem de células no caso dos eosinófilos (p=0,0127) e monócitos (p=0,0001).

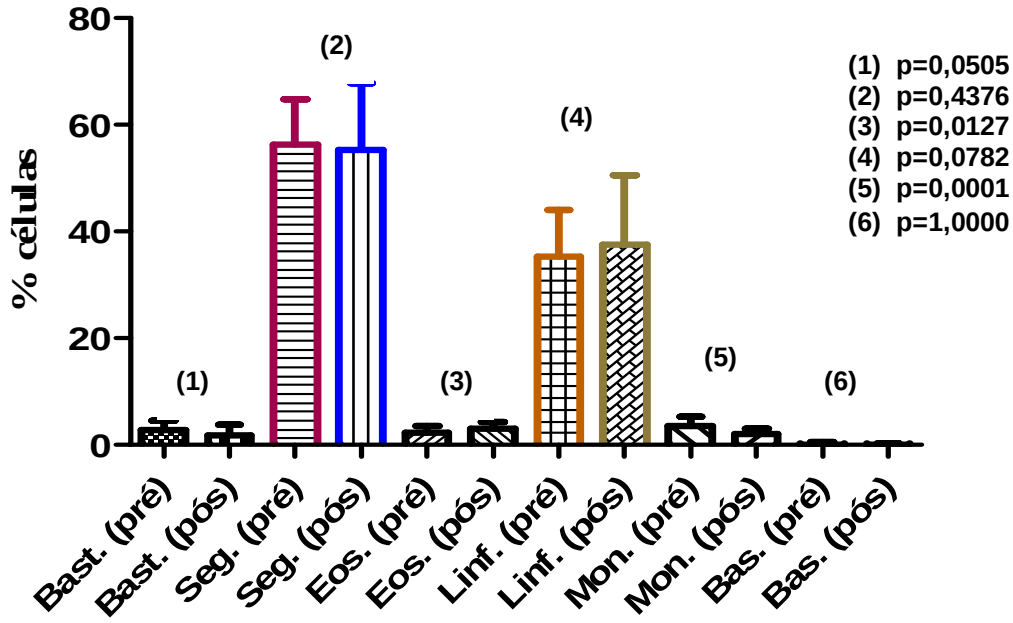

Figura 11. Médias e os desvios padrões das porcentagens das células brancas: bastonetes (Bast.), segmentados (Seg.), eosinófilos (Eos.), linfócitos (Linf.), monócitos (Mon.) e basófilos (Bas.), em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Na figura 12 está representado o número de plaquetas por mL, nos trabalhadores rurais, antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes. Podemos observar nessa figura que os resultados dessas médias, antes e após a exposição, apresentaram-se dentro do intervalo de normalidade para o método utilizado. Entretanto, ocorre uma diferença estatística significante entre elas (p=0,0026).

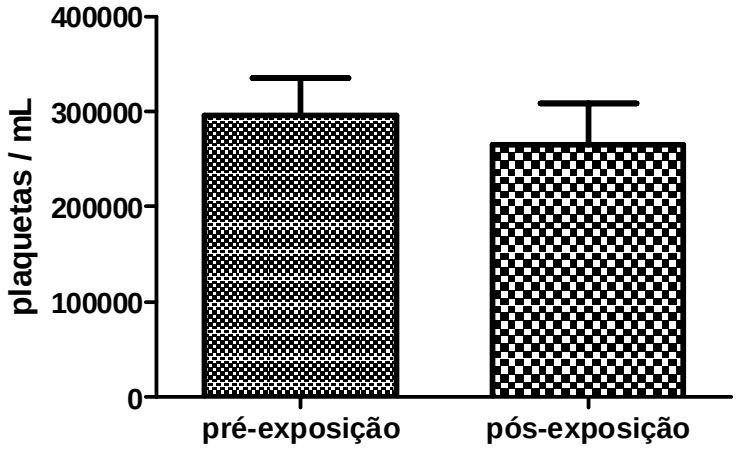

Figura 12. Médias e os desvios padrões do número de plaquetas por mL, em trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

4.3 Resultados das dosagens sanguíneas dos metais arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e o não metal selênio (Se) nos trabalhadores rurais e na população urbana.

A tabela 10 apresenta os resultados das dosagens das concentrações sanguíneas dos metais arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e o não metal selênio (Se) nos trabalhadores rurais após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes. As concentrações sanguíneas dos metais arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e o não metal selênio (Se) na população urbana, não exposta ocupacionalmente, estão apresentados na tabela 11.

Tabela 10. Concentrações sanguíneas, em parte por bilhão (ppb), dos metais arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e o não metal selênio (Se) nos trabalhadores rurais após exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Amostra	As (ppb)	Cd (ppb)	Pb (ppb)	Mn (ppb)	Zn (64) (ppb)	Zn (66) (ppb)	Cu (63) (ppb)	Cu (65) (ppb)	Se (ppb)
1	16,666	-	10,734	11,479	10285,673	10365,086	1300,101	1248,872	79,292
2	16,666	0,343	21,679	10,149	7108,765	7150,897	715,359	662,124	62,720
3	4,313	0,079	33,726	15,975	8608,941	8683,407	1021,278	970,137	55,952
4	6,580	-	47,954	13,524	5598,037	5582,790	1067,922	1007,117	77,588
5	5,529	-	35,844	16,63	10290,051	10355,320	876,298	834,116	69,433
6	5,749	-	20,305	13,908	6473,718	6486,730	1353,706	1281,863	66,494
7	5,191	0,261	45,853	14,496	8560,508	8619,403	1153,437	1096,917	62,067
8	4,967	0,012	17,163	13,091	7047,055	7077,724	1614,817	1666,031	77,904
9	3,921	-	17,965	8,316	6215,97	6208,466	1503,911	1453,186	63,851
10	12,628	0,256	21,844	13,84	8109,44	8113,909	1298,933	1249,512	69,069
11	3,473	-	18,836	13,302	6010,794	6008,505	1220,467	1170,367	56,808
12	4,378	-	21,735	15,385	6369,073	6375,995	853,638	807,953	78,954
13	4,042	-	14,606	10,019	6030,516	6045,748	1372,229	1311,396	68,712
14	3,602	-	29,767	19,827	8905,875	8948,870	1316,618	1269,958	66,157
14	3,764	-	17,134	13,67	8471,32	8503,344	1426,473	1378,282	48,150
16	4,804	0,030	18,689	11,838	6293,602	6327,898	1241,83	1186,377	64,619
17	3,430	-	26,568	11,257	6465,499	6475,076	1123,444	1048,293	59,590
18	6,825	-	19,797	9,693	7680,911	7701,492	876,647	827,344	52,002
19	4,344	-	17,624	12,527	6242,83	6257,683	1001,312	944,292	62,790
20	21,439	0,082	9,889	11,036	9670,397	9720,733	892,178	830,258	65,164
21	3,680	-	15,24	7,125	7614,133	7659,188	770,725	735,392	94,134
22	7,233	0,172	21,714	15,848	11308,974	11405,566	1539,116	1483,372	66,482
23	25,762	-	15,183	11,885	7259,729	7288,594	1170,517	1127,098	85,860
24	4,318	-	24,425	15,676	9069,977	9107,270	1350,657	1304,167	67,332
25	6,062	0,101	31,389	17,567	10800,309	10901,415	1410,584	1339,900	78,594
26	3,742	0,235	37,35	21,43	11437,071	11500,311	1219,641	1156,247	73,732
27	8,632	0,190	41,815	28,231	6454,104	6433,837	1212,4	1165,931	65,674
28	6,547	0,072	23,057	14,703	8212,586	8249,939	985,185	947,451	71,071
29	6,502	-	33,409	16,548	6989,569	7027,09	1036,075	990,091	75,804
30	3,842	0,133	30,241	13,703	17822,602	17971,022	1441,146	1364,241	51,849
31	5,166	0,183	28,6	9,181	5535,624	5539,252	1029,619	985,556	66,155
32	4,740	0,639	76,246	10,434	7618,605	7665,871	932,684	892,097	73,391
33	19,988	0,058	34,212	9,532	7616,731	7677,557	755,94	723,382	67,313

Legenda: (-) Não foi possível dosar.

Tabela 11. Concentrações sanguíneas, em parte por bilhão (ppb), dos metais arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e o não metal selênio (Se) na população urbana, não exposta ocupacionalmente aos defensivos agrícolas e fertilizantes.

Amostra	As (ppb)	Cd (ppb)	Pb (ppb)	Mn (ppb)	Zn (64) (ppb)	Zn (66) (ppb)	Cu (63) (ppb)	Cu (65) (ppb)	Se (ppb)
1	3,759	-	20,718	8,171	7137,457	7147,763	922,059	879,650	154,791
2	3,421	0,044	24,394	10,744	6668,702	6707,731	1143,385	1102,237	97,520
3	4,068	0,074	10,917	13,341	5833,014	5852,766	1215,445	1166,871	97,046
4	4,490	-	20,763	10,106	5489,339	5474,502	1503,457	1447,645	112,943
5	4,288	0,033	26,590	18,676	7474,222	7507,005	1341,189	1289,336	122,929
6	3,346	-	19,907	8,197	6999,289	7031,653	951,910	907,744	131,388
7	3,653	-	33,514	5,834	5331,372	5324,947	839,973	800,602	80,238
8	6,548	0,062	26,838	13,582	6736,425	6764,964	1160,051	1111,608	99,758
9	3,798	-	40,670	5,361	5782,183	5800,048	846,456	812,675	45,330
10	3,601	-	22,416	7,466	5820,553	5826,236	850,398	803,509	89,514
11	3,887	-	17,839	6,627	5587,326	5564,555	884,642	840,846	78,942
12	3,864	-	21,849	10,489	6272,415	6266,708	1060,979	1009,912	92,834
13	3,913	-	24,713	6,646	6524,350	6544,600	1047,133	1007,190	93,323
14	3,472	-	19,462	9,368	6594,209	6622,230	1028,984	991,610	92,704
14	3,821	0,028	15,481	5,457	5977,900	5988,063	1183,951	1139,094	85,936
16	3,779	-	13,179	11,251	4538,815	4516,353	1217,830	1169,624	93,550
17	3,955	-	12,477	6,946	5475,880	5483,285	1276,565	1236,058	132,501
18	3,385	0,012	28,636	7,449	4469,722	4477,226	906,747	871,720	88,702
19	4,261	0,084	37,554	9,982	7969,832	8038,837	1443,547	1410,670	136,737
20	4,487	-	19,514	8,350	5349,849	5348,638	1173,721	1124,550	114,218
21	3,912	-	15,407	11,101	5107,212	5093,022	1075,505	1029,958	102,364
22	3,319	0,038	13,582	6,523	5552,289	5554,899	872,928	831,763	90,388
23	4,185	-	36,660	8,181	5225,087	5219,886	882,590	842,678	90,330

Legenda: (-) Não foi possível dosar.

A figura 13 apresenta os valores médios e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de arsênio na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais. As médias desses grupos apresentaram diferenças estatísticas significantes (p=0,0088).

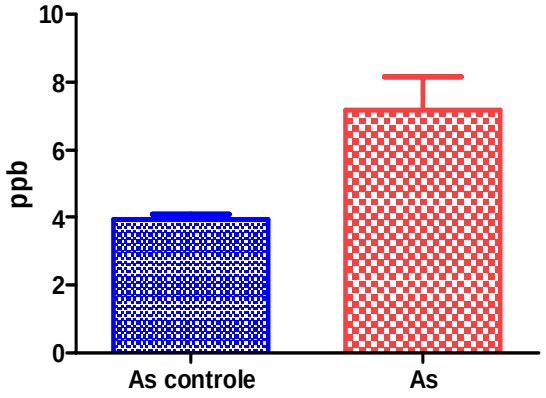

Figura 13. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de arsênio (As) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais.

A figura 14 apresenta os valores médios e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de cádmio na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais. As médias desses grupos apresentaram diferenças estatísticas significantes (p=0,0277).

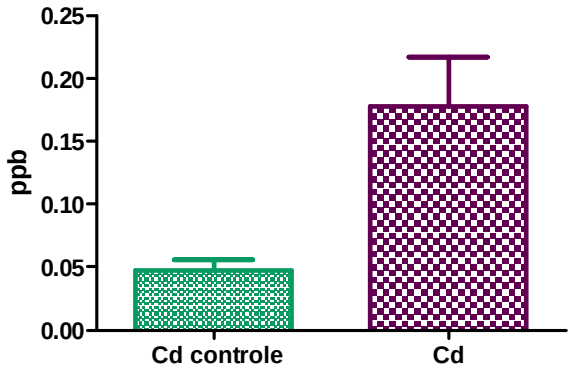

Figura 14. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de cádmio (Cd) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais.

A figura 15 apresenta os valores médios e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de chumbo na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais. As médias desses grupos não apresentaram diferenças estatísticas significantes (p=0,2089).

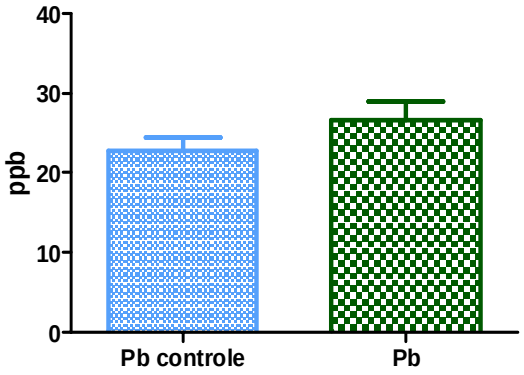

Figura 15. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de chumbo (Pb) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais.

A figura 16 apresenta os valores médios e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de manganês na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais. As médias desses grupos apresentaram diferenças estatísticas significantes (p=0,0001).

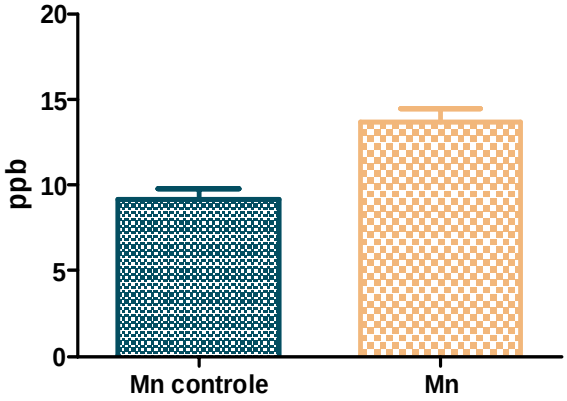

Figura 16. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de manganês (Mn) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais.

A figura 17 apresenta os valores médios e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de Zinco 64 na população urbana (controle) e nos

trabalhadores rurais. As médias desses grupos apresentaram diferenças estatísticas significantes (p=0,0002).

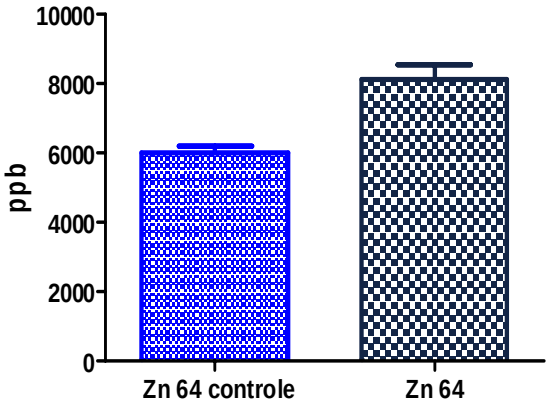

Figura 17. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de zinco 64 (Zn 64) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais.

A figura 18 apresenta os valores médios e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de Zinco 66 na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais. As médias desses grupos apresentaram diferenças estatísticas significantes (p=0,0002).

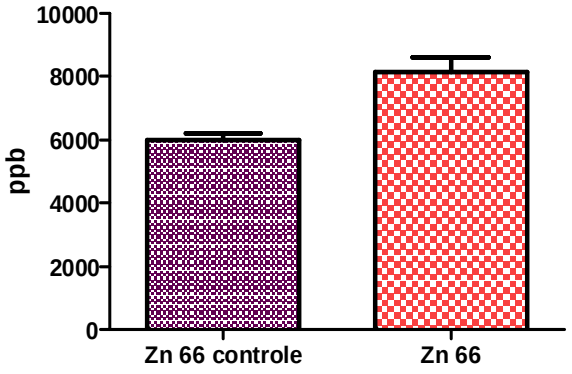

Figura 18. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de zinco 66 (Zn 66) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais.

A figura 19 apresenta os valores médios e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de cobre 63 na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais. As médias desses grupos não apresentaram diferenças estatísticas significantes (p=0,2278).

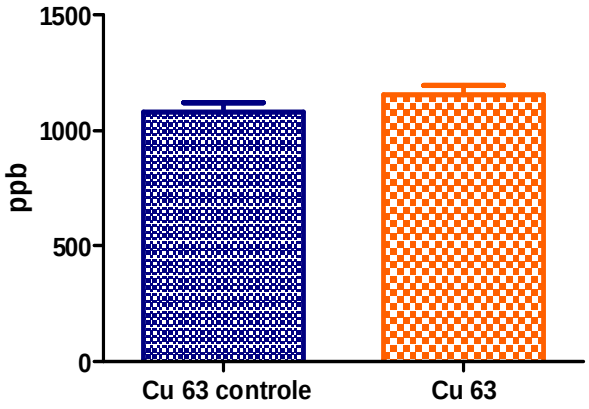

Figura 19. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de cobre 63 (Cu 63) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais.

A figura 20 apresenta os valores médios e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de cobre 65 na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais. As médias desses grupos não apresentaram diferenças estatísticas significantes (p=0,2662).

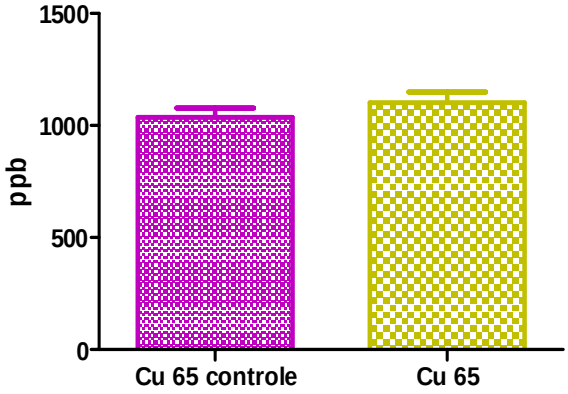

Figura 20. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de cobre 65 (Cu 65) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais.

A figura 21 apresenta os valores médios e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de selênio na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais. As médias desses grupos apresentaram diferenças estatísticas significantes (p=0,0001).

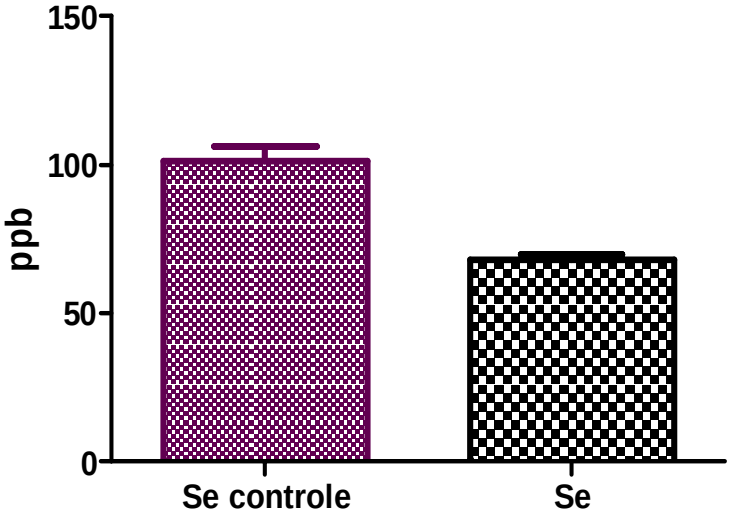

Figura 21. Médias e os desvios padrões das concentrações sanguíneas de selênio (Se) na população urbana (controle) e nos trabalhadores rurais.

Discussão

A análise dos resultados da dosagem da atividade da enzima acetilcolinesterase na população urbana (grupo A) demonstra que, sua média (0,71ΔpH/h), encontra-se dentro do intervalo de normalidade (0,56–0,95ΔpH/h) para o método utilizado (tab. 4). Entretanto, as avaliações individuais dos resultados demonstram que as amostras 21, 27 e 29 encontram-se um pouco abaixo do limite inferior do método: 0,54, 0,48, 0,51 ΔpH/h respectivamente. Esses valores isolados não tem significado clínico importante devido a grande variação da atividade dessa enzima entre os indivíduos. A utilização da atividade da colinesterase eritrocitária como um indicador biológico de intoxicação com inseticidas agrícolas que inibem a atividade dessa enzima, como é o caso dos organofosforados e carbamatos, tem grande importância na clínica médica quando associados aos sinais e sintomas (colinérgicos) que o paciente apresenta.

Os trabalhadores rurais (grupo B), antes da exposição, apresentaram um valor médio da atividade enzimática (0,69 ΔpH/h) dentro do intervalo de referência (0,56–0,95ΔpH/h) para o método (tab. 5). No entanto, como no grupo A, as amostras 15, 18, 24 e 27 apresentaram valores 0,51, 0,57, 0,52 e 0,42ΔpH/h que estão abaixo do limite inferior. Quando analisamos e comparamos as médias das atividades enzimáticas do grupo A e grupo B (antes da exposição), podemos observar que não há diferenças estatísticas significantes (p=0,5393) (fig. 4).

No grupo B, após a exposição, o valor médio da atividade da acetilcolinesterase (0,64ΔpH/h) encontra-se dentro dos limites de normalidade do método (0,56–0,95ΔpH/h), entretanto, doze amostras 4, 5, 6, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 27, 30 e 31 apresentaram valores 0,50, 0,51, 0,47, 0,47, 0,29, 040, 0,54, 0,31, 0,54, 0,39, 0,42 e 0,57ΔpH/h, respectivamente, abaixo do limite inferior do método (tab. 6). A análise estatística das médias dos grupos A e B (após exposição), assim como, do grupo B (antes da exposição) e B (após a exposição) apresentaram diferenças estatísticas significantes: p=0,0331 e p=0,0075 respectivamente (fig. 5 e fig.6).

A análise individual de cada resultado do grupo B, antes e após a exposição, demonstra que as amostras 4, 5, 6, 10, 13, 14, 17, 30 e 31, após a exposição, apresentaram uma depressão da atividade enzimática inicial maior ou igual a 30% (tab. 7). Esses dados sugerem que o manejo dos defensivos

agrícolas e fertilizantes, pelos trabalhadores rurais, durante o plantio e a colheita, pode ter sido inadequados gerando uma absorção suficiente de organofosforados e carbamatos, para causar uma inibição significativa na atividade enzimática após a exposição.

De acordo com Meirelles (2005) os defensivos agrícolas englobam uma grande quantidade de substâncias químicas. Essas substâncias estão agrupadas de acordo com sua ação, que pode ser inseticida, herbicida ou fungicida. Esses compostos apresentam estruturas químicas diferentes e mecanismos de toxicidade bastante variados. Os inseticidas organofosforados e carbamatos apresentam ação tóxica através da inibição da atividade das enzimas acetilcolinesterase, colinesterase plasmática e neuroesterase. Como esses inseticidas são sempre empregados como defensivos agrícolas, a avaliação da atividade dessas enzimas é muito importante para a monitorização das exposições de trabalhadores rurais aos defensivos agrícolas, de um modo geral, e aos fertilizantes.

A dosagem da atividade das três colinesterases pode ser utilizada, de acordo com a legislação, como indicador biológico de exposição aos defensivos agrícolas. Entretanto, a dosagem da atividade da acetilcolinesterase deve ser a de escolha porque a depressão de sua atividade é a que apresenta maior correlação com o processo de intoxicação. Na monitorização biológica dos trabalhadores expostos, a atividade enzimática deve ser determinada antes e após a exposição. De acordo com a legislação trabalhista brasileira (NR-7) uma depressão maior ou igual a 30% da atividade inicial da acetilcolinesterase determina o afastamento do trabalhador de sua função.

A monitorização biológica de trabalhadores expostos a inseticidas inibidores da acetilcolinesterase poderia ser realizada também através da determinação das concentrações plasmáticas desses inseticidas por métodos cromatográficos. Entretanto, esses métodos de dosagem plasmática apresentam alguns aspectos que dificultam, na prática, sua utilização. Um fator importante que limita o uso desses métodos de dosagem é a sua complexidade que restringe a sua aplicação apenas em grandes centros, longe das áreas agrícolas. Aliado a esse fator, encontra-se uma questão relacionada a toxicocinética dos organofosforados e carbamatos. A meia-vida desses

compostos é extremamente curta, e, de acordo com Alonzo & Corrêa (2003), após administração única, pode variar de minutos a poucas horas, dependendo do composto e da via de entrada, sendo que, 80 a 90% da dose absorvida é eliminada em 48 horas.

Os hemogramas dos trabalhadores rurais antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes apresentaram parâmetros hematimétricos dentro dos valores de referência da metodologia empregada (tab. 8 e tab. 9). Entretanto, as médias dos eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, antes e após a exposição, apresentaram diferenças estatísticas significantes: p=0,0012, p=0,0021 e p=0,0014 respectivamente (fig.7, fig.8 e fig.9). No entanto, essas variações ocorreram dentro do intervalo de referência de normalidade, não apresentando dessa forma um significado clínico importante.

Antes e após a exposição, os hemogramas apresentaram todos os seus parâmetros dentro dos intervalos de normalidade para o método. Esse fato demonstra que, esse exame isolado não é adequado para o acompanhamento das exposições de trabalhadores expostos a defensivos agrícolas e fertilizantes.

As médias entre os números de leucócitos (fig.10), antes e após a exposição, não apresentaram significado estatístico significante: p=0,3539. A análise dos resultados das porcentagens (%) das células brancas apresentou diferenças estatísticas significantes entre os eosinófilos e monócitos com p=0,0127 e p=0,0001 respectivamente (fig. 11). Entretanto, os valores médios das porcentagens (%) dessas células antes e após a exposição apresentaram-se dentro dos limites de referência do método.

Os valores das médias de plaquetas (fig. 12), nos trabalhadores rurais, antes e após a exposição, estão dentro da faixa de normalidade. Entretanto, após a exposição, houve uma diminuição no número dos trombócitos, sendo que, as médias apresentaram diferenças estatísticas significantes: p=0,0026. De acordo com Ziemen (1984) em intoxicações graves com organofosforados e carbamatos pode ocorrer trombocitopenia, com um aumento na tendência ao sangramento devido a uma alteração na função plaquetária.

A análise dos resultados (tab. 10 e tab. 11) das dosagens dos metais arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), Manganês (Mn), Zinco 64 (Zn 64), zinco 66 (Zn 66), cobre 63 (Cu 63) e cobre 65 (Cu 65) e do não metal selênio (Se), nos moradores da área urbana (grupo A) e dos trabalhadores rurais (grupo B) apresentaram diferenças para a maioria dos elementos analisados.

As concentrações médias dos metais As, Cd, Mn, Zn 64 e Zn 66 apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os grupos A e B: p=0,0088, p=0,0277, p=0,0001, p=0,0002 e p=0,0002 respectivamente (Fig. 13, Fig.14, Fig. 16, Fig. 17 e Fig. 18). A concentração sanguínea maior desses metais no grupo B pode estar associada ao manejo inadequado dos defensivos agrícolas e fertilizantes pelos trabalhadores rurais.

De acordo com Sharpley & Menzel (1987) metais pesados como Cd, Cr, Pb e Hg, incluindo-se os micronutrientes Fe, Cu e Mn estão presentes nos fertilizantes, principalmente fosfatados. Isso é resultado da ocorrência natural de vários metais pesados em rochas fosfáticas e de não serem eliminados no processo de manufatura. No momento da aplicação dos fertilizantes nas lavouras, como eles são pulverizados, pode ocorrer a absorção pela via pulmonar. O solo também é contaminado por metais pesados devido a aplicação dos fertilizantes. Essa contaminação parece pequena, mas requer um monitoramento, pois o seu uso é mais amplamente disseminado que os outros agroquímicos (Amaral Sobrinho et al., 1996).

As concentrações médias de Pb, Cu 63 e Cu 65 não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre suas médias (Fig. 15, Fig. 19 e Fig. 20). O não metal Se apresentou uma concentração média maior na população urbana do que nos trabalhadores rurais (Fig. 21).

A função mais conhecida do selênio é a de antioxidante, ele encontra-se associado a enzima glutationa peroxidase. Além de atuar na detoxificação do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos, a glutationa peroxidase atua também na manutenção de grupos sulfidrilas vitais na forma reduzida, na síntese de hormônios derivados do ácido araquidônico e no metabolismo de compostos estranhos ao organismo, por exemplo, compostos aromáticos derivados de plantas e inseticidas; atua, ainda, como co-fator no metabolismo de certos aldeídos, por exemplo, o formaldeído e o

metilglioxal e, supostamente, no transporte de alguns aminoácidos nos rins (1–4). Recentemente, constatou-se que o selênio é um constituinte da 5'-iodinase, enzima atuante no metabolismo dos hormônios da tireóide, e que as síndromes de deficiência de iodo são mais graves quando há deficiência simultânea de selênio (Silva, 1993).

Os resultados da análise da atividade da enzima acetilcolinesterase aliados aos resultados das concentrações dos metais dosados no sangue dos trabalhadores rurais indicam que as exposições ocupacionais desse grupo aos defensivos agrícolas e fertilizantes estão sendo responsáveis pela absorção de vários compostos tóxicos, por exemplo, inseticidas inibidores das colinesterases e metais pesados. Essas exposições, ao longo do tempo, poderão ser responsáveis por danos à saúde desses trabalhadores.

No período de tempo analisado nesse trabalho, podemos observar que os hemogramas dos trabalhadores rurais não apresentaram alterações antes e após a exposição aos defensivos agrícolas e fertilizantes. Esse dado é importante para mostrar que o hemograma não deve ser utilizado como exame único no controle da exposição a esses compostos. No entanto, a dosagem da atividade das colinesterases é um indicador apropriado para a monitorização dessas exposições.

Uma alternativa para diminuir os riscos da exposição de trabalhadores rurais aos defensivos agrícolas e fertilizantes, seria a utilização correta dos equipamentos de proteção individual (EPI's) pelos trabalhadores. Esses equipamentos são compostos por mascaras, óculos de proteção, jalecos longos e luvas. O principal problema é a temperatura, que em grande parte do país, na época do plantio e colheita, encontra-se elevada, causando um imenso desconforto no seu uso.

Conclusão

A depressão da atividade da enzima acetilcolinesterase demonstrou que, nas exposições desses trabalhadores, ocorreu absorção de inseticidas inibidores das colinesterases, assim como, a dosagem dos metais demonstrou que deve estar ocorrendo sua absorção devido a exposição aos fertilizantes e defensivos agrícolas.

A determinação da atividade da colinesterase eritrocitária é um indicador biológico adequado para a monitorização de trabalhadores expostos aos defensivos agrícolas e fertilizantes. Entretanto, o hemograma não deve ser utilizado como exame único para acompanhar exposições a esses compostos químicos.

Referências Bibliográficas

ADKINS, S., GAN, K. N., MODY, M., LA DU, B. N. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. **Am. J. Hum. Genet.** 1993, 52: 598-608.

ALONZO, H. G. A. & CORRÊA, C. L. Praguicidas. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo, Brasil. Editora Atheneu, 2º ed., 2003, p. 439-441.

BARON, R. L. Carbamates insecticides. In: Hayes, W. R.; Laws, E. R. **Handbook of Pesticides Toxicology**. San Diego, California, USA. Academic Press, Inc., 3, 1991, p. 1125-1190.

BRASIL 2006. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica de Saúde do Trabalhador. Diretrizes para Atenção Integral à Saúde do Trabalhador de Complexidade Diferenciada. Brasília.

BROWN, J. H. & TAYLOR, P. Agonist and antagonist of muscarinic receptors. In: Joel G. Hardman and Lee E. Limbird. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York, USA. The McGraw-Hill Companies, Inc. 9º ed. 1996, p. 103-117.

CARLTON, F. B.; SIMPSON, W. M. & HADDAD, L.M. The organophosphate and others insecticides. In: Haddad, L. M., Shannon, M. W., Winchester, J. F. **Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose**, Philadelphia, Pensylvania, USA. WB Saunders Company, 3º ed. 1998, p. 836-850.

GALLO, M. & LAWRYK, N. Organic Phosphorus Pesticides. In: Hayes, W. J.; Laws, E. R. **Handbook of Pesticide Toxicology**. San Diego, California, USA. Academic Press, Inc., 2, 1991, p. 917-1124.

GOYER, R. A. & CLARKSON, T. W. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C. D. **Casarett and Doull's. Toxicology: The basic science of poisons**. New York, USA. The McGraw-Hill Companies, Inc. 6º ed. 2001, p. 811-867.

HUMBERT, R., ADLER, D. A., DISTECHE, C. M., HASSETT, C., OMIECINSK, C. J., and FURLONG, C. E. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. **Nat. Genet.**, 1993, 3: 73-76.

JARUP, L., BERGLUND, M., ELINGER, C. G. Health effects of cadmium exposure: a review of its literature and a risk estimation. **Scand. J. WorK Environ Health** 24:1-51, 1998.

JARUP, L., ELINGER, C. G., SPANG, G. Cumulative blood-cadmiun and tubular proteinuria: a dose response relantionship. Int. Arch. Occup. Environ Health 60:223-229, 1998.

JEYARATNAM, J.; MARONI, M. Organophosphorous compounds. **Toxicology**, 91, p. 15-27, 1994.

KULAIF Y. A nova configuração da indústria de fertilizantes fosfatados no Brasil. Rio de Janeiro: CETEM / CNPq; 1999. (Série Estudos e Documentos, 42).

LARINI, L. Inseticidas. In: Larini, L. **Toxicologia dos Praguicidas**, 2º ed. São Paulo; Editora Manole LTDA,; 1993, p. 136-163.

LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER,L.; ATHENS, J.W. & LUKENS, J.N. **WINTROBE. Clinical hematology**. 11.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 2004.

LOGUE, J., KOONTS, M., HATTWICK, A. Historical prospectivemortality study of workers in copper and zinc refineries. **J. Occup. Med.** 24:398-408, 1982.

MENDES, R. **Patologia do trabalho**. 1º ed. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu, 1995.

MEIRELLES, L. C. O papel da ANVISA na regulação e controle dos agrotóxicos. Seminário Nacional de Vigilância do Câncer Ocupacional e Ambiental**.** **Apresentação oral**. Rio de Janeiro, 2005.

MICHEL, H. O. An electrometric method for the dtermination of blood cell and plasma cholinesterase activity. J. Lab. Clin. Med. 34:1564-8. 1949.

MORAES, G. F. ; *et al*. Intoxicação Exógena por Chumbinho (*Aldicarb* ?): Abordagem Clínica, Laboratorial e Terapêutica. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 8, (1): 297, 1995.

MORAES, A. C. L.; *et al*. Intoxicações Agudas por Pesticidas na Infância: Revisão Clínico-Terapêutica. In: **I Congresso Internacional de Segurança na Infância e Adolescência.** Niterói. Rio de Janeiro, Anais, Niterói, 1998.

MORTENSEN, M. L. Management of Acute Childhood Poisoning Caused by: Selected Insecticides and Herbicides. **Pediatric Clinics of North America**, 33 (2): 421-432, 1986.

PALMER, C. D., LEWIS Jr, M. E., GERAGHTY, C. M., BARBOSA Jr, F., PARSONS, P. J. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: a comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry ant atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta** Part B 61: 980-990, 2006.

QUINBY, G. E. & WASH, W. Further Therapeutic Experience With Pralidoximes I Organic Phosphorus Poisoning, **JAMA**, 187 (3): 114-118, 1964.

ROSATI, J. L. R.; DUTRA, A. A. M.; MORAES, A. C. I.; FERREIRA, M. C. L.; & ROCHA, L. F. R. Intoxicação por Carbamatos e Organofosforados. **JBM**, 69 (3): 73-96, 1995.

SAADEH, A. M.; *et al.* Clinical and Sociodemographic Features of Acute Carbamate and Organophosphate Poisoning: A study of 70 Adult Patients in North Jordan. **Clinical Toxicology**. 34 (1): 45-51, 1996.

SHARPLEY, A.N.; MENZEL, R.G. The impact of soil and fertilizerphosphorus on the environmment. **Advances in Agronomy**,v.41, p.297-324, 1987.

SILVA, J. R. F., WILLIAMS, R. J. P. The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistryof life. New York: Oxford University Press; 1993.

SOARES, L. F. Intoxicações Agudas por Carbamatos em Pediatria. Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. Rio de Janeiro, 1998. [Monografia do Curso de Especialização em Pediatria da UFF].

SCHVARTSMAN, S. Inseticidas e Produtos Usados Preponderantemente como Inseticidas. In: SCHVARTSMAN, S. Intoxicações Agudas. 4º ed. São Paulo: Sarvier, 1991, p. 269-279.

WALSHE, C. T., SANDSTEAD, H. H.,PRASAD, A. S., *et al.* Zinc: health effect and research priorities for the 1990s. Environ Health Perspect 102 (suppl. 2):5-46, 1994.