UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**A utilização das colinesterases na avaliação da
exposição humana a agrotóxicos. Novas perspectivas
para antigas ferramentas.**

Jefferson José Oliveira da Silva

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa

São Paulo
2004

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010388

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Oliveira-Silva, Jefferson José
O48u A utilização das colinesterases na avaliação da exposição humana a agrotóxicos. Novas perspectivas para antigas ferramentas Jefferson José Oliveira-Silva. -- São Paulo, 2004.
100p.
Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Della Rosa, Henrique Vicente
1. Toxicologia ocupacional 2. ^{agrotóxicos} Agrotóxicos : Exposição humana : Toxicologia I. T. II. Della Rosa, Henrique Vicente, orientador.

615.902 CDD

Jefferson José Oliveira da Silva

A utilização das colinesterases na avaliação da exposição humana a agrotóxicos. Novas perspectivas para antigas ferramentas.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 04 de outubro de 2004.

Esta tese foi realizada sob a orientação do Profº Henrique Vicente Della Rosa, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo (USP) e cessão da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNI-RIO).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Dedicatória

Segundo o senador Darci Ribeiro no seu primeiro discurso no Senado "... O Brasil sempre foi, e ainda é, um moinho de gastar gente. Construímo-nos queimando milhões de índios. Depois queimamos milhões de negros. Atualmente, estamos queimando milhões de mestiços na produção do que não consomem ...". Imaginei mais uma vez dedicar nosso trabalho a estes João's, Antônio's, José's e Maria's que compõem esta massa, em particular a camponesa. Estes mesmos que tantas vezes têm sido usados como objeto por nossa comunidade sem, no entanto, perceber qualquer modificação em sua dura realidade. Como já dizia Mario Quintana: "É difícil um rico entrar no céu, diz o povo e não se engana, mas é muito mais difícil um pobre viver na terra".

Desta vez, porém, dedicarei este trabalho particularmente a um Antônio, meu pai, que nunca plantou, mas cultivou gente como ninguém.

(homenagem póstuma a Antônio Perez Viera de Silva)

Agradecimentos

Um discípulo de Buda uma vez lhe perguntou qual era nossa verdadeira face, se era aquela que tínhamos ao nascer ou a que o mundo transformou. Buda lhe respondeu então com uma outra pergunta: - Quando batemos palmas o som é de qual das duas mãos?

Por analogia, este trabalho é fruto de algo que imaginei e que vocês transformaram algo maior e melhor, a todos vocês, inclusive aqueles que por desventura esqueça de citar meu sincero muito obrigado.

Agradeço:

A minha Mãe, minha primeira professora, que faz acreditar que aprender, amar e ensinar são ações indissociáveis.

Ao Prof. Henrique pela confiança que depositou em mim e em meu grupo. Muita gente acredita em Deus e poucas acreditam em pessoas, mas são nessas que Deus acredita.

Ao Fred, meu amigo e afilhado que foi um dos grandes responsáveis por esta etapa. Gente grande é assim, deseja ao próximo aquilo de mais nobre que deseja para si.

Ao Marco e a Paula que de formas diferentes foram às pessoas que possibilitaram a construção deste trabalho. Estes fazem jus a expressão original "sinto-me na obrigação de lhe retribuir o favor" que contraída deu origem à palavra obrigada.

Ao Sergio que esteve presente em todos momentos (bons e maus) desta fase de minha vida. Conto com você nas próximas.

Ao Alan, o grande responsável pela primeira fase deste trabalho. Grande aluno que tudo indica será um grande pesquisador.

A Ana Cristina e a Juliana que por meios diferentes: lingüísticos e matemáticos foram determinantes na conclusão do trabalho. Vocês têm sido grandes companheiras.

Ao Armando que foi responsável pela materialização matemática da parte mais interessante deste trabalho o efeito "rebote". Sem sua ajuda este trabalho não teria o mesmo brilho.

Ao Marcio e Flavio em uma fase inicial e a Sueli na fase final. Companheiros de São Paulo, na verdade cariocas infiltrados, que tornaram muito mais agradável às estadas na terra da garoa.

A Tathiana, que chegou mais tarde mais sem a qual, devido a minhas limitações humanas não teria como realizar este trabalho, começo a acreditar que não são as pessoas que escolhem as tarefas e sim as tarefas que escolhem as pessoas.

A Rita pelo meu início na Fiocruz, sem o qual este projeto dificilmente se desenvolveria.

A Lucineide meu anjo da guarda, sem você ia ficar muito difícil. Impressionante como as coisas se transformam.

Aos meus alunos de iniciação durante este período: Simone, Alan, Amanda, Cássia, Raphael, Ana Carolina, Marina e Marcelo, a todos que foram amigos e alunos, a aqueles que só foram alunos, e aqueles que por suas limitações humanas, hoje não são nem um nem outro, mas também foram importantes.

Ao meu irmão André por todo processo, inclusive nas fases mais difíceis.

Ao Josino pelos bons conselhos, e o apoio que nunca me foi negado, apesar das solicitações neste sentido.

Aos professores da Disciplina de Bioquímica (Preza, Juarez, Jaime, Carlos e Marcos) que possibilitaram esta minha jornada.

Ao pessoal do laboratório do CESTEH, que tornar agradável o desenvolvimento de qualquer tarefa.

Ao Jorge e a Elaine, que com humor sempre me auxiliaram a caminhar no pântano da burocracia.

A Roseli sempre solicita. Tornou mais fácil minha vida na ponte Rio-São Paulo.

A turma de mestrado de 2000, que me apresentou a cidade de São Paulo, em especial a Bulé.

Enfim a todos que de alguma forma contribuíram ou estiveram comigo neste processo, valeu gente.

Apresentação

É senso comum que o desenvolvimento científico e tecnológico existente já seria suficiente para promover o desenvolvimento humano e uma qualidade de vida satisfatória para todas as populações, contudo, nos parece que parte deste lume do espírito humano tem servido para criar mais desigualdade e distorções do que bem estar, como apontado por Skinner.

Nossa perspectiva, embora limitada, se contrapõe a este estado das coisas, em particular, na aplicação do conhecimento sobre a dinâmica da utilização dos agrotóxicos e seus efeitos sobre a saúde humana. Via de regra, os estudos relativos a este objeto se restringem a contar doentes e mortos, através da aplicação de meios e métodos inadequados quando não completamente desacertados, mais para o propósito de atender à necessidades acadêmicas e políticas que para transformar a realidade de fato.

Com o propósito de ampliar os horizontes sobre o binômio exposição-intoxicação, iniciamos o estudo das ferramentas mais utilizadas para este fim, observando suas singularidades, seu potencial e suas limitações, bem como seu impacto sobre a percepção da realidade em relação ao uso de agrotóxicos e suas consequências.

Apontamos também, durante esta jornada, para a violenta distorção entre os dados oficiais notificados de intoxicação provocados por agrotóxicos e o esperado em um cenário agrícola em descompasso entre a geração de riqueza e o desenvolvimento humano, assim como do abandono das políticas de controle no comércio e utilização destas substâncias no meio urbano. A fim de evitar um desvio sobre o objeto principal deste trabalho, que é o estudo das ferramentas de diagnóstico de exposição, optamos pela adição, na forma de anexo, do capítulo recentemente publicado sobre o tema, que revela outros fatores relevantes neste processo.

Neste momento fazemos nossas as palavras do criador da teoria do método: “.... não pretendo dizer a forma como os outros devem conduzir sua ciência, apenas explicar de que forma conduzimos a nossa” (Descartes).

Resumo

O monitoramento ocupacional é a principal ferramenta para evitar ou interromper a exposição excessiva a agrotóxicos. Dentre os agrotóxicos, os anticolinesterásicos têm causado o maior número de intoxicações. O diagnóstico de exposição aos agentes anticolinesterásicos consiste na determinação das atividades sangüíneas de butirilcolinesterase (BChE) e acetilcolinesterase (AChE). Neste estudo, foram comparadas a sensibilidade e a estabilidade de um método que utiliza amostras congeladas de sangue (Oliveira-Silva) com outros que utilizam amostras frescas (Magnotti e Lovibond), através da adição *in vitro* de etil-paraoxon e aldicarb, possibilitando assim o monitoramento em áreas distantes, com a qualidade de laboratórios de referência. Subseqüentemente, foram avaliadas as variáveis: intervalo entre a exposição e a coleta das amostras, impacto da adoção de diferentes valores de referência (valor médio da população [-30%] ou [-1,6425 SD] ou individual antes da exposição) e sazonalidade da exposição. Nesta etapa, foram avaliados 56 trabalhadores durante nove meses, em intervalos de 15 a 20 dias, onde foram determinadas as atividades de AChE e BChE. Os valores de referência da população foram obtidos de indivíduos não expostos (n=76). Nossos resultados apresentaram uma maior sensibilidade do método de Oliveira-Silva em relação aos demais, sem demonstrar reversibilidade das inibições pelo congelamento. Foi constatada a exposição excessiva em 34% dos trabalhadores, utilizando-se como referência as atividades anteriores a exposição. Foram observadas alterações atípicas da BChE (ampliadas) de 11-20 dias após a exposição ($113.8\% \pm 13.3$), evidenciando um "efeito compensatório" na produção de BChE. Quanto a sazonalidade, foi observada uma variação de 0-38% de exposição dependendo do período agrícola. Os resultados confirmam a utilidade destes indicadores de exposição, desde que respeitado o intervalo entre o contato com o agrotóxico e a coleta da amostra, além do período agrícola. Foram demonstrados ainda elevados índices de resultados falso positivos e negativos utilizando outros valores de referência que não o do próprio indivíduo.

Abstract

The occupational monitoring is the main tool to avoid or interrupt the excessive exposure to pesticides. Amongst the pesticides, anticholinesterasic agents have caused the major number of poisonings. The exposure diagnosis to anticholinesterasic agents consists on the determination of blood activities of butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE). In this study, the sensitivity and stability of a method that uses frozen samples of blood (Oliveira-Silva) were compared to other methods that use cool samples (Magnotti and Lovibond), through the addition in vitro of ethyl-paraoxon and aldicarb, thus making possible monitoring in distant areas, with the same quality of reference laboratories. Subsequently, three variables were evaluated: 1- interval between the exposure and collection of the samples; 2- impact for adopting different values of reference (mean value of the population [-30%], or [-1,6425 SD], or individual value before the exposure) and 3- agricultural period of the exposure. In this stage, 56 workers were evaluated during nine months, in intervals of 15-20 days through AChE and BChE activities. The population's reference values were obtained from non exposed individuals (n=76). Our results have presented a larger sensitivity by Oliveira-Silva method in relation to the others, without showing inhibitions reversibility by freezing. Excessive exposure in 34% of workers was evidenced, using activities obtained before the exposure as reference. Atypical alterations of BChE activities (increased) were observed about 11-20 days after exposure ($113.8\% \pm 13.3$), evidencing a "compensatory effect" in BChE production. In relation to seasonal effect, a variation of 0-38% of exposure was observed depending on the agricultural period. The results confirm the utility of these markers, when the interval between contact with pesticide and collect of blood samples is taken into account, beyond the agricultural period. High indices of positive and negative false results were demonstrated when other values of reference, rather than the individual values, had been used.

Glossário

AChE – Acetilcolinesterase (eritrocitária ou sináptica)

BChE – Butirilcolinesterase; Pseudocolinesterase; Colinesterase Plasmática

C.V. – Coeficiente de variação

CG – Cromatografia Gasosa

ChE- Colinesterases

CTI – Centro de Terapia Intensiva

DDT – dicloro-difenil-tricloroetano

DTNB – Ácido ditio-*bis*-nitrobenzóico

EPA – Agência de Proteção Ambiental

EPI - Equipamento de proteção individual

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IML – Instituto Médico Legal

Na⁺K⁺ATPase – Adenosina Trifosfatase ativada por Sódio e Potássio

OMS – Organização Mundial de Saúde

OP – Organofosforados

PBS – Tampão fosfato em solução salina fisiológica

RNA – Ácido Ribonucleico

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

TRIS – Tris (hidroximetil) amino metano

UI – Unidades Internacionais de Atividade Enzimática

VR_{1,6} – Valor médio de atividade enzimática do grupo controle subtraído de 1,6425 SD

VR 30 – Valor médio de atividade enzimática do grupo controle subtraído em 30%

Sumário

I	Introdução	01
I.1	Agrotóxicos, conceitos e aspectos históricos.....	02
I.2	O panorama da utilização dos agrotóxicos e seus impactos sobre a saúde.....	05
I.3	Sistemas de classificação dos agrotóxicos	09
I.4	Aspectos da toxicocinética e dinâmica dos agentes anticolinesterásicos.....	10
I.5	Avaliação da exposição humana.....	13
I.6	Indicadores de exposição.....	16
I.7	Limites de tolerância, limites biológicos de exposição e valores de referência para a exposição a agrotóxicos.....	20
II	Objetivos.....	23
II.1	Objetivos gerais.....	24
II.2	Objetivos específicos.....	25
III	Material e Métodos.....	26
III.1	Material.....	27
III.2	Equipamentos.....	28
III.3	Grupos Humanos.....	29
III.3.1	Parâmetros éticos.....	29
III.3.2	Grupo de doadores de amostras de sangue para avaliação das inibições das colinesterases <i>in vitro</i>	29
III.3.3	Grupo de doadores de amostras de sangue para estabelecimento dos padrões de normalidade em adultos.....	30
III.3.4	Grupo de doadores de amostras de sangue para estabelecimento dos padrões de normalidade em crianças e adolescentes.....	30
III.3.5	Grupo de doadores de amostras de sangue possivelmente expostos a agentes anticolinesterásicos.....	31
III.4	Regime de coleta de amostras de expostos e avaliação clínica.....	31
III.5	Coleta das amostras de sangue dos voluntários rurais.....	32
III.6	Avaliação da sensibilidade das metodologias utilizadas em campo, em relação ao método de Oliveira-Silva.....	32
III.6.1	Adição <i>in vitro</i> de padrões de agrotóxicos em amostras de sangue.....	32
III.6.2	Análise Colinesterásica pelo Kit de Lovibond®.....	33
III.6.3	Análise Colinesterásica pelo Método de Ellman modificado por Magnotti	34
III.6.4	Análise Colinesterásica pelo Método de Ellman Modificado por Oliveira-Silva.....	35
III.6.5	Coefficiente de Variação Intra e Inter-Ensaio.....	37
III.7	Avaliação das atividades das colinesterases em função do processo de trabalho.....	37
III.8	Estabelecimento dos pontos de corte e avaliação da exposição.....	38
III.9	Avaliação do comportamento das colinesterases em função do intervalo de tempo entre a exposição e a coleta das amostras.....	38
III.10	Cálculos estatísticos.....	39
IV	Resultados e Discussão.....	41
IV.1	Avaliação da sensibilidade das metodologias utilizadas em campo, em relação ao método de Oliveira-Silva.....	42
IV.1.1	Avaliação da Inibição da Butirilcolinesterase pela adição de organofosforados (etil-paraoxon) em amostras de sangue <i>in vitro</i>	43
IV.1.2	Avaliação da Inibição da Acetilcolinesterase pela adição de organofosforados (etil-paraoxon) em amostras de sangue <i>in vitro</i>	46
IV.1.3	Avaliação da Inibição da Butirilcolinesterase pela adição de carbamatos (aldicarb) em amostras de sangue <i>in vitro</i>	48
IV.1.4	Avaliação da Inibição da Acetilcolinesterase pela adição de carbamatos (aldicarb) em amostras de sangue <i>in vitro</i>	50
IV.1.5	Coefficientes de Variação Intra e Inter-ensaio.....	52
IV.2	Características da população exposta.....	54
IV.3	Estabelecimento do ponto de corte para a avaliação da exposição.....	55
IV.4	Avaliação do comportamento das colinesterases em função do intervalo entre a exposição e a coleta das amostras.....	59
IV.4.1	Comportamento da atividade de AChE	59
IV.4.2	Comportamento da atividade de BChE.....	61

IV.5	Avaliação da exposição e impacto da adoção dos diferentes sistemas de estabelecimento do ponto de corte	63
V	Conclusões.....	68
VI	Referências Bibliográficas.....	71
	Anexo 1.....	78
	Anexo 2.....	91
	Anexo 3.....	92
	Anexo 4.....	94
	Anexo 5.....	95
	Anexo 6.....	102
	Anexo 7.....	103

Sumário de Figuras e Tabelas

Figura 1	Venda de agrotóxicos, por classe no período 1991 - 1998	07
Figura 2	Esquema de reação típica de hidrólise de organofosforados (p. ex. paration) catalisada por acetilcolinesterase.....	12
Figura 3	Coloração ilustrativa relacionada à atividade enzimática do método de Lovibond.....	33
Figura 4	Percentuais de inibição enzimática da BChE pela adição de organofosforados (etil-paroxon) em amostras de sangue <i>in vitro</i>	44
Figura 5	Percentuais de inibição enzimática da AChE eritrocitária pela adição de organofosforados (etil-paroxon) em amostras de sangue <i>in vitro</i>	47
Figura 6	Percentuais de inibição enzimática da BChE pela adição de carbamatos (aldicarb) em amostras de sangue <i>in vitro</i>	49
Figura 7	Percentuais de inibição enzimática da AChE eritrocitária pela adição de carbamatos (aldicarb) em amostras de sangue <i>in vitro</i>	51
Figura 8	Perfil da população exposta a agrotóxicos.....	53
Figura 9	Distribuição normal das atividades e estabelecimento do ponto de corte.....	55
Figura 10	Distribuição normal das atividades em populações homogenias (A) e heterogêneas (B) e adoção de dois sistemas de estabelecimento do ponto de corte.....	56
Figura 11A	Perfil das atividades enzimáticas (AChE e BChE) em função do tempo decorrido entre a exposição e a coleta das amostras.....	62
Figura 11B	Curvas de tendência das atividades enzimáticas e intervalo de divergência gerado pelo efeito rebote.....	62
Figura 12	Atividades colinesterásicas de BChE (A), AChE (B) e Alquil-fosfato urinário (C) de trabalhadores rurais em função do tempo entre a exposição e a coleta de amostras	64
Tabela 1	Valores de coeficiente de variação intra-ensaio.....	53
Tabela 2	Valores de coeficiente de variação inter-ensaio	53
Tabela 3	Análise de variância entre os três diferentes grupos, estratificados de acordo com o tempo decorrido entre a exposição e a coleta das amostras.....	58
Tabela 4	Análise de variância entre os três diferentes grupos, estratificados de acordo com o tempo decorrido entre a exposição e a coleta das amostras.....	60
Tabela 5	Avaliação dos resultados falso positivos e falso negativos gerados pela adoção de diferentes sistemas de estabelecimento do ponto de corte, em relação aos valores individuais de referência.....	68

I – Introdução

*" Moinho de homens
que nem jerimuns amassados
mansos meninos domados
massa de medos iguais
amassando a massa, a mão que amassa a comida
esculpe modela e castiga
a massa dos homens normais"*

A massa - Raimundo Sodré

1.1 - Agrotóxicos - conceitos e aspectos históricos

O termo praguicida, uma forma mais ampla de designarmos os agrotóxicos, por definição limitado ao uso agrícola, são mais bem caracterizados pela sua função que por suas características químicas. Isto porque o que transforma uma determinada substância em um agrotóxico não tem correlação direta com sua estrutura e suas propriedades físico-químicas, e sim com sua ação tóxica potencial sobre determinada(s) espécie(s) e sua aplicação. É clássica a história do DDT descoberto em 1873 como um produto de síntese orgânica e, após 65 anos de sua descoberta, ressurgiu como o maior representante das substâncias denominadas agrotóxicos [1]. Outra evidência deste conceito se torna clara na definição da Food and Agriculture Organization – FAO para estes compostos:

“Agrotóxico se define como uma substância ou mistura de substâncias com a pretensão de prevenir, destruir ou controlar quaisquer pragas incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejáveis de plantas e ou animais que possam causar dano ou que de alguma forma possam interferir na produção, processamento, estocagem, transporte ou na comercialização, de alimentos, produtos agrícolas, madeira, produtos derivados da madeira, ou rações” [2].

Sob esta óptica não causa estranheza que a história da utilização dos agrotóxicos se confunda com o início da atividade agrícola. Isto porque os processos agrícolas, ao contrário do senso comum, não são processos naturais, pois na natureza pouquíssimos biomas e, somente em condições climáticas extremas, são ocupados por uma única espécie vegetal. Como consequência do desequilíbrio

gerado pelo processo agrícola ocorre a supressão de determinadas espécies e o favorecimento de outras que ao longo do tempo se tornarão pragas [3].

A evolução no curso de utilização dos agrotóxicos não ocorreu de forma gradual, na verdade pode ser claramente dividida em duas fases: uma primeira baseada na utilização de substâncias naturais, que nos remonta ao início da atividade agrícola e uma segunda fase que se inicia entre as duas grandes guerras mundiais e é marcada pela descoberta das atividades inseticidas do DDT, que determina o estabelecimento de um novo paradigma no controle das pragas baseado no uso de substâncias sintéticas [1].

Estes agentes sintéticos, além de apresentarem um maior poder inseticida, eram também mais estáveis no meio ambiente, o que acarretou a substituição, quase que absoluta, do uso dos agrotóxicos naturais como a rotenona e piretrina. O representante mais popular do grupo foi o dicloro-difenil tricloroetano, popularmente conhecido como DDT. Esta foi, sem dúvida, a substância mais utilizada com propósito inseticida naquele período, sendo ainda hoje possível encontrá-la em regiões tão inusitadas como o Ártico [4].

O uso indiscriminado destes compostos provocou uma redução em sua eficiência, pois é sabido que qualquer agente utilizado como agrotóxico, além de erradicar as espécies alvo também elimina seus predadores e competidores. Acrescenta-se a este o fato de que alguns indivíduos são mais resistentes e sobrevivem, restando assim indivíduos com genótipo mais resistente. O cruzamento desses indivíduos, em adição a uma menor competição por alimento e espaço promove um aumento substancial na população, fazendo com que a praga volte

mais resistente e a níveis populacionais ainda maiores do que antes da aplicação [5]. Este fenômeno associado a sua alta estabilidade no meio e a suas propriedades físico-químicas, que permitem a biomagnificação e bioacumulação nos organismos e nas cadeias alimentares, geraram graves problemas ambientais, determinando assim uma diminuição drástica na sua utilização, inclusive sua proibição para uso agrícola. Neste momento, inicia-se o uso dos agrotóxicos organofosforados que, até hoje, dividem o mercado com os agrotóxicos sintéticos da classe dos piretróides e carbamatos [6].

Os agrotóxicos organofosforados foram desenvolvidos inicialmente com intuítos bélicos pela Alemanha nazista durante a segunda grande guerra [7]. Estes agentes, conhecidos como gases dos nervos, exerciam um enorme poder homicida. Em tempos de paz, foram operadas modificações nas estruturas destas substâncias, com o intuito de reduzir sua toxicidade ao homem, para que então pudessem ser utilizadas como inseticidas. A utilização destes compostos estabelece novos conceitos no combate às pragas com a introdução de novas formulações, equipamentos e modalidades de aplicação no meio agrícola [1]. Neste mesmo contexto, são desenvolvidos na década de 50 novos agentes denominados carbamatos com menor toxicidade, porém com o mesmo mecanismo tóxico de ação dos organofosforados.

1.2 - O panorama da utilização dos agrotóxicos e seus impactos sobre a saúde

No Brasil, a partir da década de 70, ocorreu uma urbanização acelerada. Entre os anos de 1970 a 1996, o percentual de brasileiros residentes em áreas rurais diminuiu de 45% para 12% da população [8]. Este expressivo índice de urbanização determinou uma menor aplicação de recursos públicos nas áreas afastadas dos núcleos urbanos, sendo em parte responsável pela situação ora vigente no ambiente rural brasileiro, geralmente caracterizado pela falta de saneamento básico, suprimento de água potável, transporte, etc. O número proporcionalmente reduzido de trabalhadores rurais, estimado hoje em 23 milhões de trabalhadores rurais num universo de 190 milhões de pessoas [9], não impediu e possivelmente favoreceu a aceleração de um intenso processo de modernização agrícola denominado "Revolução Verde", iniciado na década anterior [10]. Um exemplo do rumo deste processo se caracteriza pelos contratos de financiamento da produção agrícola pelo Banco do Brasil, a esta época, que previam a aplicação compulsória de parte do recurso financiado para compra de agrotóxicos [11].

Este "new deal" agrícola brasileiro foi responsável pela introdução de profundas mudanças nos processos agrícolas e na sua relação com o meio ambiente. Neste período, foi observado um aumento expressivo na produção agrícola como resultado destas novas tecnologias [10]. Contudo, este desenvolvimento tecnológico estava em descompasso com o desenvolvimento humano no meio rural, que se processava de forma extremamente lenta. Este

sistema de componentes colocou a uma população rural despreparada, com pouco ou nenhuma assistência técnica, exposta a um grande número de substâncias químicas potencialmente tóxicas (de tintas a agrotóxicos), gerando, assim, como efeito colateral do processo de modernização agrícola um número assombroso de intoxicações humanas e uma degradação ambiental significativa [12]. Neste contexto, o homem do campo foi considerado apenas mais uma peça mecânica, substituível e de baixo custo, como já previsto por Karl Marx quando discorre sobre os exércitos de trabalhadores de reserva.

Certamente por sua vocação agrícola, o Brasil apresenta-se como grande consumidor mundial de agrotóxicos, representando 50% do mercado latino americano e apresentando uma tendência ascendente de consumo. As vendas destes compostos no mercado brasileiro têm aumentado de forma significativa, entre os anos de 1991 e 1998 foi da ordem de 160% (Figura 1) [6]. Frente a este cenário, o governo brasileiro tem, consistentemente, dado muito pouca atenção aos problemas sociais e sanitários no meio rural, optando por concentrar esforços na solução de problemas de ordem política e / ou econômica, incentivando continuamente o aumento da produção. Isto explica porque a agricultura, mesmo sendo responsável por 39% da balança comercial brasileira [13], apresenta em sua planta de produção (meio rural), índices de desenvolvimento humano só comparáveis à zonas urbanas de exclusão como favelas e cidades dormitório [14].

Frente ao panorama apresentado, aposto a políticas e estratégias de controle e segundo a Organização Mundial da Saúde [7], cerca de 3 milhões de pessoas no mundo sofrem anualmente algum episódio de intoxicação decorrente da exposição a

agrotóxicos. Estudos mais detalhados em populações de trabalhadores rurais apresentam taxas de incidência anuais de intoxicações que não condizem com estas estimativas e apontam para números bem maiores (Anexo 1) [15].

Figura 1 - Venda de agrotóxicos, por classe no período 1991 - 1998

Dados oficiais do IBGE [9] demonstram que, no Brasil, aproximadamente 23.000.000 pessoas suscetíveis a exposição a agrotóxicos devido a suas atividades ocupacionais. Deste contingente, aproximadamente 3.000.000 de pessoas utilizam estas substâncias químicas regularmente. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, ocorreriam 150.000 casos de intoxicação anualmente no Brasil

que resultariam em 3.000 a 4.000 mortes, considerando o universo de trabalhadores envolvidos com esta atividade [7]. Contudo, os casos que obtêm êxito letal representam uma pequena fração dos eventos de intoxicação, pois na maioria das vezes as intoxicações não são graves, não levando o trabalhador a se ausentar do trabalho; há falta de atendimento médico, devido às grandes distâncias entre as lavouras e os centros de saúde, inibindo assim a notificação, além da sintomatologia das intoxicações se assemelhar a de outras patologias comuns no meio rural, dificultando a definição etiológica. Se forem considerados os casos crônicos a situação tende a se agravar, segundo a OMS para cada caso agudo, entre 20 e 40 outros crônicos se estabelecem [7].

A exposição a longo prazo por agrotóxicos pode desencadear efeitos crônicos sobre quase todos os órgãos e sistemas, sendo os mais freqüentes as alergias crônicas (eczema); os distúrbios respiratórios (bronquite asmática, tosse e dificuldade respiratória); os efeitos gastrointestinais (vômito, diarreia, úlcera, náuseas e gastrite crônicas). Outros efeitos muito freqüentes são problemas neurológicos provocados por compostos organofosforados e organoclorados que atuam sobre o sistema nervoso central ocasionando distúrbios musculares, debilidade motora e fraqueza corporal [5], este ponto especificamente será novamente discutido em outra seção.

Alguns estudos também têm demonstrado correlação entre a utilização de agrotóxicos e a teratogênese, como exemplo temos um estudo realizado em 16 municípios do Rio Grande do Sul que revelou 600 casos de crianças nascidas de pais agricultores com anomalias congênitas, neste estudo foi observada uma

incidência de um anencéfalo para aproximadamente 20 mil nascidos, enquanto a incidência normal, segundo a OMS, seria de um para 100 mil [16].

1.3 - Sistemas de classificação dos agrotóxicos

O conceito que define uma substância como agrotóxico possibilita a classificação destes compostos sob diversos aspectos. Do ponto de vista agrícola, agrega maior valor classificar os agrotóxicos de acordo com a espécie que se pretende eliminar, sendo assim classificados como inseticidas, herbicidas, rotenticidas, fungicidas, antimicrobianos, entre outros. Sob a perspectiva analítica e ambiental, ganha destaque a classificação segundo a classe química a que pertencem, como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, nitrofenóis, etc [17].

O sistema recomendado pela Organização Mundial de Saúde [18], tem como base a toxicidade aguda oral e dérmica em ratos. Neste sistema os produtos utilizados como agrotóxicos só podem ser classificados em quatro categorias: extremamente perigosos (classe Ia), altamente perigosos (classe Ib), moderadamente perigosos (classe II) e levemente perigosos (classe III). Esta classificação recomendada pela OMS garantiria a interpretação direta do grau de periculosidade dos agrotóxicos ao leigo. Acredita a OMS, que desta forma, o trabalhador terá elementos para dimensionar o risco à saúde envolvido na manipulação do produto. Este sistema é reforçado por uma simbologia cromática (vermelho, amarelo, verde e azul) [19]. Embora de fácil compreensão, este sistema

pode gerar alguma controvérsia, podendo levar o trabalhador a acreditar que um produto de faixa azul seria seguro. Este sistema também pressupõe que o leigo consiga distinguir a diferença semântica entre altamente e extremamente.

Finalmente, um sistema de classificação baseado nas propriedades funcionais e químicas dos agrotóxicos, proposto por Hogstedt *et al.* [20], tem sido muito útil na atenção à saúde das populações expostas. Isto porque este método de classificação prioriza a toxicodinâmica dos agrotóxicos, sendo por este sistema classificados em anticoagulantes, anticolinérgicos, etc. Tanto nos aspectos relativos ao tratamento nos casos de intoxicação aguda, como nos procedimentos de vigilância esta classificação traz informações relevantes na restrição de procedimentos. Esta sistemática é muito importante a toxicologia ocupacional, pois relaciona os mecanismos de ação e a dose de exposição aos efeitos tóxicos no organismo humano. Segundo esta classificação, os anticolinesterásicos, que englobam os compostos do grupo químico dos organofosforados (OP) e carbamatos, destacam-se devido a sua grande utilização e alta toxicidade quando comparados a outros agrotóxicos [21].

1.4- Aspectos da toxicocinética e dinâmica dos agentes anticolinesterásicos

A absorção dos agentes anticolinesterásicos pode se dar pela via digestiva, pulmonar e cutânea, sendo que na maior parte das vezes é dérmica em situações ocupacionais [22,23]. Durante a fase de distribuição, que se segue à absorção, tem sido demonstrado que os compostos OP, da subclasse dos fosforotionados após

sofrerem biotransformação hepática, apresentam grande afinidade pelos seus alvos no sistema nervoso periférico e central [24]. Em relação aos carbamatos, a etapa de biotransformação não é necessária para que estes compostos apresentem afinidade por seus alvos tóxicos, sendo considerados inibidores diretos.

A detoxicação de ésteres organofosforados são em sua maioria hidrolíticas. A hidrólise enzimática de ésteres como o paration é atribuída às esterases "A" ou arilesterases [25]. Em relação aos carbamatos, a descarboxilação parece ser a principal rota de biotransformação, levando a inativação do composto [26].

A ação tóxica dos anticolinesterásicos é basicamente derivada da inibição da acetilcolinesterase presente nas sinapses nervosas, uma enzima da classe das serino-esterases que reconhece o anticolinesterásico como substrato natural da enzima [27]. Logo, a interação da enzima com o agente anticolinesterásico se processa de forma análoga a interação com seu substrato natural (acetilcolina). A marcha catalítica (Figura 2) se inicia pela interação do agente anticolinesterásico com o sítio de posicionamento (aniônico) da enzima. Após o posicionamento espacial do inibidor, ocorre a interação dos grupamentos eletronegativos com o sítio catalítico propriamente dito. Neste instante, a enzima sofre uma modificação conformacional, que promove a torção da molécula do inibidor. A ligação éster, por ser a mais polar da molécula é então rompida. A fração ácida do inibidor, ao contrário do que ocorre com o substrato não é capaz de se desligar do sítio catalítico, determinando assim o impedimento da entrada de uma nova molécula de inibidor ou de substrato no sítio. No caso dos organofosforados, esta etapa se caracteriza pela fosforilação

irreversível da enzima. No caso dos carbamatos, ocorreria a carboxilação reversível do sítio catalítico [26].

A acetilcolinesterase, na sinapse, tem um papel fundamental na interrupção circunstancial da propagação do impulso nervoso, através da hidrólise da acetilcolina. Quando os anticolinesterásicos inibem este sistema enzimático, promovem o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica e, conseqüentemente, o surgimento da síndrome colinérgica [27].

Figura 2 – Esquema de reação típica de hidrólise de organofosforados (p. ex. paration) catalisada por acetilcolinesterase.

A intoxicação por agrotóxicos anticolinesterásicos, dependendo da concentração do agente e do regime de exposição, pode desenvolver efeitos agudos e crônicos. A intoxicação aguda por anticolinesterásicos é uma das formas mais prevalentes de intoxicação química em humanos, sendo atualmente a principal causa de morte por intoxicação exógena no estado do Rio de Janeiro [15,28]. A síndrome colinérgica, responsável por toda a sintomatologia da intoxicação, surge quando se têm níveis de aproximadamente 50% de inibição da atividade da AChE da sinapse e placa motora [29] manifestando-se clinicamente por tremores, náuseas, hipersalivação, sudorese intensa e bradicardia. A morte pode ocorrer por asfixia devido à paralisia dos músculos respiratórios e aumento da secreção brônquica, deprimindo o centro respiratório no cérebro em percentuais de inibição acima de 90% da AChE sináptica.

Além do fenômeno de intoxicação aguda, existe também a intoxicação crônica, na qual a reversibilidade do quadro clínico é, em geral, bastante difícil [30]. Dentre os efeitos crônicos, já foram observados perda de apetite, dificuldade na concentração, comprometimento da memória, ataxia, problemas respiratórios, tais como bronquite asmática e outras anomalias pulmonares, efeitos gastrintestinais, distúrbios musculares, debilidade motora e fraqueza [5].

1.5 - Avaliação da exposição humana

Dentro de um universo de complexidades que é a relação da utilização dos agrotóxicos com a saúde e o meio ambiente um dos temas mais controversos, mal

compreendidos e dinâmicos, talvez seja de fato a avaliação da exposição humana a estes agentes. O melhor significado para a palavra avaliação, neste contexto, seria reconhecer a grandeza e a força [31]. Sob esta perspectiva, que instrumentos ou meios são capazes de nos dar a dimensão fidedigna do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana? Possivelmente nenhum isoladamente, ou ainda que associados, dificilmente trarão respostas satisfatórias sem estarem contextualizados dentro da lógica do processo de trabalho rural que tem os agrotóxicos como mais uma ferramenta de manejo.

Segundo a EPA [32] a exposição é definida pelo contato do indivíduo com agentes presentes num meio contaminado, durante períodos de tempo específicos, sendo dependente da intensidade, frequência e duração do contato. A intensidade do contato é tipicamente expressa pela concentração do agente tóxico por unidade de massa ou volume do meio onde o indivíduo foi exposto. A avaliação da exposição procura caracterizar situações cotidianas onde podem ser identificadas populações potencialmente expostas, bem como os caminhos que levaram à exposição, sua magnitude, frequência e duração do contato com estes agentes em doses potencialmente tóxicas.

Na avaliação da exposição humana, processo que demanda recursos humanos e materiais, deve-se priorizar os indivíduos com maior probabilidade de se apresentarem excessivamente expostos. Seu principal objetivo seria impedir o estabelecimento do quadro de intoxicação, através do alarme e subsequente afastamento do trabalhador da fonte de contaminação, ou ao menos atenuar a gravidade deste quadro no caso deste já ter se estabelecido [4]. Por definição,

intoxicado é o termo que define o indivíduo que teve contato com determinada substância e deste contato desenvolveu algum tipo de manifestação clínica, sendo de grande interesse e objeto de ações de vigilância sanitária [33].

A avaliação de um grupo de indivíduos com possibilidade de se apresentarem excessivamente expostos a agrotóxicos, assim como de um grupo de intoxicados se apóia sobre o mesmo tripé: histórico de exposição, avaliação clínica e diagnóstico laboratorial. No entanto, estes três tipos de avaliação apresentam diferenças consideráveis no valor das variáveis. Em relação ao estudo de um grupo de intoxicados, a avaliação clínica será sempre soberana e determinante, já em relação à avaliação de um grupo de excessivamente expostos (supostos), o histórico é responsável pela sua caracterização em si, logo esta variável assume um papel determinante na definição do grupo ou dos indivíduos de um grupo que serão avaliados. Neste contexto, o diagnóstico laboratorial, denominado indicador, assume um papel decisivo, pois a exposição a determinado agente pode se traduzir em um aumento da concentração deste no organismo (indicador de dose interna), em relação à população em geral, ou ainda ter disparado um quadro de alterações bioquímicas e metabólicas sem contudo desenvolver comemorativos clínicos perceptíveis (indicador de efeito). Em resumo, na avaliação de supostos excessivamente expostos teríamos o histórico definindo o grupo, os indicadores apontando para a real exposição que iria determinar, em última instância, a situação de risco e, finalmente, a avaliação clínica apontando que indivíduos migraram do grupo de expostos para o de intoxicados [4].

1.6 - Indicadores de exposição

O fato do termo "agrotóxico" determinar mais uma função que um princípio ativo propriamente dito impede o desenvolvimento de um método único e universal capaz de indicar a dose interna, ou mesmo o efeito biológico da exposição a todo e qualquer agente utilizado com este propósito. Do ponto de vista da avaliação da exposição através de indicadores, somente as similitudes estruturais e mecanísticas dos agrotóxicos têm sentido.

Considerando separadamente cada um dos agrotóxicos é possível determinar a sua concentração nos fluidos biológicos, e, conseqüentemente, estimar a exposição que o individuo sofreu a este elemento. Contudo, é determinante considerar a janela de tempo entre a exposição e a coleta da amostra a ser analisada. Esta janela se relaciona diretamente com a meia vida do agrotóxico no meio biológico [34,35].

Os indicadores de dose interna têm a capacidade de determinar a quantidade da substância química e / ou metabólito(s) presente(s) em diversas matrizes biológicas, tais como, sangue, urina ou tecidos, e tem como técnica mais difundida a análise cromatográfica gasosa e líquida de alta performance, acopladas a inúmeros detectores [36]. Estas técnicas são precisas e de alta sensibilidade, possibilitando em determinadas condições a avaliação da relação entre o agrotóxico em seu estado original e seus metabólitos, gerando assim informações sobre o processo de metabolização do mesmo no organismo. Estas técnicas, de um modo geral, requerem etapas de extração e procedimentos analíticos característicos para cada

substância ou, na melhor das hipóteses, de um grupo de substâncias com as mesmas características físico-químicas, neste caso denominadas análises de multirésíduos [37]. Estas técnicas são onerosas na sua implantação devido à necessidade de aparelhagens sofisticadas e estrutura laboratorial complexa e na sua execução que obviamente requer pessoal com alto nível técnico e insumos com alto grau de pureza. Estas características analíticas somadas as grandes distâncias entre os laboratórios analíticos e o meio rural tornam estas técnicas de execução extremamente limitadas em estudos de campo. No entanto, em determinadas situações, não há outra opção tecnológica para a avaliação da exposição humana a agrotóxicos.

Outras técnicas como a espectrometria de absorção atômica, a voltametria e os imunoensaios podem também ser utilizadas com o objetivo de determinarmos a dose interna. A absorção atômica [38], técnica de alta precisão e sensibilidade, tem seu uso restrito a agrotóxicos que contenham metais pesados em sua estrutura, como os organomercuriais e alguns tipos de fungicidas, apresentando as mesmas limitações relativas ao custeio da técnica. As técnicas de voltametria [39,40], embora apresentem um custo razoável e uma precisão e sensibilidade compatíveis com as técnicas cromatográficas, sofrem forte influência da matriz biológica e, desta forma, tem sido apresentada como uma técnica vantajosa para avaliação ambiental, mas inadequada para a avaliação humana. Finalmente, teríamos as técnicas de imunoensaio [41,42] que vêm sendo empregadas com sucesso na avaliação da contaminação ambiental por agrotóxicos, dado seu baixo custo e facilidade técnica de execução, pois dispensa as etapas de extração da matriz biológica e é capaz de

realizar a análise simultânea de até 80 amostras, com sensibilidade similar ou mesmo maior que as técnicas cromatográficas. No entanto, apresenta as mesmas limitações relativas a meia-vida dos agrotóxicos (pequena janela temporal entre a exposição e a coleta das amostras) e especificidade metodológica, ou seja, cada procedimento analítico é característico para uma dada substância e na melhor das circunstâncias para um grupo de substâncias com as mesmas características físico-químicas. Estas técnicas vêm sendo utilizadas a partir da década de 90 na avaliação da contaminação ambiental, porém seu uso na avaliação humana da exposição a agrotóxicos ainda é muito limitado.

Os indicadores de efeito são ferramentas que têm como fundamento teórico a determinação de alterações bioquímicas transitórias em um nível molecular que, idealmente, ao serem produzidas, não resultem em transtornos funcionais, não provoquem a ruptura da homeostase, não aumentem a susceptibilidade a outros agentes e não incapacitem o organismo a compensar novas sobrecargas do agente original, ou seja, efeitos definidos como não nocivos [43]. Estes nunca devem ser confundidos com as evidências pré-clínicas que são a manifestação de algum dano já processado, embora sem sintomatologia clínica, como no caso das interleucinas no diagnóstico de alguns tipos de pneumoconioses [44].

Por princípio, os indicadores de efeito avaliam as consequências e não o agente causal da exposição, ou seja, no momento em que os valores destas análises se distanciam dos valores estabelecidos como normais representam o desfecho de um processo de exposição. Por serem conseqüências da exposição, na maioria das vezes quando analisados isoladamente, fornecem poucas informações sobre o

agente tóxico. Por analogia, seria como buscar na dor de cabeça informações sobre uma de suas quatrocentas causas conhecidas. Contudo, em determinadas situações onde o histórico de exposição e o processo de trabalho são conhecidos e o indicador apresente um alto grau de especificidade, os resultados permitem aferir a exposição a múltiplos agentes, desde que estes possuam mecanismos congêneres de interação com o meio biológico.

Alguns indicadores de efeito têm sido propostos e utilizados na avaliação da exposição a agrotóxicos, como a inibição da enzima Na⁺K⁺ATPase para a avaliação da exposição a agrotóxicos organoclorados [45], tempo de coagulação para a avaliação da exposição a agentes cumarínicos, entre outros. Porém, nenhum outro indicador de efeito, relacionado a agrotóxicos, tem sido mais utilizado que as colinesterases sanguíneas na monitorização da exposição a agrotóxicos. Estes indicadores têm a capacidade de avaliar a exposição a todo e qualquer elemento do grupo dos organofosforados e carbamatos. Paralelamente ao ataque das colinesterases presentes nos sistemas nervosos e motor, ocorre a inibição da atividade colinesterásica sanguínea, que embora conserve um nível razoável de correspondência entre o grau de inibição e intensidade da sintomatologia, não tem correlação direta com a síndrome colinérgica desencadeada no sistema nervoso central e periférico que é de fato a causa dos sintomas [47].

Na verdade, a atividade colinesterásica sanguínea é derivada da ação de duas enzimas distintas, uma contida na membrana dos eritrócitos (AChE) e outra sérica (BChE) [47]. Estas duas enzimas apresentam diferenças cinéticas, estruturais e processos de gênese distintos. A AChE é sintetizada durante a hematopoese,

enquanto a BChE é uma enzima produzida no tecido hepático e exportada continuamente para a corrente sanguínea. Estes dois sistemas enzimáticos apresentam meias-vidas significativamente diferenciadas, ou seja, 3 meses para a AChE e cerca de uma semana para a BChE. Esta diferença tem sido proposta como uma forma hábil para diferenciar temporalmente as intoxicações [48].

1.7 - Limites de tolerância, limites biológicos de exposição e valores de referência para a exposição a agrotóxicos

O estabelecimento de limites biológicos de exposição repousa sobre a idéia de que existam concentrações seguras de exposição a determinado agente químico, onde os organismos vivos por mecanismos de compensação metabólica não apresentariam alteração do seu estado de homeostase. Logicamente, estes valores são transitórios e refletem o conhecimento mais atual sobre o efeito destas substâncias [4]. Na verdade, estes índices determinam a condição de exposto e excessivamente exposto onde a intoxicação propriamente dita ainda não se estabeleceu, e representam a concentração máxima permitida na atmosfera, as concentrações máximas nos fluidos biológicos e os valores considerados "normais" de determinado indicador de efeito (metabólito endógeno*, atividade enzimática, etc) em populações não expostas.

Os agrotóxicos são substâncias na imensa maioria das vezes antropogênicas, não existindo na natureza antes de seu desenvolvimento e aplicação, logo considerarmos sua presença nos meios biológicos como aceitável ou inócua é discutível.

* Metabólito endógeno vem a ser aquele produzido em decorrência do metabolismo de um xenobiótico, não tendo direta relação química com a substância que o originou ou provocou a sua formação.

Em relação aos agentes organoclorados, por exemplo, o valor de referência para concentração interna espelha aqueles valores obtidos do estudo de populações não expostas estando na faixa de 20 ng/ml ou inferiores [49], contudo alguns elementos deste grupo apresentam atividade carcinogênica, logo não apresentando limite seguro de exposição, pois, em tese, uma única molécula poderia provocar uma mutação em uma única célula e disparar um processo carcinogênico [50].

Em relação aos organofosforados não existe um valor determinado de dose interna, possivelmente pela sua baixa estabilidade nos tecidos biológicos, entretanto algumas agências internacionais estabelecem limites de tolerância atmosféricos para vários compostos deste grupo [51]. Em relação a estas substâncias, os indicadores de exposição mais aceitos e empregados são as atividades colinérgicas sanguíneas, um indicador de efeito poderoso quando empregado de forma criteriosa e absolutamente sem préstimo quando utilizado sem o conhecimento dos fatores limitantes de sua utilização. Este é o único indicador de efeito propriamente dito para exposição a agrotóxicos e, mesmo só sendo capaz de diagnosticar a exposição a um grupo restrito de substâncias, tem servido em diversas situações onde ocorrem exposições múltiplas como uma ferramenta para revelar o processo global de exposição aos demais agrotóxicos, desde que sejam também utilizados anticolinesterásicos. Isto é possível devido ao fato que um indivíduo fazendo uso de diversas substâncias em um mesmo processo de trabalho não irá se proteger de determinada substância em detrimento de outra, principalmente se reconhece a primeira como a mais tóxica, como é o caso dos agentes anticolinesterásicos

(organofosforados e carbamatos) reconhecidos pelos agricultores como “mais venenosos” [52].

Os principais problemas na utilização das colinesterases residem nos valores de referência utilizados, na falta de atenção ao processo de trabalho (sazonalidade, intervalo de exposição, etc) e o desconhecimento do comportamento das colinesterases frente à inibição por estes agentes. Adiciona-se a estes fatos a reversibilidade da inibição provocada por agentes do grupo dos carbamatos.

Os valores de referência usualmente utilizados se constroem através da determinação das atividades destas enzimas em populações não expostas de onde seria obtida uma atividade média. Deste valor seria subtraído de 20 a 30% da atividade e então estabelecido o valor de referência limite para estas atividades, a partir deste limite, o indivíduo seria considerado excessivamente exposto [46,53,54]. A adoção deste critério gera problemas de interpretação dos resultados. Idealmente, estes valores de referência deveriam ser obtidos do próprio indivíduo antes da exposição, no entanto, a realidade agrária brasileira torna esta tarefa quase impossível. Finalmente, teríamos a falta de valores de referência para crianças e adolescentes, isto porque os trabalhos que inicialmente deram origem a estes valores foram realizados em países que há muito tempo superaram a problemática do trabalho infantil, situação esta presente no Brasil, que apresenta cerca de dois milhões de crianças e adolescentes ocupacionalmente envolvidos com a atividade agrícola [9].

II – Objetivos

II.1 - Objetivos gerais

O trabalho desenvolvido nesta tese compõe um conjunto de ações que o Laboratório de Toxicologia do Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana – CESTEH da Fundação Oswaldo Cruz vem desenvolvendo para a compreensão da dinâmica do uso de agrotóxicos e seus efeitos sobre a saúde humana e o meio ambiente.

Nesta perspectiva, têm causado preocupação as variáveis dos indicadores de efeito utilizados para avaliação da exposição humana, em particular aqueles relacionados à aplicabilidade e sensibilidade dos métodos, bem como os valores de referência utilizados como padrão de normalidade e ainda se estes padrões são válidos para faixas etárias compreendidas entre a infância e adolescência, que, no nosso país, constitui uma parcela significativa da mão de obra do campo.

Nossa atenção especial a estes indicadores de efeito reside no fato que, em diversas situações onde ocorrem exposições múltiplas, eles têm servido como ferramentas úteis para revelar o processo global de exposição aos demais agrotóxicos e orientar as ações seguintes.

Em outra mão, temos percebido que a utilização pouco criteriosa destes indicadores associados a problemas estruturais e ao despreparo dos profissionais que lidam com as populações rurais e urbanas expostas a agrotóxicos tem gerado uma sub-notificação inaceitável dos casos de intoxicação.

II.2 - Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade das metodologias utilizadas em campo, em relação ao método de Oliveira-Silva, que utiliza amostras congeladas de sangue e possibilita o monitoramento em regiões distantes e sem infra-estrutura. Não foi nosso objetivo validar estas metodologias que já foram validadas;
- Avaliar a reversão das inibições enzimáticas provocadas por inibidores reversíveis das colinesterases, determinadas através do método de Oliveira-Silva, a fim de ampliar a base de aplicação da metodologia para programas de monitoramento ocupacional para quaisquer anticolinesterásicos;
- Determinar a forma mais apropriada para o estabelecimento dos pontos de corte para caracterização da exposição excessiva a agentes anticolinesterásicos;
- Verificar a eficácia da utilização das colinesterases para diagnosticar exposições em trabalhadores adultos, em função do tempo decorrido entre o contato com o agrotóxico e a avaliação das atividades colinesterásicas;
- Avaliar a sazonalidade dos processos de exposição de trabalhadores adultos em função do calendário agrícola;
- Determinar valores de normalidade para crianças e adolescentes e verificar as possíveis diferenças daqueles obtidos para adultos.

III - Materiais e Métodos

"Excluído o impossível, o que resta, mesmo
que improvável, deve ser a verdade"

Em Estórias de Sherlock Holmes

Arthur Conan Doyle

III.1 - Material

Padrões de agrotóxicos:

- ♦ Etil-paraoxon (Chem. Serv. Co)
- ♦ Aldicarb (Chem. Serv. Co)

Reagentes :

- ♦ Ácido ditio-*bis*-nitrobenzóico (Sigma-Aldrich Co)
- ♦ Albumina bovina (Sigma-Aldrich Co)
- ♦ Iodeto de acetiltiocolina (Sigma-Aldrich Co)
- ♦ Iodeto de butiriltiocolina (Sigma-Aldrich Co)
- ♦ Reagente de Folin (Sigma-Aldrich Co)
- ♦ Sulfato de quinidina (Sigma-Aldrich Co)
- ♦ Metanol P.A.
- ♦ Fosfato de sódio monobásico P.A.
- ♦ Cloreto de sódio P.A.
- ♦ solução indicadora de azul de bromotimol - Kit Lobibond
- ♦ água deionizada pelo sistema Milli-Q
- ♦ Hidroxi metil amino metano (TRIS) P.A.
- ♦ Triton X-100 P.A.
- ♦ L-cisteína (Sigma-Aldrich Co)
- ♦ Hidróxido de sódio P.A.
- ♦ Acetiltiocolina perclorada - Kit Lobibond

Material de uso geral

- ◆ Tubos vacutainer com heparina
- ◆ Tubos de ensaio com capacidade de 15mL
- ◆ Pipetas automáticas de 100-1000 μ L
- ◆ Pipetas automáticas de 20-200 μ L
- ◆ Pipetas automáticas de 1000-5000 μ L
- ◆ Ponteiras plásticas para as pipetas citadas
- ◆ Cubeta de vidro ou quartzo com caminho ótico de 1 cm
- ◆ Balão volumétrico com capacidade adequada para o volume de tampão utilizado
- ◆ Bécheres com capacidades de 50, 100 e 200 mL
- ◆ Espátulas

III.2 – Equipamentos

- ◆ Espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 160 A
- ◆ Centrífuga Refrigerada HITACHI – CR21E
- ◆ Pipetas automáticas de volume ajustável, faixa de 20 μ L a 200 μ L
- ◆ Pipetas automáticas de volume ajustável, faixa de 100 μ L a 1000 μ L
- ◆ Pipetas automáticas de volume ajustável, faixa de 1000 μ L a 5000 μ L
- ◆ Vórtex
- ◆ Placa de agitação magnética

- ♦ PHmetro
- ♦ balança analítica
- ♦ colorímetro integrante do kit lovibond
- ♦ cronômetro

III.3 – Grupos Humanos

III.3.1- Parâmetros éticos

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz através do Parecer nº 107/02 (Anexo 2) e todos os participantes do estudo de qualquer um dos grupos consentiram com a utilização dos seus resultados de forma não identificada para fins acadêmicos, registrado através de um termo de consentimento (Anexo 3).

III.3.2- Grupo de doadores de amostras de sangue para avaliação das inibições das colinesterases *in vitro*

O grupo de doadores foi composto de oito voluntários do CESTEH – FIOCRUZ, supostamente não expostos a agentes anticolinesterásicos. Este grupo de voluntários foi submetido a um questionário (Anexo 4) cujo objetivo foi a avaliação dos fatores que pudessem interferir na atividade enzimática das colinesterases sangüíneas, como determinadas doenças (hepáticas, renais e circulatórias) e

práticas domésticas e profissionais. Este grupo foi reduzido devido ao processo de coleta contínuo, que causaria um grande desconforto nestes voluntários.

III.3.3 - Grupo de doadores de amostras de sangue para estabelecimento dos padrões de normalidade em adultos

O grupo de indivíduos controle foi constituído de voluntários adultos (19 a 46 anos) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, da Universidade do Rio de Janeiro, do Centro de Ecologia Humana e Saúde do Trabalhador (n=21), e da comunidade rural do município de Magé - RJ (n=36), supostamente não expostos a agrotóxicos. Antes da coleta do material foi realizada uma entrevista, através de um questionário (Anexo 4), com o objetivo de excluir os voluntários que apresentassem determinadas doenças como distúrbios circulatórios, hepáticos e renais, que têm sido historicamente descritos na literatura como fatores que alteram a atividade das enzimas sanguíneas utilizadas neste estudo [55]. A distribuição do gênero foi virtualmente igual para homens e mulheres (49%).

III.3.4 - Grupo de doadores de amostras de sangue para estabelecimento dos padrões de normalidade em crianças e adolescentes

O grupo de crianças e adolescentes voluntárias (n = 72) supostamente não exposto foi constituído de estudantes da rede municipal de Nova Friburgo – RJ,

sendo estratificados em três grupos etários: 10 a 13; 14 a 15 e 16 a 18 anos e também submetidos ao questionário específico (Anexo 4).

III.3.5 - Grupo de doadores de amostras de sangue possivelmente expostos a agentes anticolinesterásicos

O grupo de indivíduos adultos entre 18 e 60 anos supostamente expostos a agentes organofosforados e carbamatos pertence a cinco comunidades de trabalhadores rurais do município de Magé - RJ, sendo composto, em sua grande maioria, por indivíduos que efetivamente aplicam agrotóxicos na lavoura. A este grupo de trabalhadores foi aplicado um questionário específico para a avaliação da exposição e do processo de trabalho (Anexo 5). Inicialmente, este grupo foi composto por 102 trabalhadores, contudo devido a sistemática do trabalho que consistia em doações de amostras de sangue repetidas em intervalos relativamente curtos (aproximadamente 20 dias), este grupo foi se reduzindo ao longo das coletas e, ao final do ano agrícola, tínhamos apenas 56 trabalhadores. É importante ressaltar que nem todos os indivíduos participaram de todas as coletas e que durante estas coletas o trabalhador era submetido a um novo questionário de manutenção das informações (Anexo 6).

III.4 - Regime de coleta de amostras de expostos e avaliação clínica

As amostras de sangue dos trabalhadores rurais foram coletadas em intervalos que variaram de 15 a 20 dias, totalizando nove coletas ao final do trabalho,

entre os meses de fevereiro e novembro. Em todas ocasiões, foi verificado se havia ocorrido aplicação de agrotóxicos e, em caso afirmativo, qual(is) havia(m) sido utilizado(s) (Anexo 5). Nestas coletas foram realizadas avaliações clínicas dos trabalhadores, que consistiam em anamnese, em que foram avaliados pressão arterial, batimentos cardíacos, reflexo patelar, ausculta pulmonar, entre outros parâmetros, onde não foram detectados sinais de intoxicação aguda.

III.5 - Coleta das amostras de sangue dos voluntários rurais

Em todas as situações, as amostras de sangue foram coletadas por punção venosa com seringa ou vacutainer em tubos heparinizados. As amostras de sangue utilizadas para avaliação da contaminação *in vitro* foram reunidas em um pool.

III.6 – Avaliação da sensibilidade das metodologias utilizadas em campo em relação ao método de Oliveira-Silva

III.6.1- Adição *in vitro* de padrões de agrotóxicos em amostras de sangue

Nesta etapa, foram utilizados pools de amostras de sangue onde foram adicionadas soluções dos seguintes inseticidas: etil-paraoxon em concentrações de 0,01 a 50 µg/ml de sangue e aldicarb em concentrações de 0,01 a 200 µg/ml de sangue. As soluções de inseticida foram, inicialmente, diluídas em metanol e em tampão fosfato 0,12 M, pH 7,2 com NaCl 0,9% (PBS). Em nenhuma concentração de

inseticida utilizada o volume da solução superou 10% do volume de sangue e a concentração de metanol 1% (v/v) do meio reacional. Ainda assim foram feitos testes sobre o efeito do metanol sobre as enzimas, através da adição de metanol no meio reacional entre as concentrações de 0,2% a 1% (v/v). Após a contaminação, o sangue foi aliquoteado e testado pelos diferentes métodos utilizados no trabalho. Testes preliminares indicaram que a adição direta dos inseticidas não produzia soluções homogêneas e, conseqüentemente, inibições reprodutíveis, o esquema detalhado do processo de adição dos pesticidas se encontra no anexo 7.

III.6.2 - Análise Colinesterásica pelo Kit de Lovibond®

Para a determinação da atividade por este kit [56], foram adicionados em tubos de análise 10 µL de sangue total e 0,5 mL de solução indicadora de azul de bromotimol 1,73 mM. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL de solução de perclorato de acetiltiocolina 20mM. O "branco" foi confeccionado adicionando-se 10 µL de sangue total e 1,0 mL de água deionizada. A leitura das amostras foi iniciada após um intervalo de tempo de 25 min após adição do substrato. O intervalo de tempo foi dependente da temperatura ambiental, que em nossas condições laboratoriais se manteve a 25°C. As amostras foram analisadas em um colorímetro com graduações de cor correspondentes aos valores de atividade colinesterásica variando de 0 a 100%, em escalas de 12,5% (Figura 3) .

Figura 3: Coloração ilustrativa relacionada à atividade enzimática do método de Lovibond

III.6.3- Análise Colinesterásica pelo Método de Ellman modificado por Magnotti

Para a determinação da atividade enzimática por este método [57], em tubos de análise foram pipetados 400 µL de solução TRIS 0,1M – triton 1% (v/v) e 10 µL de amostra de sangue total de cada aliquota, iniciando-se pelo controle. A reação foi iniciada pela adição de 4 mL de solução dos substratos: butiriltiocolina 5,48 mM em tampão de fosfato de sódio 59 mM, DTNB 38 mM, pH 7,5 (reagente de Magnotti A) para BChE e acetiltiocolina 0,97 mM em tampão de fosfato de sódio 59 mM, DTNB 38 mM, sulfato de quinidina 0,024 mM, pH 7,5 (reagente de Magnotti B) para AChE, à temperatura ambiente [58]. A determinação da atividade enzimática foi realizada cineticamente em 440 nm, sendo esta expressa em nmoles/mL de produto formado (tiocolina) por minuto. Para a conversão das absorvâncias em atividade enzimática foram utilizadas curvas padrão de L-cisteína.

Para realização da curva padrão de cisteína foram utilizados de 10 a 500 nmoles no meio reacional, nas mesmas condições de determinação da atividade enzimática, o detalhamento do processo pode ser observado no anexo 7.

O Cálculo da atividade enzimática foi realizado pela equação:

$$A = \left[\frac{(\text{Abs} / \text{min} \times 1000) - 0,28}{2,17} \right] \times 100$$

Onde: A = atividade em UI/mL; Abs: absorvância;

0,28: Coeficiente linear da curva de L-cisteína, obtida em nosso laboratório

2,17: Coeficiente angular da curva de L-cisteína, obtida em nosso laboratório

Fator de diluição 100.

III.6.4 - Análise Colinesterásica pelo Método de Ellman Modificado por Oliveira-Silva

Neste método [18], as alíquotas de sangue foram centrifugadas a 500 x g durante 15 min para a obtenção da fração plasmática e eritrocitária. Ambas as frações foram alíquotadas em volumes de 500 µL e congelados a -20°C por 24 horas, sendo que as alíquotas de hemácias foram ressuspensas em tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,6 (tampão de lise) na proporção de 1:10. Após esta etapa de congelamento, as hemácias foram submetidas a três processos de centrifugação a 4000 x g durante 15min a 8°C, para remover a hemoglobina. Ao final de cada processo, o sobrenadante foi desprezado e as membranas de hemácias sedimentadas foram novamente ressuspensas em tampão de lise na mesma proporção supracitada. Após a terceira centrifugação, o sobrenadante foi retirado acrescentando-se 500 µL de tampão fosfato de sódio 0,12 M, pH 7,6 (tampão de análise), obtendo-se uma suspensão de membranas de eritrócitos, sem os componentes intracelulares. Como não foi utilizado nenhum detergente, essas membranas tendem a se resselar formando novamente a estrutura da membrana celular. Esta estrutura é denominada no método original como "ghost" de eritrócitos.

Para a determinação da atividade da BChE, foram adicionados em tubos de análise 4,0 mL de tampão de análise, 1,0 mL de solução de DTNB 2 mM, 50 µL de plasma e 1,0 mL de solução de butirilticolina 9,0 mM. As amostras de plasma e de substrato foram adicionadas somente no momento da leitura no espectrofotômetro, quando então a reação enzimática teve início.

Para a determinação da atividade da AChE, foi adotado o mesmo procedimento acima descrito, com exceção do plasma que foi substituído pela amostra de ghost e acetiltiocolina 6,6 mM que foi utilizada como substrato. As alíquotas foram analisadas cineticamente a 412 nm, à temperatura ambiente. As atividades ópticas foram convertidas em μ moles de substrato hidrolizado / mL de amostra por minuto, com o auxílio de uma curva padrão de L-cisteína.

Para realização da curva padrão de cisteína foram utilizados de 10 a 500 nmoles no meio, nas mesmas condições de determinação da atividade enzimática (detalhamento no anexo 7).

A atividade enzimática da AChE eritrocitária foi corrigida pela concentração de proteína nas amostras de "ghost". A concentração de proteína foi determinada pelo método de Cunha [59], utilizando-se albumina bovina como padrão. Neste método, 50 μ L da amostra foram adicionados em 4,4 mL de água deionizada, com 200 μ L de NaOH 20% (p/v) e 300 μ L de reagente de Follin-Ciocalleau, sob agitação. Após 5 minutos, as absorvâncias foram determinadas a 660 nm.

O cálculo da atividade enzimática foi realizado pela aplicação da fórmula:

$$A = \left[\frac{(\text{Abs} / \text{min} \times 1000) - 2,96}{2,11} \right] \times 20$$

Onde: A = atividade em nmoles /mL/ min e A/1000 = atividade em μ moles mL / min; Abs: absorvância

2,96: Coeficiente linear da curva de L-cisteína, obtida em nosso laboratório

2,11: Coeficiente angular da curva de L-cisteína, obtida em nosso laboratório

Fator de diluição: 20

Cálculo da Atividade específica da AChE foi feito através da formula: $Ae = \frac{A}{P}$

Ae = atividade específica (μmoles/min/mg); **A/1000** = atividade (μmoles /mL /min); **P**: concentração de proteína (mg/mL).

III.6.5 - Coeficiente de Variação Intra e Inter-Ensaio

Para a avaliação do coeficiente de variação intra-ensaio, as atividades colinesterásicas de amostras de sangue foram determinadas pelos três diferentes métodos, por seis vezes no mesmo dia, com um intervalo de tempo de 1 hora entre as análises, enquanto que para avaliação do coeficiente de variação inter-ensaio, amostras de sangue foram coletadas em diferentes dias, sendo as atividades colinesterásicas imediatamente determinadas pelo método de Lovibond® e pelo método de Magnotti. No método de Oliveira-Silva, frações de plasma e "ghost" foram separadas em seis alíquotas cada e congeladas posteriormente. Uma alíquota de cada fração foi descongelada a cada dia, para a determinação das atividades colinesterásicas das mesmas.

III.7 - Avaliação das atividades das colinesterases em função do processo de trabalho

Para esta avaliação, foram consideradas as determinações das atividades individuais em cada uma das coletas. As coletas foram divididas em três períodos

distintos: cultivo, colheita e preparo da terra. Sendo denominado "cultivo" o período quando a maior parte das lavouras encontrava-se em desenvolvimento. Os demais períodos têm seu sentido literal. Foram agrupadas três avaliações em cada período.

III.8 - Estabelecimento dos pontos de corte e avaliação da exposição

Neste trabalho foram estabelecidos dois critérios para determinação da exposição excessiva. Os valores de atividade das enzimas AChE e BChE obtidos dos próprios trabalhadores, quando afastados por mais de 30 dias do contato com agentes anticolinesterásicos, foram considerados padrões "ouro" e todas as conjecturas do trabalho foram baseadas nestes valores individuais de referência. O segundo critério, utilizado para avaliar a exposição excessiva, foi o valor médio do grupo controle subtraído de 1,6425 desvios. Este critério, embora não sendo ideal, teve de ser utilizado durante o curso inicial do trabalho para dar respostas aos trabalhadores possivelmente expostos. Finalmente, um terceiro critério, baseado na subtração de 30% da atividade média do grupo não exposto, foi utilizado meramente para comparação metodológica, não sendo utilizado em momento algum para inferir sobre a exposição excessiva dos indivíduos.

III.9 - Avaliação do comportamento das colinesterases em função do intervalo de tempo entre a exposição e a coleta das amostras.

O nosso regime de coleta associado a possibilidade de obtenção de valores individuais de referência permitiu avaliar o comportamento das colinesterases em função do intervalo de tempo entre a exposição e a coleta das amostras.

Para esta análise, foram feitas diversas estratificações dos intervalos de tempo entre a exposição e a coleta das amostras, a fim de se observar diferenças significativas entre os períodos, visto que seria impossível estabelecer, com um “n” significativo, a exposição dia-a-dia de todos os intervalos de tempo entre 1 e 30 dias, ou seja, ao final do trabalho teríamos diversos indivíduos em intervalos de 7 e 3 dias e muito poucos com 4 e 5 dias de intervalo entre a exposição e a coleta das amostras, sendo, portanto, estratificados em um grupo de até 7 dias. Abaixo são exemplificadas algumas estratificações do grupo de trabalhadores expostos:

Exemplo 1	De 1 a 7 dias	Mais de 7 dias	
Exemplo 2	De 1 a 7 dias	De 8 a 15 dias	Mais de 15 dias
Exemplo 3	15 dias	Mais de 15 dias	
Exemplo 4	De 1 a 10 dias	Mais de 10 dias	
Exemplo 5	De 1 a 10 dias	De 11 a 20 dias	Mais de 20 dias

III.10 - Cálculos estatísticos

As análises estatísticas foram, na maior parte das vezes, realizadas pelo pacote estatístico SPSS[®] e, em algumas ocasiões, a planilha eletrônica Excel[®] foi utilizada. Isto porque, em um primeiro momento, foram realizados testes simples de médias populacionais e desvio padrão. Para outros estudos mais complexos, como avaliação das atividades enzimáticas em função do tempo de exposição, foi necessária a utilização da análise de variância. Finalmente, para a análise dos

valores de atividade nos grupos de crianças e adolescentes foi utilizado o teste de Scheffer, que possibilita múltiplas comparações lineares para variáveis cuja variância entre os grupos são iguais.

IV – Resultados e Discussão

"O resultado de qualquer pesquisa científica séria só pode ser o surgimento de duas novas questões, onde antes só havia uma."

Thorstein Veblen

IV.1 - Avaliação da sensibilidade das metodologias utilizadas em campo em relação ao método de Oliveira-Silva

As grandes distâncias entre o local de exposição e o local de análise das amostras de sangue precipitam dificuldades logísticas (armazenamento e conservação) que poderiam limitar a utilização de metodologias baseadas no princípio de inibição das colinesterases exclusivamente para agentes organofosforados, devido a reversibilidade da inibição provocadas por carbamatos.

Uma alternativa para também avaliar a exposição a carbamatos seria a utilização de métodos de campo (Kits) [56,60,61], que de um modo geral apresentam baixa sensibilidade. Nossa opção foi inicialmente verificar a aplicabilidade do método de Oliveira-Silva, uma adaptação do método de Ellman [62] que utiliza frações congeladas de plasma e hemácias. Tal metodologia foi aplicada com sucesso na detecção da intoxicação por OP [18]. No entanto, sua aplicabilidade para carbamatos não havia sido evidenciada. Para tal, foram avaliados parâmetros cinéticos de reversibilidade das inibições enzimáticas, em relação ao processo de congelamento e os resultados foram comparados com os obtidos por duas metodologias que utilizam amostras frescas de sangue total.

Os métodos escolhidos para esta etapa foram aqueles mais utilizados em programas de monitoramento ocupacional, como o método de Ellman modificado por Magnotti [57], uma das metodologias mais sensíveis utilizadas no campo, e o método de Lovibond [56], mais recomendado pela OMS para avaliação da exposição a

agentes anticolinesterásicos em geral, sendo utilizado um inibidor reversível e um irreversível [18]. Cabe ressaltar, que embora os resultados para as diferentes concentrações sejam apresentados nosso objetivo foi verificar o perfil de resposta das metodologias para o conjunto de concentrações estudadas.

IV.1.1 – Avaliação da inibição da butirilcolinesterase pela adição de organofosforados (etil-paraoxon) em amostras de sangue *in vitro*

Nossos resultados de inibição da colinesterase plasmática (BChE) para as diversas concentrações de etil-paraoxon, cuja atividade enzimática foi determinada pelo método de Magnotti e pelo método de Oliveira-Silva, são demonstrados na Figura 4. A saturação da BChE por inibição com etil-paraoxon foi demonstrada a partir da concentração de 0,5 µg/mL por ambos os métodos. No entanto, pelo o método de Magnotti, nesta mesma concentração foi obtido um percentual de inibição de $68,4\% \pm 5,5$ contra $95,9\% \pm 0,11$ observado através do método de Oliveira-Silva.

A inibição atingiu um percentual máximo de $99,6\% \pm 0,5$ pelo o método de Oliveira-Silva, enquanto que pelo método de Magnotti esse percentual foi de $76,3\% \pm 1,91$, ambos na concentração de 50 µg/mL. Isto permite assegurar que para concentrações superiores a 0,5 µg/mL, a sensibilidade de ambos os métodos é significativamente prejudicada de modo que um aumento de 100 vezes na concentração de etil-paraoxon causou um acréscimo de apenas 7,9% de inibição pelo método de Magnotti e de 3,7% por Oliveira-Silva.

Na concentração de 0,03 µg/mL o método de Magnotti demonstrou um percentual de inibição de $25,3\% \pm 4,2$ enquanto um percentual de $41,6\% \pm 10,1$ foi demonstrado por Oliveira-Silva para a mesma concentração. Em 0,06 µg/mL foi detectada uma inibição de $35,9\% \pm 12,6$ por Magnotti, entretanto, quando analisada pelo método de Oliveira-Silva, esta mesma concentração demonstrou um percentual de inibição de $74,1\% \pm 3,9$, o equivalente ao dobro da inibição demonstrada por Magnotti.

Figura 4: Percentuais de inibição enzimática da BChE pela adição de organofosforados (etil-paraoxon) em amostras de sangue *in vitro*.

A análise em conjunto dos resultados demonstrou que o método de Oliveira-Silva apresentou maior percentual de inibição para quase todas as concentrações testadas. Tal fato pode ser atribuído a pureza do sistema enzimático analisado isoladamente em ausência de hemoglobina. A hemoglobina apresenta um pico de absorção próximo a 400nm, que se sobrepõe ao pico de absorção do complexo tiocolina-DTNB. Uma reduzida atividade enzimática, na verdade, pode ser mascarada por uma absorção de luz pela hemoglobina, o que diminui consideravelmente o percentual de inibição enzimática. No método de Oliveira-Silva, esta interferência não ocorre, conferindo maior sensibilidade ao método na detecção de intoxicações agudas por etil-paraoxon [18].

Os maiores percentuais obtidos por Oliveira-Silva demonstraram também que o processo de centrifugação para separação das frações sangüíneas e o posterior congelamento do plasma por 24 horas não influenciaram a estabilidade da inibição enzimática da BChE pelo etil-paraoxon, quando comparados ao método de Magnotti que utiliza amostras frescas de sangue total.

Não foi observada nenhuma influência pela presença de metanol até concentrações de 1% de metanol na atividade colinesterásica do sangue em nenhum dos métodos estudados (resultado não mostrado).

Curvas de inibição utilizando o kit de Lovibond somente foram feitas para AChE, já que o método utiliza perclorato de acetiltiocolina como substrato, não determinando as atividades colinesterásicas de forma isolada.

IV.1.2- Avaliação da inibição da acetilcolinesterase pela adição de organofosforados (etil-paraoxon) em amostras de sangue *in vitro*

Percentuais de inibição enzimática da acetilcolinesterase eritrocitária (AChE) por etil-paraoxon são demonstrados na Figura 5. A saturação do sistema enzimático foi observada a partir da concentração de 0,5 µg/mL em todos os métodos, demonstrando a perda da sensibilidade para concentrações superiores. Pelo método de Oliveira-Silva, nesta mesma concentração foi observado um percentual de inibição de $95,07\% \pm 2,87$, enquanto que pelo método de Magnotti e com o kit de Lovibond esses percentuais foram de $84,6\% \pm 3,63$ e $91,6 \pm 7,21$ respectivamente.

Em 0,03 µg/mL foi observado um percentual de inibição de $20,7\% \pm 3,2$ pelo método de Magnotti, $11,1\% \pm 13,9$ por Oliveira-Silva e $23,7\% \pm 9,3$ pelo método de Lovibond. A concentração de 0,06 µg/mL demonstrou uma inibição de $34,7\% \pm 11,9$ pelo método de Magnotti. Por Oliveira-Silva foi demonstrado um percentual de $47,7\% \pm 9,8$ e pelo método de Lovibond foi observado $39,6\% \pm 28,2$.

Segundo Rang e Dale [63], a BChE possui afinidade pela acetiltiocolina, com uma velocidade de hidrólise 4 vezes menor em relação a AChE para este mesmo substrato. No entanto, isto pode ocasionar um efeito aditivo na atividade enzimática observada da AChE, quando analisada em amostras de sangue total. Para minimizar este efeito aditivo, Magnotti [57] utilizou sulfato de quinidina, um inibidor específico da BChE, para determinação da atividade da AChE em amostras de sangue total.

O método de Lovibond, no entanto, não determina de forma isolada a atividade colinesterásica do sangue total, de modo que os percentuais de atividade

enzimática obtidos por este método refletem a atividade de ambas as colinesterases. Isto pode mascarar os reais percentuais de inibição da AChE eritrocitária por etil-paraoxon demonstrados pelo método de Lovibond que, neste caso, podem refletir a inibição de ambos sistemas colinesterásicos, embora em graus diferenciados. Em situações reais, este efeito pode comprometer a avaliação como será discutido posteriormente em relação ao aldicarb.

Os percentuais de inibição exibidos observados pelas metodologias que utilizam sangue fresco com os obtidos por Oliveira-Silva demonstram que o congelamento dos eritrócitos por 24 horas, seguido dos processos de centrifugação e lavagem para retirada de hemoglobina não desligaram o complexo enzima-inibidor assegurando a estabilidade da inibição enzimática para o inseticida em questão.

Figura 5: Percentuais de inibição enzimática da AChE eritrocitária pela adição de organofosforados (etil-paraoxon) em amostras de sangue *in vitro*.

IV.1.3 - Avaliação da inibição da butirilcolinesterase pela adição de carbamatos (aldicarb) em amostras de sangue *in vitro*

Os percentuais de inibição da atividade da colinesterase plasmática (BChE) após contaminação com aldicarb, determinados pelo método de Magnotti e pelo método de Oliveira-Silva são demonstrados na Figura 6. A análise do gráfico permite verificar que o método de Oliveira-Silva demonstrou maior percentual de inibição para todas as concentrações analisadas quando comparadas ao método de Magnotti, por razões já discutidas anteriormente. A partir da concentração de 0,5 µg/mL, pôde ser observada a saturação do sistema enzimático em questão para ambos os métodos, conforme foi observado para o etil-paraoxon. A enzima demonstrou uma média de inibição máxima de $97,6\% \pm 0,8$ quando analisada pelo método de Oliveira-Silva correspondente à concentração de 6,25 µg/mL de aldicarb, enquanto por Magnotti a inibição máxima apresentada foi de $55,0\% \pm 6,1$ na concentração de 50,0 µg/mL.

Foi observada pelo método de Magnotti uma inibição média de $6,9\% \pm 9,1$ na concentração de 0,03 µg/mL, enquanto que pelo método de Oliveira-Silva esta mesma concentração exibiu uma inibição média de $27,7\% \pm 2,53$, a qual só foi demonstrada por Magnotti em concentrações quatro vezes mais altas. Em 0,06 µg/mL foi obtido $7,6\% \pm 5,2$ de inibição pelo método de Magnotti, ao passo que um percentual de $51,7\% \pm 6,9$ foi obtido por Oliveira-Silva para a mesma concentração, ou seja, foi verificado um acréscimo de apenas 0,7% em relação a concentração de 0,03 µg/mL pelo o método de Magnotti, e um aumento de 24,0% de inibição foi

detectado por Oliveira-Silva. Na concentração de 0,12 $\mu\text{g/mL}$, o método de Magnotti detectou uma inibição de $29,7\% \pm 7,3$ contrastando com uma inibição de $72,6\% \pm 5,4$ detectada por Oliveira-Silva.

Estes dados demonstram a possibilidade de ocorrência de resultados falso negativos de exposições agudas em concentrações inferiores a 0,12 $\mu\text{g/mL}$, quando amostras de sangue total são analisadas pelo método de Magnotti, o que possivelmente não ocorreria pela determinação da atividade de BChE em amostras de plasma pelo método de Oliveira-Silva.

Figura 6: Percentuais de inibição enzimática da BChE pela adição de carbamatos (aldicarb) em amostras de sangue *in vitro*.

A comparação dos percentuais de inibição obtidos por ambos os métodos, nas diferentes concentrações de aldicarb demonstrou que o processo de centrifugação para separação das frações sangüíneas não foram capazes de promover o desligamento do complexo enzima-inibidor e, ainda posterior congelamento do plasma pôde contribuir para a estabilidade da inibição enzimática.

IV.1.4 - Avaliação da inibição da acetilcolinesterase pela adição de carbamatos (aldicarb) em amostras de sangue *in vitro*

Percentuais de inibição enzimática da acetilcolinesterase eritrocitária (AChE) contaminada por aldicarb são demonstrados na Figura 7. O método de Lovibond apresentou maior percentual de inibição para todas as concentrações testadas.

A saturação do sistema enzimático verificada através deste método método foi obtida a uma concentração de 25 µg/mL correspondente a uma inibição de $77,0\% \pm 3,5$, enquanto que, pelo método de Magnotti e Oliveira-Silva, o maior percentual alcançado foi de $69,5\% \pm 3,6$ na concentração de 200 µg/mL e $65,1\% \pm 4,8$ na concentração de 50 µg/mL, respectivamente.

A concentração de 0,03mg/mL demonstrou uma inibição de $8,5\% \pm 3,7$ pelo método de Lovibond. Pelo método de Magnotti, foi observado um percentual de $6,8\% \pm 3,1$ e por Oliveira-Silva, foi demonstrada uma inibição de $5,1\% \pm 7,3$ para esta mesma concentração. Em 0,06 µg/mL foi verificado um percentual de $5,9\% \pm 5,1$ pelo método de Magnotti e um percentual de $7,0\% \pm 2,0$ por Oliveira-Silva.

Entretanto, foi observada uma inibição de $18,7\% \pm 6,2$ para esta mesma concentração quando analisada pelo método de Lovibond.

Em linhas gerais, o método de Lovibond demonstrou maiores percentuais de inibição para todas as concentrações analisadas, os quais, porém não podem ser atribuídos a um único sistema colinesterásico de forma específica, como citado anteriormente. Este fenômeno terá um impacto profundo sobre a avaliação da exposição e será discutido mais detalhadamente em outra secção.

Figura 7: Percentuais de inibição enzimática da AChE eritrocitária pela adição de carbamatos (aldicarb) em amostras de sangue *in vitro*.

Os métodos de Magnotti e Oliveira-Silva demonstraram inibições equivalentes para todas as concentrações, indicando que o congelamento das hemácias e o posterior processo de centrifugação para retirada de hemoglobina para obtenção de "ghost" não promovem o desligamento do complexo enzima-inibidor, mesmo quando o agente anticolinesterásico é um inibidor reversível .

IV.1.5 - Coeficientes de Variação Intra e Inter-ensaio

Com o intuito de verificar a reprodutibilidade dos métodos em condições laboratoriais de análise, foram determinados os coeficientes de variação intra e inter-ensaio para cada metodologia estudada.

Nossos resultados demonstraram que todos os métodos apresentaram valores de coeficientes de variação intra-ensaio inferiores a 10% para ambas as colinesterases. Pelo método de Magnotti foi verificado um coeficiente de variação intra-ensaio de 4,88% para AChE e de 4,65% para BChE. Pelo método de Oliveira-Silva foi observado um coeficiente de variação de 4,04% para AChE e 7,62% para BChE. O método de Lovibond não determina de forma isolada a atividade colinesterásica do sangue total, de modo que os coeficientes de variação foram dados como atividade colinesterásica total, tendo sido obtido um coeficiente de variação intra-ensaio de 6,67%. A Tabela 1 demonstra os valores de coeficientes de variação intra-ensaio para os três métodos comparados

O coeficiente de variação inter-ensaio pelo método de Magnotti demonstrou um valor de 3,75% para AChE e 2,33% para BChE. Pelo método de Oliveira-Silva foi

verificado um valor de 10,0% para AChE e 3,35% para BChE. O método de Lovibond demonstrou um coeficiente de variação de 7,87%. Tais resultados apontam para a maior acurácia das análises das atividades colinesterásicas realizadas em condições laboratoriais adequadas, em relação as análises de campo, independente do procedimento analítico adotado. Os valores de coeficientes de variação inter-ensaio são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1: Valores de coeficiente de variação intra-ensaio

Método	Enzima	n*	Atividade	Desvio-padrão	C.V. (%)
Magnotti	AChE	6	5549,9 UI/mL	258,2	4,88
	BChE	6	3653,2 UI/mL	178,3	4,65
Oliveira-Silva	AChE	6	0,37µmoles/mg/min**	0,01	4,04
	BChE	6	5,46µmoles/mL/min (UI)	0,41	7,62
Lovibond	ChE	6	93,7%	6,25	6,67

Tabela 2: Valores de coeficiente de variação inter-ensaio

Método	Enzima	n*	Atividade	Desvio-padrão	C.V. (%)
Magnotti	AChE	6	5381,3 UI/mL	201,8	3,75
	BChE	6	3733,1 UI/mL	86,6	2,33
Oliveira-Silva	AChE	7	0,40µmoles/mg/min **	0,04	10,0
	BChE	9	6,26µmoles/mL/min (UI)	0,21	3,35
Lovibond	ChE	6	91,6%	7,21	7,87

* As análises para estes experimentos foram realizadas em triplicata

** Os valores expressos em µmoles/mL/min são equivalentes às UI e correspondem às atividades enzimáticas. Os valores expressos em µmoles/mg/min correspondem a atividade enzimática específica, pois as concentrações de proteína nas preparações de ghost do método de Oliveira-Silva são variáveis.

IV.2 - Características da população exposta

Inicialmente desejamos trabalhar com pequenos produtores que utilizassem predominantemente mão de obra familiar em regime de policultura de alta rotatividade. Esta opção foi feita por duas razões: a primeira com o intuito de eliminarmos algum viés derivado da relação de trabalho (empregado x empregador); a segunda foi o fato de que as policulturas de alta rotatividade apresentam culturas em diferentes estágios de desenvolvimento o que, em tese, proporciona uma maior possibilidade de exposição a agrotóxicos em relação a monoculturas que apresentam uma notória sazonalidade na utilização de agrotóxicos [11].

Nossos resultados apresentados na Figura 8 demonstram que o objetivo foi alcançado, pois em mais de 90% casos os três parâmetros iniciais foram observados. Foi observado também o baixo nível educacional e a precariedade na orientação de uso dos agrotóxicos. Em relação a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), mesmo sendo observado alto índice de utilização (70%), geralmente o equipamento não era eficaz para proteger da exposição a agrotóxicos (ex. 50% dos trabalhadores relataram o uso de botas).

Esta opção nos impediu de utilizarmos inicialmente os valores de referência obtidos do próprio indivíduo antes que ocorresse a exposição, pois estes trabalhadores não apresentavam um processo homogêneo de exposição, ou seja cada qual apresentava-se em uma situação específica de acordo com a etapa e a cultura que estava sendo praticada em sua propriedade.

Figura 8 – Perfil da população exposta a agrotóxicos

IV.3 - Estabelecimento do ponto de corte para a avaliação da exposição

Neste momento, necessitaríamos de um valor de referência “provisório” para que pudéssemos dar respostas imediatas aos trabalhadores envolvidos no estudo e, ao longo do trabalho, através do acompanhamento das atividades colinesterásicas e do processo de trabalho estabeleceríamos, então, os valores individuais de referência, visto que ao longo do ano agrícola, em momentos distintos, invariavelmente todos trabalhadores estiveram mais de 30 dias sem contato com agrotóxicos, tempo suficiente para que as atividades colinesterásicas retornem ao

seu valor de normalidade. Nossa meta, entretanto, sempre foi a de utilizar o próprio valor de cada indivíduo.

Em situações onde não é possível estabelecer valores anteriores a exposição, usualmente são utilizados valores construídos através da determinação das atividades destas enzimas em populações não expostas de onde seria obtida uma atividade média e então deste valor seria subtraído de 20 a 30% da atividade e estabelecido o valor de referência limite, abaixo deste limite o indivíduo seria considerado excessivamente exposto.

Ocorre que este “valor de subtração” tem duas origens distintas: uma clínica e outra estatística. Individualmente, a representação é clínica, pois não se observa qualquer sintomatologia clínica até uma diminuição de 25% da atividade determinada anteriormente à exposição. Estatisticamente, quando se trata do valor de referência de uma população este valor de subtração deveria reproduzir 1,645 desvios da média, o que, dependendo da distribuição das atividades, representaria 30% da atividade média. Logicamente, este recurso só se aplica se considerarmos que as atividades enzimáticas destes indicadores seguem uma distribuição normal. Seguindo este tratamento, 90% da população estaria dentro de um universo de normalidade e como só é considerada a diminuição da atividade e não o seu aumento, ambos representados pelas caudas da distribuição, teríamos apenas 5% de probabilidade de um indivíduo apresentar uma atividade abaixo deste limite e não estar exposto excessivamente a um agente anticolinesterásico (Figura 9).

Figura 9 – Distribuição normal das atividades e estabelecimento do ponto de corte.

Figura 10 – Distribuição normal das atividades em populações homogêneas (A) e heterogêneas (B) e adoção de dois sistemas de estabelecimento do ponto de corte.

Dependendo da homogeneidade da população, como observado em população indígena (Figura 10A) [64], o desvio da média seria menor, o que iria gerar um valor de subtração muito inferior a 30% e, conseqüentemente, um ponto de corte mais conservador que aquele obtido pela simples subtração de 30% da média. Este efeito faria com que indivíduos excessivamente expostos (zona negativa) fossem considerados normais, gerando assim resultados falso negativos.

Para populações com maior heterogeneidade (Figura 10B) como observado em alguns trabalhos realizados em nosso laboratório [65,66], o desvio seria superior ao valor obtido pela subtração de 30% da média, com isto indivíduos normais, com atividades basais baixas, seriam considerados excessivamente expostos, originando os resultados falso positivos (zona positiva). Se por um lado, estes resultados protegem o trabalhador (promove o afastamento), por outro desqualifica o indicador de efeito, além de gerar prejuízos econômicos e psicológicos, às vezes de mais difícil reversão que as atividades colinesterásicas.

Este fenômeno já foi detectado pelas indústrias que produzem os Kits, que percebendo a enorme variação das atividades em populações étnica e socialmente distintas, opta pela adoção de faixas de normalidade que chegam a representar mais de 50% do valor médio da população com o intuito de aumentar seu mercado consumidor potencial [56,60,61,65].

IV.4 - Avaliação do comportamento das colinesterases em função do intervalo entre a exposição e a coleta das amostras

De um modo geral, os programas de monitoramento ocupacional realizados no meio rural são planejados de forma a reduzir as visitas a campo devido às dificuldades logísticas. Desta forma, ao contrário do que ocorre comumente na indústria, as coletas de amostra são realizadas em intervalos de tempo que variam de semanas a meses. Este fato, associado ao processo heterogêneo de exposição em policulturas, tende a construção de um painel variado de intervalos de tempo entre a exposição e a análise das atividades colinesterásicas. Nosso objetivo, neste momento foi verificar a influência desta intermitência sobre as atividades de AChE e BChE.

IV.4.1 - Comportamento da atividade de AChE

Nossos resultados, em relação a AChE, apontaram para uma intensa redução da atividade no período até 10 dias que se segue a exposição, sendo nítida a tendência de elevação da atividade de forma gradual até o vigésimo dia após a exposição, quando então atinge níveis basais semelhantes aos valores observados antes da exposição. A análise de variância entre os grupos apontou para diferenças significativa entre as médias dos níveis de acetilcolinesterase nos três grupos avaliados com um nível significância de 5% (p-valor = 0,002). A análise de múltiplas

comparações revelou que apenas existiu uma diferença entre as médias do grupo 1, comparado com o grupo 3 (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise de variância entre os três diferentes grupos, estratificados de acordo com o tempo decorrido entre a exposição e a coleta das amostras.

Nível de colinesterase	MÉDIAS		p-valor
acetilcolinesterase	Grupo 1: até 10 dias	Grupo 2 : 11 a 19 dias	0,330
	68,46	81,00	
	Grupo 1: até 10 dias	Grupo 3: mais de 20 dias	0,001
	68,46	102,71	
	Grupo 2 : 11 a 19 dias	Grupo 3: mais de 20 dias	0,002

Nossos dados apontam para a possibilidade de avaliação da exposição pregressa até um período máximo de 20 dias após a exposição. Este prazo é mais conservador que os descritos na literatura que apontaram para um prazo de 30 dias [33] e em algumas situações 40 dias [67]

Outro fato relevante observado no estudo foi que indivíduos com atividades de AChE abaixo de 60%, não apresentavam sintomatologia de intoxicação. Aparentemente, estes resultados destoam do descrito por diversos autores [29,33,53,68,69] contudo não podemos perder de vista que estes relatos de manifestação sintomatológica se dão após episódios agudos de exposição, ao passo que, na lógica do nosso trabalho, provavelmente estávamos observando o efeito de uma exposição crônica, onde o indivíduo estaria exposto sucessivamente a baixas doses, que isoladamente seriam insuficientes para desencadear as manifestações clínicas.

Esta idéia é reforçada pelo processo de gênese da AChE que só ocorre durante a hematopoese e se encerra com a morte celular [47]. Logo, a atividade da AChE sanguínea é o somatório das atividades colinesterásicas das hemácias com diferentes tempos de vida. Sob esta perspectiva, a avaliação das atividades de AChE possibilita não somente observar exposições agudas não recentes, mas principalmente o somatório de exposições crônicas. Logicamente esta enzima também serviria para o diagnóstico de exposições agudas recentes, no entanto a determinação da atividade de BChE seria de mais adequada devido a sua facilidade de execução.

IV. 4.2 - Comportamento da atividade de BChE

Inicialmente, o comportamento da BChE, em função do intervalo entre a exposição e coleta das amostras foi similar ao da AChE apresentando uma redução significativa até os primeiros 10 dias após a exposição. Porém, no intervalo que se sucedeu a este primeiro período (11 a 20 dias) o comportamento foi diametralmente oposto ao esperado, ou seja o sistema enzimático apresentou atividades significativamente maiores que os valores obtidos anteriormente a exposição. Em alguns casos individuais este aumento atingiu valores de 140% do inicial. Após este período, as atividades apresentaram uma tendência de redução, voltando a normalidade em períodos maiores que 20 dias, estas médias foram significativamente diferentes segundo a análise de múltiplas comparações (Tabela 4).

Este fenômeno atípico não é incomum para outras enzimas hepáticas, ou seja, quando ocorre um aumento significativo e sistemático de substrato o tecido amplifica a síntese da enzima responsável por sua metabolização [70].

Tabela 4 – Análise de variância entre os três diferentes grupos, estratificados de acordo com o tempo decorrido entre a exposição e a coleta das amostras.

Nível de colinesterase	MÉDIAS		p-valor
butirilcolinesterase	Grupo 1: até 10 dias	Grupo 2 : 11 a 19 dias	0,000
	79,14	115,96	
	Grupo 1: até 10 dias	Grupo 3: mais de 20 dias	0,000
	79,14	99,03	
	Grupo 2 : 11 a 19 dias	Grupo 3: mais de 20 dias	0,000
	115,96	99,03	

O fato de não conhecermos o substrato natural da BChE não nos permite afirmar que o mesmo não existe. Considerando que, em um processo de exposição, haveria a diminuição das enzimas ativas, podemos supor que este substrato hipotético se acumularia precipitando a amplificação da síntese do sistema enzimático. Este efeito não é observado em exposições agudas, possivelmente pelo tipo de indução enzimática, que pode se processar de duas formas: por amplificação da atividade do RNA mensageiro ou por aumento na síntese do RNA [71], no caso as evidências relativas ao tempo de síntese retardado apontam para o segundo mecanismo.

Este fenômeno de indução da BChE nunca foi evidenciado em humanos, só tendo sido descrito em bovinos em experimentação em uma única publicação [58], mas não recebeu a atenção devida, pois não foi mais estudado ou mesmo observado.

Independente dos elementos geradores do fenômeno, por nós denominado rebote, a sua não observação nos programas de monitoramento ocupacional irão comprometer de forma dramática a interpretação dos resultados (Figura 11A). Diversas metodologias utilizam o sangue total, ou seja, o somatório das atividades de BChE e AChE, nestas situações poderíamos ter um hiato temporal entre a exposição e a coleta das amostras (11 a 20 dias) onde teríamos ações antagônicas destes sistemas enzimáticos criando um intervalo de divergência (Figura 11B). Invariavelmente, um indivíduo exposto a anticolinesterásicos monitorado neste período, através de Kits se apresentaria dentro do padrão de normalidade mesmo que estivesse excessivamente exposto.

Este efeito rebote, por razões óbvias, não poderia ser observado em contaminações *in vitro*, tal consideração poderia explicar porque o método de Lovibond *in vitro* apresentou maior sensibilidade para AChE eritrocitária inibida por aldicarb em relação aos demais métodos, pois uma maior biossíntese de BChE mascararia a inibição de AChE.

IV.5 - Avaliação da exposição e impacto da adoção dos diferentes sistemas de estabelecimento do ponto de corte

Nas etapas experimentais a seguir descritas só foram considerados os trabalhadores adultos entre 18 e 60 anos. Cabe ressaltar as dificuldades de participação em um processo longo e invasivo. Embora 103 trabalhadores tenham participado, os resultados desta etapa são relativos a apenas 42 que atenderam aos

questos básicos que foram: estar afastado do uso de agrotóxicos a mais de 30 dias em pelo menos uma das coletas e terem participado em pelo menos quatro da coletas.

Figura 11A – Perfil das atividades enzimáticas (AChE e BChE) em função do tempo decorrido entre a exposição e a coleta das amostras. Figura 11B – Curvas de tendência das atividades enzimáticas e intervalo de divergência gerado pelo efeito rebote.

IV.5 - Avaliação da exposição e impacto da adoção dos diferentes sistemas de estabelecimento do ponto de corte

Nas etapas experimentais a seguir descritas só foram considerados os trabalhadores adultos entre 18 e 60 anos. Cabe ressaltar neste ponto as dificuldades de participação voluntária em um processo de avaliação de exposição longo e invasivo. Embora 103 trabalhadores tenham participado, os resultados desta etapa são relativos a apenas 42 que atenderam aos quesitos básicos que foram: estar afastado do uso de agrotóxicos a mais de 30 dias em pelo menos uma das coletas e terem participado em pelo menos quatro das coletas.

Nossos resultados demonstraram uma alta incidência de eventos de exposição excessiva 32,4% para AChE e 6,7% para a BChE. O índice de exposição para pelo menos um dos indicadores atingiu a faixa de 33,7%, isto porque, na maioria das vezes os indivíduos que se apresentaram excessivamente expostos pelo indicador BChE, também estavam pelo outro indicador (AChE). Foi demonstrado um nível considerável de reincidência de episódios de exposição excessiva (17,4%) dos indivíduos se apresentaram mais de uma vez expostos excessivamente.

Estas diferenças substantivas entre os resultados obtidos pelos diferentes indicadores somado ao efeito rebote nos remetem a aplicabilidade de cada um dos indicadores, ficando claro que a atividade de AChE seria mais adequada para avaliar exposições crônicas, ao passo que a atividade de BChE, por sua praticidade de verificação seria adequada para processos agudos de exposição, onde respostas rápidas são necessárias (emergências).

Resultados semelhantes foram obtidos por McCurdy *et al.* [67] no estudo de trabalhadores rurais da Califórnia (Figura 12). Neste trabalho, foi claramente demonstrada a maior habilidade dos indicadores de efeito (AChE) em relação aos de dose interna (metabólitos urinários por CG) no monitoramento ocupacional, nas situações onde não há possibilidade de controle do tempo entre a exposição e a coleta das amostras.

Figura 12 -Dados publicado por Mccurdy, S.A.(1994) – Atividades colinesteráricas de BChE (A), AChE (B) e Alquil-fosfato urinário (C) de trabalhadores rurais em função do tempo entre a exposição e a coleta de amostras [67]

Por razões de cunho estatístico e relacionados aos processos de trabalho, as coletas foram divididas em três períodos distintos: cultivo, colheita e preparo da terra, sendo observadas variações significativas no índice de exposições excessivas 28, 38 e 0%, respectivamente para pelo menos um dos indicadores. Esta observação é relevante, pois os estudos pontuais de avaliação de exposição seguem mais a logística do organizador do estudo que dos expostos. Este detalhe pode distorcer completamente a percepção da realidade da exposição.

Após a avaliação da exposição através do próprio indicador, foi estudado o impacto da adoção de diferentes valores de referencia no quadro de exposição. Nesta etapa foram considerados 54 trabalhadores que estiveram afastados do uso de agrotóxicos a mais de 30 dias em pelo menos uma das coletas, independente do número de participações nas coletas.

Foi observado que a adoção de um valor médio de uma população não exposta subtraído de 30% (VR30) produziu aproximadamente 28% de resultados falsos negativos e 17% de falso positivos, totalizando 46% de resultados incorretos, probabilisticamente igual a se lançar uma moeda e aguardar o resultado. Quando adotamos o mesmo valor médio subtraído de 1,6425 desvios padrão (VR1,6) como valor de referência, aproximadamente 9% dos resultados foram falso positivos e 18% de falso negativos, totalizando assim 27% de todos resultados. sem consonância com a realidade. Ao longo do trabalho este foi o valor adotado até constatarmos o afastamento pontual de cada um dos trabalhadores (Tabela 5).

Neste trabalho também foi demonstrado que 11% dos trabalhadores, independente do fato de estarem expostos ou não, sempre apresentaram os valores

abaixo de VR30 (falso positivos), o mesmo não foi observado na adoção de VR1,6, possivelmente por estes trabalhadores apresentarem atividades representadas na área cinza da Figura 10B.

Tabela 5 – Avaliação dos resultados falso positivos e falso negativos gerados pela adoção de diferentes sistemas de estabelecimento do ponto de corte, em relação aos valores individuais de referência.

Indicador Valor de referência	ACHÉ %	BChE %	Total %
Próprio indivíduo	32,4	6,9	33,7
70% da atividade média da população	F(+) 16,1	F(+) 1,5	17,6
	F(-) 2,5	F(-) 26,4	28,9
Atividade média da população subtraída de 1,6425 desvios	F(+) 8,3	F(+) 1,5	9,8
	F(-) 2,7	F(-) 15,3	18,0

Σ 46,5

Σ 27,8

n = 247 avaliações realizadas em duplicata

As análises de atividade de AChE e BChE em crianças e adolescentes não expostos não apresentaram diferenças significativas nas diferentes faixas etárias, em relação aos valores de referência de adultos. Entretanto, a análise das atividades enzimáticas de crianças e adolescentes expostos vem apresentando resultados promissores de correlação entre a exposição e o desenvolvimento cognitivo e o próprio amadurecimento sexual, contudo este estudo já não é parte deste trabalho [66].

V – Conclusões

As coisas que podem nos destruir são:
política sem princípios, prazer sem
consciência, riqueza sem trabalho,
conhecimento sem caráter, negócios sem
moralidade e ciência sem humanidade"

Mahatma Gandhi

O método de Oliveira-Silva é perfeitamente adaptável para a determinação da exposição a anticolinesterásicos utilizados como agrotóxicos, reversíveis ou não.

As metodologias de campo utilizadas para determinação de AChE se apresentaram menos sensíveis que o método de Oliveira-Silva.

Foi constatado o despreparo dos trabalhadores rurais na utilização de agrotóxicos devido ao baixo nível educacional e a falta de assistência técnica para com estes.

Idealmente, deveria ser utilizado o valor de referência do próprio indivíduo, contudo na impossibilidade desta utilização é indicado o valor médio de atividade de populações não expostas subtraído de 1,6425 desvios padrão;

A BChE apresentou comportamento atípico no período entre 11 e 20 dias após a exposição, desaconselhando a utilização da atividade colinesterásica total do sangue que apresenta reduções das atividades de AChE;

Os processos de exposição excessiva não se processam de forma homogênea ao longo do ano agrícola mesmo em regiões de policultura.

VI - Referências Bibliográficas

- 1- LARINI, L. *Toxicologia dos praguicidas*. São Paulo: Manole, 1999.
- 2- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *International code of conduct on the distribution and use of pesticides*. Rome, 1986.
- 3- SOUTHWICK, C. H. *Global ecology and human perspectives*. New York: Ed. Oxford, 1996.
- 4- OLIVEIRA-SILVA, J.J. Avaliação Da Exposição Humana A Agrotóxicos. In: PERES, F.; COSTA, J. *É veneno ou é remédio? - Agrotóxicos Saúde e Ambiente*. Rio de Janeiro : Ed. Fiocruz, 2003.
- 5- MILESON B.E. CHAMBERS J.E. CHEN W.L. DETTBARN W. EHRICH M. ELDEFRAWI A.T. GAYLOR DW. HAMERNIK K. HODGSON E. KARCZMAR AG. PADILLA S. POPE C.N. RICHARDSON R.J. SAUNDERS D.R. SHEETS LP. SULTATOS L.G. WALLACE K. B. Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides. [Review] *Toxicological Sciences*. v. 41, n. 1, p 8-20, 1998.
- 6- SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA (SINDAG). *Vendas de pesticidas por estados brasileiros*. Disponível na Internet via URL: <http://www.sindag.com.br/EST97989900.zip> Arquivo capturado em 2002.
- 7- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO/UNEP). *Public health impact of pesticides used in agriculture*. Geneva, 1990.
- 8 - SOARES, W.; ALMEIDA, R.; MORITZ, V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 19, n. 4, p. 1117-1127, Ago 2003.
- 9- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2002 *População residentes no ano de 2001 segundo o PNAD (Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios)*. Disponível na Internet via URL: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=2>
- 10- KHUSH, G. S. Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics*, v.2, n.10, p 815-822, 2001.

- 11- PIMENTEL, D. Green revolution agriculture and chemical hazards. *The Science of the Total Environment*, v. 188, n.1, p. S86-S98, 1996.
- 12- OLIVEIRA- SILVA, J.J. Evaluation of the influence of social-economic factors on pesticide poisoning in a community of rural works at Rio de Janeiro State. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n.2, p.130-135, 2001.
- 13- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). *Os ecossistemas brasileiros e os principais macrovetores de desenvolvimento*. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Secretaria de Coordenação dos Assuntos do Meio Ambiente, Programa Nacional do Meio Ambiente, Brasília, 1996.
- 14- Disponível na Internet via URL:
http://200.156.34.123/CIDE/tabelas%20fixas/IDH_1991_2000_RJ.xls
Arquivo capturado em 2003
- 15- OLIVEIRA-SILVA, J.J. O Sistema De Notificação Das Intoxicações – O Fluxograma Da Joeira. In: PERES, F.; MOREIRA, J.C. *É veneno ou é remédio? - Agrotóxicos Saúde e Ambiente*. Rio de Janeiro : Ed. Fiocruz, 2003.
- 16- PINHEIRO, S.; NASSER, Y.; LUZ, D. *A agricultura ecológica e a máfia dos agrotóxicos no Brasil*. Rio de Janeiro : Edição dos autores, 1998.
- 17- FENGSHENG, H. Biological Monitoring of Occupational Pesticides Exposure. *Occupational Environmental Health*, v.65, p. S69-S76, 1993.
- 18- OLIVEIRA-SILVA, J.J., ALVES, S.R., INACIO, A.F., MEYER, A., SARCINELLI, P.N., MATTOS, R.C.O.C., FERREIRA, M.F.A., CUNHA, J.C., MOREIRA, J.C. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvment to the occupational monitoring in developing countries. *Human & Experimental Toxicology*, v. 19, p.173-177, 2000.
- 19- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Biological monitoring of chemical exposure in the workplace*, Geneva, V.1 pp. 237-251, 1996.
- 20- HOGSTEDT, C. Pesticides. In: *Occupational Health in Developing Countries*. Oxford : Ed. Jeyaratnam J. - Oxford University Press, 1992, p. 237-254.
- 21- MOREIRA, J. C., JACOB, S. C., PERES, F. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. *Ciência e Saúde Coletiva*, v.7, n.2, p.299-311, 2002.
- 22- WOLFF, M.S. Dermal levels of methyl-parathion, organochlorine pesticides, and acetylcholinesterase among formulators. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.48, p. 671-78, 1992.

- 23- RAHEEL, M. Dermal exposure to pesticides. The barrier effectiveness of protective clothing. *J. Environ. Health*, v. 51, n.2, p 82-84, 1988.
- 24- PADILLA, S. Paraoxon toxicity is not potentiated by prior reduction in blood achetylcholinesterase. *Toxicology and Applied Pharmacology*. V. 117, p. 110-15, 1992.
- 25- LEE, B.W.; LONDON, L.; PAULAUSKIS, J.; MYERS, J.; CHRISTIANI, D.C.; Association between human paraoxonase gene polymorphism and chronic symptoms in pesticide-exposed workers. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*. 45(2):118-22, 2003.
- 26- CASARETT AND DOULL'S. *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 4ª edição. New York : Ed Mary, O.; John Doull; Curtis D. Klaassen, 1991.
- 27- GOODMAM, L. S. Drogas Que Atuam No Sistema Nervoso Central. In: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1991.
- 28- INSTITUTO MÉDICO LEGAL AFRÂNIO PEIXOTO. Serviço de Toxicologia. *Sistema de Banco de Dados*. [Rio de Janeiro], 2004.
- 29- MORETTO, A. Experimental and Clinical Toxicology of Anticholinesterase Agents. *Toxicology Letters*, v.102-103, p. 509-513, 1998.
- 30- ARAÚJO, A.C.P.; NOGUEIRA, D.P.; AUGUSTO, L.G. Impacto dos praguicidas na saúde: Estudo da cultura de tomate. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, p. 309-313, 2000.
- 31- FERREIRA, A.B.H. *Novo Aurélio Século XXI: Dicionário da Língua Portuguesa*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.
- 32- EPA - Disponível na Internet via URL:
<http://www.epa.gov/scipoly/sap/1999/may/10xdoca3.pdf>
Arquivo capturado em 2004
- 33- COCKER, J.; MASON, H.J.; GARFITT, S.J.; JONES, K. Biological Monitoring of Exposure to Organophosphate Pesticides. *Toxicology Letters*, v.134, p. 97-103, 2002.
- 34- KHAN, E. Pesticides-Related Illness in California Farm Workers. *Journal of Occupational Medicine*, v. 18, p. 693-696, 1976.

- 35 - CALIFORNIA DEPARTMENT OF FOOD AGRICULTURE (CDFA). *Summary of reports from physicians of illnesses that were reported in California Department of Food Agriculture*. California, 1986.
- 36- MUKHERJEE, I., GOPAL, M. Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, v. 754, p. 33-42, 1996.
- 37- APREA, C.; COLOSIO, C.; MAMMONE, T.; MINOIA, C.; MARONI, M. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. [Review] *Journal of Chromatography : Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences*. v.769, n. 2, p 191-219, 2002.
- 38- GARRIDO, E.M.; LIMA, J.L.; DELERUE-MATOS, C.; BORGES, F.; SILVA, A.M.; PIEDADE, J.A.; OLIVEIRA-BRETT, A.M. Electrochemical and Spectroscopic Studies of the Oxidation Mechanism of the herbicide Propanil. *J Agric Food Chem*, v. 51, n. 4, p.876-879, 2003.
- 39- TURDEAN, G.L.; POPESCU, I.C.; ONICIU, L.; THEVENOT, D.R. Sensitive detection of organophosphorus pesticides using a needle type amperometric acetylcholinesterase-based bioelectrode. Thiocholine electrochemistry and immobilised enzyme inhibition. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, v. 17, n. 2, p. 107-115, 2002.
- 40- SAMPEDRO, M.C.; GOMEZ DE BALUGERA, Z.; GOICOLEA, A.; BARRIO, R.J. Determination of the insecticide pyridafenthion in river water, soils and wine by adsorptive stripping voltammetry. *Food Addit. Contam.* V. 15, n. 7, p. 793-800, 1998.
- 41- ROSNER, M.H.; GRASSMAN, J.A.; HAAS, R.A. Immunochemical techniques in biological monitoring. *Environmental Health Perspectives*, v. 94, p. 131-134, 1991.
- 42- MARCO, M.P.; GEE, S.; HAMMOCK, B.D. Immunochemical techniques for environmental analysis-II. Antibody production and immunoassay development. *Trends in analytical chemistry*, v. 14, n.8, p. 415-425, 1995.
- 43- APOSTOLI, P.; MINOIA, C. Significato ed utilita dei valori di riferimento in medicina del lavoro. *Valori di Riferimento e Valori Limite Nella Prevenzione Ambientale e Occupazionale*, p. 117-130, 1995.
- 44- OLIVEIRA-SILVA, J.J., CASTRO, H.A., TRANBELLINI, A. Busca de Novos Biomarcadores Inflamatórios. In: *Anais do V Congresso Brasileiro de Epidemiologia*. Curitiba, 2002.

- 45- SOUZA, M. *Interações entre pesticidas organoclorados e metais pesados com Na⁺, K⁺-ATPase de cérebro e eritrócitos de ratos*. Rio de Janeiro, 2000. Dissertação de Mestrado – Departamento de Biologia Celular e Genética do Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2000.
- 46- WILSON, B.W.; HENDERSON J.D.; RAMIREZ, A. O'MALLEY, M.A.; Standardization of clinical cholinesterase measurements. *International Journal of Toxicology*. v.21, n. 5, p385-388, 2002.
- 47- TAYLOR, P. The cholinesterases. *J. Biol. Chem.*, v. 266, n. 7, p. 4025-4028, 1991.
- 48- ANWAR, W. A.. Biomarkers of Human Exposure to Pesticides. *Environmental Health Perspectives*, v. 105 (Suppl. 4), 1997.
- 49- SARCINELLI, P.N.; PEREIRA, A.C.S.; MESQUITA, S.A.; MEYER, A.; OLIVEIRA-SILVA, J.J.; MENEZES, M.A.C.; MATTOS, R.C.O.C.; RABELLO, S.A.; MOREIRA, J.C.; WOLFF, M. Dietary and Reproductive Determinants of Plasma Organochlorine Levels in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *Environmental Research*, v. 91, n. 3, p. 143-150, 2002.
- 50- SCORECARD: Cancer definition. Disponível na Internet via URL: http://www.scorecard.org/health-effects/explanation.tcl?short_hazard_name=cancer , Arquivo capturado em 2004
- 51- NIOSH, *Manual of Analytical Methods*, 4th edition, Method 5600, Issue 1, V. 2, p. 5-20, 1994.
- 52- OLIVEIRA-SILVA, J.J.; DELLA ROSA, H.V.; PERES, F. - O Objeto Complexo do Estudo da Contaminação Ambiental e Humana por Agrotóxicos. *Revista Brasileira de Toxicologia*, São Paulo, v. 16, n. (prelo), 2004.
- 53- MORAES E. C. F. Índices Biológicos De Exposição A Agentes Químicos. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, v. 9, p. 7-12, 1981.
- 54- Acetyl- and pseudocholinesterase in blood B- AChE, B-PchE. Disponível na Internet via URL: www.occuphealth.fi/tt/osasto/tt/bio/orgphoib.htm . Arquivo capturado em 12/03/2003.
- 55- SIDELL, F.R.; KAMINSKIS, A. *Workshop On Pesticides*, 3ª edição, Cambridge, 1975.
- 56- Disponível na Internet via URL: http://www.tintometer.com/MEDICAL_CLINICAL.HTM#cholin, Arquivo capturado em 2004

- 57- MAGNOTTI, R. A.; DOWLING, K.; EBERLY, J. P.; MCCONNELL, R. S. Field Measurement of Plasma and Erythrocyte Cholinesterases. *Clinica Chimica Acta*, v. 315, p. 315-332, 1988.
- 58- HARLIN, K. S.; ROSS, P. F. Enzymatic-Spectrophotometric Method for Determination of Cholinesterase Activity in Whole Blood: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 7, n. 4, p. 616-619, 1990.
- 59- CUNHA, J. B.; LIMA, J. S.; FARIA, M. V. C. Brain Acetylcholinesterase as an *In Vitro* Detector of Organophosphorus and Carbamate Insecticides in Water. *Wat. Res.*, v. 25, n. 7, p. 835-840, 1991.
- 60- Disponível na Internet via URL:
http://wfidelearn.pssd.com/BinderView_PSS/MSDS_Products.asp
Arquivo capturado em 2004
- 61- Disponível na Internet via URL:
<https://www1.fishersci.com/Coupon?cid=1333&gid=183870&siid=OLOSR6114>
Arquivo capturado em 2004
- 62- ELMANN, G. L. ; COURTNEY, K. ; ANDRES, J.R.A. ; FEATHERSTONE, R. - A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol*, v. 7, p. 89-95, 1961.
- 63- RANG, H. P.; DALE, M.M. *Farmacologia*, 2ª edição. Rio de Janeiro : Ed. Guanabara Koogan, 1993.
- 64- KOIFMAN, S.; OLIVEIRA-SILVA, J. J.; MATTOS, R.C.O.C.; SARCINELLI, P.N.; MEYER, A.; MOREIRA, J.C. Cancer Cluster Among Young Adult Indians Living Near Power Transmission Lines in Bom Jesus do Tocantins, Pará, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 14, n. 3, 1998.
- 65- OLIVEIRA-SILVA, J.J.; FERREIRA, A.I.; NASCIMENTO, A.; MEYER, A.; PERES, F.; DELLA ROSA, H.V.; RABELLO, S.A.; SARCINELLI, P.N. Abordagem utilizada na investigação da exposição humana, ambiental e epidemiológica em acidente com malation ocorrido em Serra - ES. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, 2001, Porto Alegre. *Brazilian Journal of Toxicology*, v. 14, p. 222, 2001.
- 66- SARCINELLI, P.N.; CURI, R.; PEREIRA, A.C.S.; OLIVEIRA-SILVA, J.J.; MEYER, A.; ALVES, S.R.; HAIKEL, S.; INÁCIO, A.F.; CHRISMAN, J.R.; MOREIRA, J.C. - Avaliação da contaminação por agrotóxicos em crianças e adolescentes trabalhadores e residentes na área rural do Município de Nova Friburgo, RJ. In: *Anais da II Conferência de Saúde Ocupacional E Ambiental: Integrando As Américas*, Salvador – BA, 2002.

- 67- McCUCURDY, S.A.; HANSEN, M.E.; WEISSKOPF, C.P.; LOPEZ, R.L. Assesment of Azinphosmethyl Exposure in California Peach Harvest Workers. *Archives of Environmental Health*, v. 49, n. 4, p. 289-296, 1994.
- 68- MUTCH, E.; BLAIN, P.G.; WILLIAMS, M. - Interindividual Variations in Enzymes Controlling Organophosphate Toxicity in Man. *Human & Experimental Toxicology*, v. 11, p. 109-116, 1992.
- 69- MCCONNEL, R.; MAGNOTTI, R. - Screening for Insecticide Overexposure under Field Conditions: A Reevaluation of the Tintometric Cholinesterase Kit. *American Journal Public Health*, v. 84, p. 479-481, 1994.
- 70- HARPER H. A. *Princípios de Química Fisiológica*, 7ª edição. São Paulo : Ed. Atheneu, 1994.
- 71- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*, 2ª edição. São Paulo : Editora Sarvier, 1995.

Anexo 1 - OLIVEIRA-SILVA In: PERES, F.; MOREIRA, J.C. *É veneno ou é remédio? - Agrotóxicos Saúde e Ambiente*. Rio de Janeiro : Ed. Fiocruz, 2003.

O Sistema de notificação das intoxicações – o fluxograma da joeira

Apresentação

O Brasil possui cerca de 12 milhões de trabalhadores rurais expostos diariamente a inúmeros agentes potencialmente perigosos a sua saúde, dentre os quais merecem destaque os agrotóxicos. Independente da grande preocupação da sociedade com o meio ambiente e com a qualidade do alimento o consumo de agrotóxicos tem sido ascendente. As vendas destes compostos no mercado brasileiro tem aumentado de forma significativa, entre os anos de 1991 e 1998 foi da ordem de 160%. Sabe-se hoje que o seu uso trouxe como efeito colateral ao aumento da produtividade agrícola danos ambientais substântivos além de contribuir para a deterioração da saúde do homem, em particular do camponês. As estratégias de controle e prevenção das intoxicações por inseticidas no Brasil sempre foram tímidas e vacilantes. Talvez porque o número de intoxicações, segundo as estimativas oficiais, seja inexpressivo quando comparado com outras doenças no nível nacional. Tendo a estatística oficial como bússola o gestor público teria certamente preocupações mais prementes para o emprego dos recursos materiais e humanos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 3 milhões de pessoas no mundo sofrem anualmente algum episódio de intoxicação decorrente da exposição a pesticidas. Estudos mais detalhados em populações de trabalhadores rurais, apresentam taxas de incidência anuais de intoxicações que não condizem com estas estimativas e apontam para números bem maiores. O objetivo deste capítulo é o de revisar os dados oficiais sobre intoxicações por pesticidas no Brasil, confrontando-os com dados de investigações epidemiológicas que sugerem que o problema é algumas ordens de grandeza mais grave do que aparenta ser, e, por extensão, apontar onde se encontram os pontos de estrangulamento no processo de notificação nacional das intoxicações.

Introdução

Apesar do Brasil apresentar um nível intensivo de urbanização, sendo a população rural estimada em apenas 12 milhões de trabalhadores rurais num universo de 170 milhões de pessoas [1], sofreu, a partir da década de 60, um intenso processo de modernização agrícola denominado "Revolução Verde".

Este "New Deal" agrícola brasileiro foi responsável pela introdução de profundas mudanças nos processos agrícolas e na sua relação com o meio ambiente. Neste período foi observado um aumento expressivo na produção agrícola como resultado destas novas tecnologias [2]. Contudo, este desenvolvimento tecnológico estava em descompasso com o desenvolvimento humano no meio rural, que se processava de forma extremamente lenta. Este sistema de componentes colocou a uma população rural despreparada, com pouco ou nenhuma assistência técnica, exposta a um grande número de substâncias químicas potencialmente tóxicas (de tintas a agrotóxicos), gerando assim, como efeito colateral do processo de modernização agrícola um número assombroso de intoxicações humanas e uma degradação ambiental significativa [3,4].

Dentro do Mercado mundial de agrotóxicos, certamente por sua vocação agrícola, o Brasil apresenta-se como grande consumidor representando 50% do mercado latino americano, tendo apresentado uma tendência ascendente de consumo (Figura 1) [5].

Figura 1 - Venda de agrotóxicos, por classe no período 1991 - 1998

Em comparação a outros problemas de saúde pública no Brasil, a intoxicação por pesticidas parece ser um dos menores e, talvez esta seja uma das razões para a pouca atenção dispensada a este assunto. No entanto, vários estudos epidemiológicos mostram taxas anuais de incidência ou prevalência destas intoxicações, que apresentam estimativas oficiais e sugerem que o problema é maior do que parece ser.

Intoxicação por pesticidas nos países em desenvolvimento

De acordo com dados oficiais, existem no mundo atualmente cerca de 1 milhão de intoxicações não-intencionais causadas pela exposição a pesticidas, sendo 70% devido a exposições ocupacionais. Quando as intoxicações intencionais (suicídios e homicídios) são levados em consideração, este número aumenta para 3 milhões [6]. Uma das mais importantes críticas a estes dados oficiais reside no fato destes serem embasados em casos hospitalares, revelando somente parte do problema [7].

Numa investigação epidemiológica conduzida em 4 países asiáticos, Jeyaratnam e colaboradores [8] encontraram taxas anuais de 3 a 7% incidência de intoxicações provocadas por agrotóxicos em trabalhadores. Outros estudos demonstraram que a incidência de intoxicações provocadas por agrotóxicos nos países em desenvolvimento da América Latina varia nessa mesma faixa. São apontados 4,5% na Costa Rica, 9% na Indonésia, 2 a 10% na Bolívia [9,10,11,12,13,14]. Somente na África estima-se em 11 milhões o número de intoxicações anuais [7]. Isto sugere que mesmo considerando uma taxa de incidência tão baixa quanto 3% teríamos 25 milhões de intoxicações em trabalhadores rurais a cada ano nos países em desenvolvimento.

O cenário brasileiro

De acordo com dados publicados pelo Ministério da Saúde brasileiro, 8.914 intoxicações relacionadas a agrotóxicos ocorreram no ano de 2000, sendo 79% destes casos foram registrados em áreas urbanas [15]. Considerando que cerca de 85% da massa dos agrotóxicos são utilizados em atividades agrícolas, é difícil acreditar que existam 3,7 vezes mais intoxicados no meio urbano que no meio rural.

Paralelamente aos dados oficiais, estudos epidemiológicos mais detalhados parecem indicar a real dimensão do problema. Em um estudo realizado em 3 municípios do estado do Mato Grosso do Sul, os autores encontraram 9% dos trabalhadores rurais com atividades colinesterásicas abaixo da normalidade. Vale ressaltar todas dificuldades que envolvem a utilização deste indicador biológico discutidas no capítulo (avaliação da exposição humana). Outro estudo, realizado em nosso laboratório, utilizando o mesmo indicador biológico apontou para uma situação onde 32% dos trabalhadores rurais do município de Magé -RJ, que efetivamente manipulavam agrotóxicos, apresentaram redução nas suas atividades colinesterásica, segundo seus próprios valores de referência [16]. Este mesmo trabalho indicou que 3% dos trabalhadores apresentavam sintomatologia compatível com a intoxicação por agrotóxicos . Em um trabalho posterior, realizado em uma comunidade rural de Nova Friburgo - RJ, também conduzido por nosso grupo, foi demonstrado que 10% dos trabalhadores apresentavam sinais e sintomas de intoxicação. Finalmente uma avaliação realizada em um grupo de trabalhadores

rurais no estado do Rio Grande do Sul também indicou a prevalência de 10% de acidentes desta natureza.

Mesmo utilizando-se uma taxa, relativamente conservadora, de 3% para estimar o número de intoxicações provocadas por agrotóxicos entre os trabalhadores agrícolas brasileiros, seriam esperados cerca de 360.000 novos casos a cada ano somente no meio rural, um número aproximadamente 40 vezes maior que o apontado nos dados oficiais.

Em relação aos casos de intoxicação no meio urbano a situação não parece ser menos dramática. No Biênio 2000-2001 deram entrada no Serviço Toxicologia do Instituto Médico Legal-RJ 1428 casos suspeitos de intoxicação. Destes episódios fatais 12,6% apresentavam fortes evidências de terem sido provocados por agrotóxico, sendo confirmados em apenas 45% dos casos, devido a limitações técnicas do Serviço e a própria natureza das substâncias que apresentam baixa estabilidade no meio biológico. Em resumo, teríamos de 82 a 181 casos de intoxicação fatal provocadas por agrotóxicos no Estado do Rio de Janeiro [17], destes nenhum notificado ao SINITOX.

Causas de Sub-notificação

Uma gama de fatores estruturais, metodológicos e relacionados à intoxicação tem contribuído, ou ao menos podem explicar o grande número de casos de sub-notificação das intoxicações provocadas por agrotóxicos, em particular as ocorridas nas áreas rurais brasileiras.

Sob o ponto de vista estrutural teríamos a falta de hospitais, centros e postos de saúde na área rural se traduzindo nas longas distâncias que os trabalhadores rurais têm de percorrer para encontrar assistência médica, tornando difícil o pronto-atendimento dos casos de intoxicação desenvolvidos em comunidades agrícolas. Associa-se a este fato a falta de profissionais treinados para reconhecer quadros de intoxicação provocados por agrotóxicos tanto no meio rural quanto urbano.

Nos casos de intoxicações que obtêm êxito letal o problema permanece o mesmo, isto porque somente os IMLs dos grandes centros urbanos realizam análises toxicológicas, não sendo usual, ao menos no estado do Rio de Janeiro, os necrotérios dos distritos rurais enviarem amostras para análise nos necrotérios centrais. Nestas localidades a causa *mortis* se concentra no desfecho da fatal da intoxicação (parada cardíaca, insuficiência respiratória, etc.).

Metodologicamente, a confirmação das intoxicações crônica ou de menor monta podem ser extremamente dificultadas se não fizerem parte de um programa mais complexo de vigilância toxicológica. Procedimentos analíticos mais refinados, como análises cromatográficas gasosas e líquidas acopladas a detectores específicos, são ainda muito caros para serem usados como técnicas de triagem, especialmente nos países em desenvolvimento que apresentam um cenário de múltipla exposição. Em contraponto teríamos os kits “de campo” economicamente viáveis, porém sem sensibilidade o que poderia facilmente levar a resultados subestimados [18]. Como alternativa teríamos as metodologias baseadas em indicadores biológicos de efeito que poderiam ser utilizadas para monitorar vários compostos. Entretanto, a não-observação dos valores de referência adequados

reduziria a sua eficácia, como discutido no capítulo Avaliação da Exposição Humana a Agrotóxicos.

Finalmente, fatores associados ao próprio processo de intoxicação podem levar a estimativas subestimadas das intoxicações provocadas por agrotóxicos. Excluindo as intoxicações agudas, nas quais a sintomatologia é mais claramente definida, as intoxicações de menor monta ou crônicas apresentam sintomatologia menos exuberante e mais difusa, como dor de cabeça, vertigens, diarreia, etc., que podem ser facilmente confundidas com outras patologias comuns em áreas rurais, como: parasitoses do sistema digestivo, insolação, desinterias, etc.

Outro problema detectado no processo de notificação se relaciona diretamente a sistemática da entrada de dados no sistema. Atualmente a principal fonte de informação do SINITOX se dá no momento em que são solicitadas informações clínico-toxicológicas por parte das emergências. Ocorre que a sintomatologia e o tratamento das intoxicações agudas provocadas por agrotóxicos, principalmente da classe dos anticolinesterásicos, são monótonos. Como consequência às emergências rapidamente se familiarizam com esta situação e não recorrem mais ao sistema de informação. Como exemplo temos o um trabalho árduo e insigne realizado no Hospital Adão Pereira, no município de Duque de Caxias – RJ, onde foram analisados todos prontuários de 34 meses de internações na CTI pediátrica, entre os anos de 1999 e 2002. Neste estudo foi demonstrado que 2,14% das internações do período foram em consequência de intoxicações provocadas por agentes anticolinesterásicos, contudo estes casos não foram notificados [19].

Somados esses fatores e possivelmente outros não listados monta-se um sistema de componentes onde as intoxicações humanas provocadas por agrotóxicos apresentam-se como um problema menor. Diante da situação dramática que a saúde pública nacional atravessa não podemos esperar maiores investimentos humanos e matérias em problemas que "não existem" ou são "menores".

Perspectivas

A análise das causas da sub-notificação dos casos de intoxicação na verdade apontam para uma situação muito mais complexa que a simples omissão do registro, apontando para uma situação onde mesmo que exista a iniciativa voluntariosa da notificação, não há suporte para a materialização desta vontade. Recentemente, recebemos um projeto de lei do Gabinete da Presidência da Republica que torna obrigatória a notificação de todo e qualquer caso de intoxicação. Esta iniciativa louvável trará pouco ou nenhuma modificação no quadro atual de sub-notificação se não forem realizadas outras ações conjuntas. Entendemos que existam medidas a serem tomadas no curto, médio e longo prazo.

O fluxograma abaixo mostra os pontos de estrangulamento que transformam o sistema de notificação em uma joieira* de trama larga. Da mesma forma que aponta para as medidas a serem tomadas. No curto prazo a aceleração dos programas de interiorização da medicina familiar poderia, além de assistir os trabalhadores que sofrem dos sintomas das intoxicações crônicas promover o registro destes episódios. Caracterizando o fenômeno endêmico certamente os agentes públicos seriam forçados a rever suas praticas de assistência técnica rural e suas políticas de saúde.

No médio prazo as ações poderiam se concentrar na qualificação profissional em todos setores envolvidos com a assistência dos possíveis intoxicados, inclusive os legistas, basicamente concentrando esforços no reconhecimento da intoxicação e na conscientização da importância da notificação. Paralelamente deveria ocorrer a transferência de tecnologia, nem sempre onerosa como se imagina, aos laboratórios dos postos e hospitais que atendem esta demanda. Desta forma seria dado o suporte ao corpo médico para o fechamento do diagnóstico, imprescindível para a notificação. A este tempo teríamos condições de revermos e aperfeiçoarmos o sistema de informação toxicológica.

Em longo prazo uma reestruturação do sistema de saúde seria necessária, não somente para a viabilização do processo de notificação, mas para a própria melhoria na assistência a comunidades rurais. Sem estas medidas o círculo vicioso das intoxicações jamais será rompido.

Figura 2 - Fluxograma do processo de notificação e pontos de ruptura no processo.

REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO

- [1] IBGE - Instituto Brasileiro de geografia e estatística 2002 População residentes no ano de 2001 segundo o PNAD (Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios). Disponível em URL: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=2>
- [2] KHUSH, G. S. Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics* 2 (10):815-822, 2001.
- [3] FARIA, N. M. X., FACCHINI, L. A., FASSA, A. G. & TOMASI, E. Processo de produção rural e saúde na serra gaúcha: um estudo descritivo. *Cadernos de Saúde Pública* 16 (1):115-128, 2000.
- [4] PIMENTEL, D. Green revolution agriculture and chemical hazards. *The Science of the Total Environment* 188 (1):S86-S98, 1996.
- [5] SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) 2002. Vendas de pesticidas por estados brasileiros. Disponível em URL: <http://www.sindag.com.br/EST97969900.zip>
- [6] WHO/UNEP - World Health Organization. Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva, 1990.
- [7] KOH, D., JEYARATNAM, J. Pesticides hazards in developing countries. *The Science of the Total Environment* 188(1):S78-S85, 1996.
- [8] JEYARATNAM, J., LUN, K. C. & PHOON, W. O. Survey of acute pesticide poisoning among agricultural workers in four Asian countries. *Bulletin of the World Health Organization* 65 (4):521-527, 1987.
- [9] FORGET, G., GOODMAN, T. & DE VILLIERS, A. *Impact of Pesticide Use on Health in Developing Countries (Proceedings of a Symposium Held in Ottawa, Canada)*. IDRC, Ottawa, 1990.
- [10] ZAROFF, L.S. Biomarkers of Exposure to Organophosphorus Insecticides Among Farmers Families in Rural El Salvador: Factors Associated with Exposure. *Environmental Research Section A* 80:138-147, 1999.
- [11] AZAROFF, L.S., NEAS, L.M. Acute Health Effects Associated With Nonoccupational Pesticide Exposure in Rural El Salvador. *Environmental Research Section A* 80:158-164, 1999.
- [12] KAMMERBAUER, J., CORDOBA, B., ESCOLÁN, R., FLORES, S., RAMIREZ, V. & ZELEDÓN, J. Identification of development indicators in tropical mountainous regions and some implications for natural resource policy designs: an integrated community case study. *Ecological Economics* 36 (1):45-60, 2001.
- [13] WALISZEWSKI, S. M., AGUIRRE, A. A., INFANZÓN, R. M., RIVERA, J. & R. INFANZÓN Time trend of organochlorine pesticide residues in human adipose tissue in Veracruz, Mexico 1988-1997 survey. *The Science of The Total Environment* 221(2-3):201-204, 1998.
- [14] HURA, C., LEANC, M., PALAMARU, I. & RUSU, L. Human exposure at chemical pollutants risk for the public health. *Toxicology Letters* 95(1):141, 1998.
- [15] SINITOX: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas.
- [16] OLIVEIRA- SILVA, J.J. Evaluation of the influence of social-economic factors on pesticide poisoning in a community of rural works at Rio de Janeiro State. *Revista de Saúde Pública* 35(2):130-135, 2001.
- [17] S AD, C.E., CARDOSO, C.R.L. *Aspectos Médico Legais dos Envenenamentos pelo Inseticida Carbamato Audicarb no Rio de Janeiro*. I Congresso de Perícia Forense em: XVII Congresso Brasileiro de Medicina Legal, Porto Alegre, 2002.
- [18] OLIVEIRA-SILVA, J.J., ALVES, S.R., INACIO, A.F., MEYER, A., SARCINELLI, P.N., MATTOS, R.C.O.C., FERREIRA, M.F.A., CUNHA, J.C., MOREIRA, J.C. Cholinesteraseactivities determination in frozen blood samples: an improviment to the occupational monitoring in developing countries. *Human & Experimental Toxicology* 19:173-177, 2000.
- [19] FALCONIERE, C.L., MITRAUD, A., FEITAL, L., GOMES,R. Levantamento de Casos de Intoxicação por Carbamato no CETIP do Hospital Adão Pereira Nunes (HEAPN). Comunicação Oral, 2002.

Anexo 2
PARECER DO COMITE DE ÉTICA DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer Nº 107/02

Rio de Janeiro, 24 de abril de 2003.

Título do Projeto: Monitoramento integrado da exposição a agrotóxicos em áreas rurais: elementos para um programa de gerenciamento de riscos e estabelecimento de políticas em saúde e meio ambiente

Classificação no fluxograma: Grupo III

Pesquisadora Responsável: Paula de Novaes Sarcinelli (FIOCRUZ)

Pesquisadores: Jefferson José Oliveira-Silva (FIOCRUZ)

Marco Antônio Carneiro Menezes (FIOCRUZ)

Ana Cristina Simões Rosa (FIOCRUZ)

Sérgio Rabello Alves (FIOCRUZ)

Josino Costa Moreira (FIOCRUZ)

Ana Rosa Linde (FIOCRUZ)

Maria de Fátima Alves Ferreira (UERJ)

Cláudia Moura (UERJ)

Gustavo Chianka (PESAGRO)

Instituição onde se realizará: Laboratório de Toxicologia do CESTEH/ENSP/FIOCRUZ, Laboratório de Toxicologia Enzimática IB/UERJ e PESAGRO

Data de apresentação ao CEP: 23/10/2002

As solicitações feitas anteriormente pelo Comitê de Ética em Pesquisa foram atendidas satisfatoriamente.

Parecer do CEP: Aprovado

Prof. Sérgio Rêgo

Coordenador Geral

Comitê de Ética em Pesquisa

Atenciosamente,

Anexo 3

TERMO DE CONSENTIMENTO

(Em acordo às Normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde-MS)

Instituições participantes do Estudo:

Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana - CESTEH/ENSP da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Universidade de São Paulo – USP e Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Título do Estudo:

Avaliação da possível contaminação por agrotóxicos através da utilização de indicadores de efeito acetilcolinesterase eritrocitária e butirilcolinesterase plasmática.*

Investigadores:

Equipe do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana, ENSP, FIOCRUZ.

Coordenador: Sr. Jefferson Jose Oliveira da Silva

NOME DO AVALIADO: _____

Como voluntário (a), o Sr. (a) está sendo solicitado a participar de um estudo científico, patrocinado pela Fundação Oswaldo Cruz e pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro com o objetivo de realizar avaliação biológica dos níveis das enzimas acetil e butirilcolinesterase. Com o seu pleno consentimento, os seus dados poderão ser utilizados para fins acadêmicos junto a Universidade de São Paulo - USP, e para produção científica.

Este documento procura fornecer ao Sr. (a) informações sobre o problema de saúde em estudo e a experiência que será realizada, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais. O Sr. (a) poderá recusar-se a participar da pesquisa ou, mesmo, dela se afastar em qualquer tempo, sem que este fato venha lhe causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte da instituição. Os investigadores se obrigam a não revelar a identidade dos indivíduos em qualquer publicação resultante deste estudo, assim como poderão interromper a participação do mesmo, a qualquer tempo, por razões técnico/médicas quando, então, lhe serão fornecidos aconselhamento e orientação. Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos.

Antes de assinar este termo, o Sr. (a) deve informar-se plenamente sobre o mesmo, não hesitando em formular perguntas sobre qualquer aspecto que julgar conveniente esclarecer. É importante estar ciente das seguintes informações:

* A este tempo não tínhamos o título definitivo da tese.

- 1- O problema de saúde investigado é a possível exposição excessiva a agrotóxicos da classe dos anticolinesterásicos (organofosforados e carbamatos). Esta contaminação pode se dar através da exposição excessiva no momento em que estas substâncias são aplicadas ou através do ar, da água e alimentos ingeridos. No caso da contaminação humana podem ocorrer várias alterações do estado de saúde das pessoas expostas, que dependem de vários fatores, como características da substância, a quantidade que se utiliza e o tempo que as pessoas entram em contato com elas.
- 2- As avaliações realizadas nesta pesquisa podem indicar se existe, e qual é o nível de contaminação de pessoas expostas à agrotóxicos. Não existem benefícios materiais aparentes para você participar, entretanto, os resultados deste estudo poderão nos ajudar a conhecer melhor os perigos das exposições ambientais e aprender como evitá-las da melhor forma possível. Também, caso seja diagnosticado qualquer problema de risco à saúde do indivíduo, que esteja associado ao uso de agrotóxicos, você será orientado e encaminhado para tratamento clínico adequado.

Serão realizados testes laboratoriais no sangue para dosagem das atividades das enzimas acetil e butirilcolinesterase e aplicados questionários. Os exames serão gratuitos e não existirão quaisquer ônus para você ou sua família. Todo material utilizado para coleta será descartável, não oferecendo qualquer risco de contaminação.

Será necessário coletar um frasco de 5 mL de sangue para os exames laboratoriais. Uma vez que a coleta é muito simples, existe apenas a possibilidade de sentir uma ardência com a picada da agulha.

Caso haja diagnóstico de intoxicação por agrotóxicos, o que é um dos objetivos das avaliações neste estudo, você será imediatamente notificado e orientado pela equipe.

Magé, ____ de _____ de 200_.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Voluntário

**Equipe da FIOCRUZ
(pesquisador responsável)**

Anexo 4

LEVANTAMENTO DE EXPOSIÇÃO NÃO OCUPACIONAL

1-Identificação: _____ 2-Data: ____/____/____ 3-Telefone para contato: _____

4 -Nome: _____

5-Data de nascimento: ____/____/____ 6-Idade: _____ 7-Sexo: ☐ 1-feminino ☐ 2-masculino

8-Endereço: _____

9-Localidade: _____ 10-Raça/Etnia: ☐ 1-branco ☐ 2-negro ☐ 3-mestiço ☐ 4-asiático ☐ 5-indio

11-Nível de escolaridade:

- ☐ 1-analfabeto ☐ 2-primário incompleto ☐ 3-primário completo
☐ 4-ginásio incompleto ☐ 5-ginásio completo
☐ 6-2º grau incompleto ☐ 7-2º grau completo

12 – Que atividade profissional exerce?

13 - Se estudante, vc lembra de terem aplicado algum produto em sua escola?

- ☐ 1-sim ☐ 2- não

14 – Em caso afirmativo, especifique a circunstância: _____

15 – Alguem de sua família trabalha na lavoura?

16 – Durante esta atividade vc de alguma forma manipula ou tem contato com agrotóxicos?

17 – Durante o periodo que vc não esta trabalhando, em alguma circunstância tem contato com agrotóxicos ou substâncias químicas?

18 – esta ou esteve doente nos últimos seis meses?

- ☐ 1-sim ☐ 2- não

19 – Em caso afirmativo qual foi a doença?

20 – Histórico de doenças ao longo da vida:

- ☐ 1-cardiopata ☐ 2-hepatite ☐ 3- doença renal
☐ 4- outra - especifique _____

21 – Onde vc ou sua família obtem os vegetais que consomem?

- ☐ 1-mercado ☐ 2-feira livre ☐ 3- produz os vegetais
☐ 1-outros especifique _____

22 – Caso a resposta da pergunta anterior seja 3 (produz) vc utiliza algum produto químico nesta horta.

- ☐ 1-sim ☐ 2- não

23 – Em caso afirmativo da pergunta anterior, especifique o produto: _____

Anexo 5

LEVANTAMENTO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL E AMBIENTAL

Coordenadas GPS: Latitude: S ° ′ ″Longitude: WO ° ′ ″

Altitude: _____

1-Identificação: _____ 2-Data: ____/____/____

3-Nome: _____

4-Data de nascimento: ____/____/____ 5-Idade: _____

6-Sexo: ☐ 1-feminino ☐ 2-masculino

7-Endereço: _____

8-Localidade: ☐ Magé ☐ outra: _____

9-Telefone para contato: _____

10-Raça/Etnia:

☐ 1-branco ☐ 2-negro ☐ 3-mestiço ☐ 4-asiático ☐ 5-indio

11-Nível de escolaridade:

☐ 1-analfabeto ☐ 2-primário incompleto ☐ 3-primário completo
☐ 4-ginásio incompleto ☐ 5-ginásio completo
☐ 6-2º grau incompleto ☐ 7-2º grau completo

12-Relação de trabalho:

☐ 1-proprietário ☐ 2-empregado ☐ 3-meeiro ☐ 4-ajuda a família ☐ 5-ocupante
☐ 6-administrador ☐ 7-parceiro c/ ônus dos insumos ☐ 8-parceiro s/ ônus
☐ 9-parceiro c/ ônus parcial dos insumos ☐ 10-outros _____

13-Renda familiar: _____

14-Anos de trabalho: _____ anos

15-Idade que começou a trabalhar: _____ anos

16-Qual o tamanho da propriedade: _____

17-Quantas pessoas vivem na sua casa? _____

18-Quantas crianças (menos de 10 anos) moram na sua casa? _____

19-Quantas pessoas da sua família trabalham na agricultura? _____

20-Alguém da família trabalha com agrotóxicos?

☐ 1-sim ☐ 2-não ☐ 3-não sabe

21- Quantas pessoas? _____

22-Você aplica agrotóxicos?

☐ 1-sim ☐ 2-não

23-Quantas horas por dia você trabalha? _____

24- Quantas horas por dia são gastas na aplicação de agrotóxicos? _____

25- Qual o tipo de contato que você tem com os agrotóxicos?

- ☐ 1-direto (manipula a mistura e aplica na lavoura) ☐ 2-direto (puxa a mangueira)
☐ 3-indireto (a lavoura é no mesmo terreno da casa) ☐ 4-indireto (lava o costal)
☐ 5-indireto (lava as vestimentas usadas na aplicação de agrotóxicos) ☐ 6-outros: _____

26- Há quanto tempo foi o último contato que você teve com agrotóxicos? _____ (colocar dias, meses, anos,...)

Quais são as atividades em que você trabalha / ajuda na lavoura?

Nº	ATIVIDADE	SIM	NÃO
27	capinar		
28	covar		
29	semear		
30	adubar		
31	fazer leras		
32	estercar		
33	desbrotar		
34	colher		
35	preparar os agrotóxicos para aplicação		
36	ajudar na sulfatação (puxar mangueira)		
37	sulfatar com costal e/ou mangueira		
38	lavar o costal depois da aplicação		
39	armazenar os agrotóxicos		
40	outros: _____		

41- Quais os nomes das culturas plantadas nos últimos 2 meses?

- ☐ 1-tomate ☐ 2-couve-flor ☐ 3-salsa ☐ 4-outros: _____

42- Você consome os alimentos que planta?

- ☐ 1-sim ☐ 2-não

43- Você já recebeu algum treinamento sobre como usar agrotóxicos?

- ☐ 1-sim ☐ 2-não

44- Como foi o treinamento?

- ☐ 1-palestra ☐ 2-explicação no local de trabalho ☐ 3-outros: _____

Quais práticas agrícolas você utiliza que diminuem o uso de agrotóxico?

		SIM	NÃO
45	não usa ☐		
46	roçada manual		
47	plasticultura		
48	plantas atrativas		
49	rotação de cultura		
50	sabão em pó		
51	consorciamento		
52	hidroponia		
53	adubação orgânica		
54	fumo		
55	controle biológico		
56	armadilha luminosa		
57	outra		

58-Conhece o receituário agrônômico?

- ☐ 1-sim ☐ 2-não

59-Utiliza o receituário agrônômico?

- ☐ 1-sim ☐ 2-não

60-O extensionista já o auxiliou na maneira de usar agrotóxicos?

- ☐ 1-sim ☐ 2-não

61-Com que frequência ocorre este treinamento?

- ☐ 1-1 vez por ano ☐ 2-2 vezes por ano ☐ 3-3 vezes por ano ☐ 4-mais de 3 vezes por ano

62- De quem recebeu a orientação para preparação e/ou aplicação de agrotóxico?

- ☐ 1-não recebeu ☐ 2-cooperativa ☐ 3-proprietário ☐ 4-administrador ☐ 5-EMATER
☐ 6-representante do fabric. de agrotóxico
☐ 7-outros: _____

63- Quem indica o agrotóxico?

- ☐ 1-proprietário ☐ 2-representante de indústria ☐ 3-vendedor ☐ 4-EMATER
☐ 5-outro agricultor ☐ 6-administrador ☐ 7-outros: _____

64-De quem você compra o agrotóxico?

- ☐ 1-representante de indústria ☐ 2-vendedor ☐ 3-estabelecimento comercial
☐ 4-outros: _____

65-Você lê o rótulo das embalagens que você usa?

- ☐ 1-freqüentemente ☐ 2-às vezes ☐ 3-nunca

66-Você lê e segue as recomendações contidas no rótulo das embalagens que você usa?

- ☐ 1-freqüentemente ☐ 2-às vezes ☐ 3-nunca

67-Quem recomenda o cálculo da dosagem do agrotóxico?

- ☐ 1-fabricante (rótulo) ☐ 2-representante de indústria ☐ 3-vendedor ☐ 4-EMATER
☐ 5-outro agricultor ☐ 6-o próprio (dosagem aleatória) ☐ 7-outros: _____

68-Qual o lugar onde são armazenados os agrotóxicos?

- ☐ 1-residência ☐ 2-local só para agrotóxicos ☐ 3-local com outros materiais
☐ 4-lavoura ☐ 5-outro: _____

Especifique os locais mais próximos do(s) lugar(es) de aplicação do agrotóxico e sua distância em relação

		MAIS DE 30 m	MENOS DE 30 m	DISTÂNCIA
69	represa			
70	rio			
71	nascente			
72	residência			
73	pastagem			
74	outro: _____			

75-Depois a aplicação do agrotóxico você espera o tempo recomendado no rótulo ou por quem lhe dá assistência técnica para fazer a colheita?

- ☐ 1-freqüentemente ☐ 2-às vezes ☐ 3-nunca

76-Você joga fora as embalagens dos agrotóxicos?

- ☐ 1-sim ☐ 2-não ☐ 3-não sabe

77-Qual o destino das embalagens de agrotóxicos vazias?

- ☐ 1-vende ☐ 2-queima ☐ 3-guarda ☐ 4-lavoura ☐ 5-depósito público ☐ 6-enterra
☐ 7-sistema de coleta de embalagem ☐ 8-reutiliza ☐ 9-corpos d'água ☐ 10-outro: _____

78-Você usa a embalagem do agrotóxico vazia para outro fim?

- ☐ 1-sim ☐ 2-não

78a-Se sim, para que? _____

79-Sua pele entra em contato com o agrotóxico?

- ☐ 1-sim ☐ 2-não

80-Com que frequência? _____

81- Que tipo de equipamento você usa para aplicar a substância?

- ☐ 1- pulverizador costal manual ☐ 2-pulverizador costal motorizado
☐ 3- pulverizador estacionário ☐ 4-pulverizador estacionário motorizado (tobata)
☐ 5- pulverizador motorizado ☐ 6-outros _____

82-Onde são lavados os equipamentos mecânicos?

- ☐ 1-não são lavados ☐ 2-no tanque de uso doméstico ☐ 3-junto ao poço de água
☐ 4-na lavoura ☐ 5-nos rios ☐ 6- na nascente
☐ 7-no tanque só para lavar equipamentos ☐ 8- outros: _____

83-Para onde são levadas as águas de lavagem dos equipamentos?

- ☐ 1-sumidouro ☐ 2-nascente ☐ 3-chão
☐ 4-rio ☐ 5-rede de esgoto ☐ 6-outros: _____

84-Você usa alguma medida de proteção quando mistura o pesticida?

- ☐ 1-sim ☐ 2-não ☐ 3-não mistura pesticida

84a-Qual? _____

85-Por que não utiliza os equipamentos?

- ☐ 1-são desconfortáveis ☐ 2-difícil a locomoção ☐ 3-são quentes
☐ 4-difícil o trabalho ☐ 5-são pesados ☐ 6-têm custo elevado ☐ 7-outros: _____

86-Se utiliza, onde lava os equipamentos?

- ☐ 1-não lava ☐ 2-no tanque de uso doméstico ☐ 3-junto ao poço de água
☐ 4-em rios ☐ 5-na nascente ☐ 6-na lavoura
☐ 7-em tanque só para lavagem dos equipamentos ☐ 8-outros: _____

Qual o equipamento de proteção individual que você e a frequência?

nº	EPI	sempre	quando aplica	quando puxa mangueira
87	máscara de papel			
88	máscara de pano			
89	respirador			
90	luvas			
91	botas			
92	óculos			
93	avental			
94	macacão			
95	outros			

Tipos de vestimenta que você utiliza quando aplica agrotóxicos ou puxa a mangueira

nº	VESTIMENTA	SIM	NÃO
96	descalço		
97	chinelo		
98	sapato fechado		
99	sem camisa		
100	camisa de manga curta		
101	bermuda		
102	calça comprida		
103	outros		

104-Quantos dias usa a mesma roupa na preparação e aplicação de agrotóxico? _____

105-As roupas usadas durante a preparação e aplicação de agrotóxicos são lavadas separadas das roupas da família?

☐ 1-freqüentemente ☐ 2-às vezes ☐ 3-nunca

106-Você lava suas mãos no trabalho?

☐ 1-freqüentemente ☐ 2-às vezes ☐ 3-nunca

107-Você lava suas mãos após o trabalho?

☐ 1-freqüentemente ☐ 2-às vezes ☐ 3-nunca

108-Você toma banho logo após aplicar o agrotóxico?

☐ 1-freqüentemente ☐ 2-às vezes ☐ 3-nunca

109-Costuma fumar durante a aplicação de agrotóxico?

☐ 1-freqüentemente ☐ 2-às vezes ☐ 3-nunca

110-Quantos cigarros fuma, em média, por dia?

1- _____ 99- não sabe

111-Costuma beber durante a aplicação de agrotóxico?

☐ 1-freqüentemente ☐ 2-às vezes ☐ 3-nunca

112-Costuma comer durante a aplicação de agrotóxico?

☐ 1-freqüentemente ☐ 2-às vezes ☐ 3-nunca

113-Você toma bebidas alcoólicas?

☐ 1-sim ☐ 2-não

114-Com que freqüência você toma bebidas alcoólicas?

☐ 1-4 ou mais vezes por semana ☐ 2-até 3 vezes por semana
☐ 3-pelo menos 1 vez por mês ☐ 4- menos de 1 vez por mês
☐ 5-não sabe

115-Que tipo de bebidas alcoólicas você costuma beber?

☐ 1-cerveja ☐ 2-vinho ☐ 3-cachaça ☐ 4-conhaque ☐ 5-outros

116-Observa a direção do vento durante a aplicação de agrotóxico?

☐ 1-freqüentemente ☐ 2-às vezes ☐ 3-nunca

117-Quem faz a lavagem das vestimentas utilizadas na aplicação de agrotóxicos/ trabalho na lavoura?

- ☐ 1-o próprio ☐ 2-o meeiro ☐ 3-pai ☐ 4-mãe ☐ 5-esposa ☐ 6-outros: _____

118-Quando faz a lavagem das vestimentas utilizadas na aplicação de agrotóxicos/ trabalho na lavoura?

- ☐ 1-logo após a aplicação de agrotóxicos ☐ 2-no dia seguinte ☐ 3-dias depois: _____
☐ 4-outros: _____

119-Como estão distribuídas as janelas na sua casa?

- ☐ 1-em todos os cômodos ☐ 2-na maioria dos cômodos ☐ 3-em poucos cômodos

120- Quantas janelas da sua casa estão de frente pra lavoura? _____ ☐ 99-não tem janela de frente pra lavoura

121-O local onde você prepara as misturas de agrotóxicos é perto da sua casa?

- ☐ 1-sim ☐ 2-não

122-A quantos metros, aproximadamente, sua casa fica do local onde você prepara as misturas de agrotóxicos?

123-Você acredita que o pesticida pode fazer algum mal para a saúde?

- ☐ 1-sim ☐ 2- não ☐ 3-não sabe

124-Você já passou mal depois de ter aplicar/trabalhado com pesticida?

- ☐ 1-sim ☐ 2- não ☐ 3-não lembra

125-Já foi intoxicado por agrotóxico?

- ☐ 1-sim ☐ 2- não ☐ 3-não sabe

126-Quantas vezes? _____

127-Qual (is) a (s) substância (s) causou (saram) sua intoxicação? _____

128-Quais os sintomas e/ou sinais que sentiu durante ou após a aplicação?

- ☐ 1-náuseas ☐ 2-dor de cabeça ☐ 3-vômitos ☐ 4-vertigens ☐ 5-diminuição da visão
☐ 6-diarréia ☐ 7-dores no peito ☐ 8-tremores ☐ 9-irritação da pele ☐ 10-outros: _____

129-Procurou socorro?

- ☐ 1-sim ☐ 2- não

130-Onde procurou socorro?

- ☐ 1-hospital ☐ 2-posto de saúde ☐ 3-sindicato/cooperativa ☐ 4-farmácia
☐ 5-médico particular ☐ 6-outro: _____

131-Houve caso de intoxicação por agrotóxico na propriedade?

- ☐ 1-sim ☐ 2- não ☐ 3-não lembra

132-Quantos? _____

133- Como estas pessoas passaram mal? _____

134- Você tem medo de aplicar o pesticida?

- ☐ 1-sim ☐ 2- não

135- Tem filhos?

- ☐ 1-sim ☐ 2-não

13a- nº homens: _____

13b- nº mulheres: _____

136-Usa em casa algum veneno para matar mosquito, barata, rato, cupim, piolho, carrapato, e outros insetos?

☐ 1-sim ☐ 2- não ☐ 3-não lembra

137 -Qual tipo? _____

138-Quando foi a última vez que você utilizou este veneno?

☐ 1-até 15 dias ☐ 2-de 15 a 45 dias ☐ 3-a mais de 45 dias ☐ 4-não sabe

139-Está tomando algum medicamento atualmente?

☐ 1-sim ☐ 2- não ☐ 3-não sabe

140-Qual (is)? _____

141-Para que? _____

Nº	SUBSTÂNCIA	Nº DE APLICAÇÕES / SEMANA	HORAS GASTAS EM CADA APLICAÇÃO	ÉPOCA DA ÚLTIMA APLICAÇÃO	PERÍODOS DE UTILIZAÇÃO
Exemplo	TAMARON	2	6	3/4/00	1x/mês
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Para o entrevistador lembrar os nomes:

Inseticidas/organofosforados: folidol, tamaron, nuvacron

Inseticidas/carbamatos: carbaril, furadam

Inseticidas/organoclorados: aldrin, lindano

Fungicidas: maneb, dithane

Herbicidas: paraquat (gramaxone), round-up

Atenção do entrevistado:	Veracidade e exatidão das respostas:	Atitude do entrevistado
☐ 1-orientado e atencioso	☐ 1-francas e exatas	☐ 1-cooperadora e interessada
☐ 2-pouco atencioso	☐ 2-provavelmente francas e exatas	☐ 2-cooperador
☐ 3-mal informado	☐ 3-nem sempre francas e exatas	☐ 3-indiferente
☐ 4-muito mal informado e confuso	☐ 4-poucas vezes francas e exatas	☐ 4-não cooperadora
	☐ 5-não foram francas e exatas	

Anexo 6
FREQUENCIA DE EXPOSIÇÃO – QUESTIONÁRIO DE MANUTENÇÃO

1-Identificação: _____ 2-Data: ____/____/____

3-Nome: _____

4- Há quanto tempo foi o último contato que você teve com agrotóxicos? _____ (colocar dias, meses, anos,...)

5- Em caso do contato ter ocorrido no último mês, que tipo de equipamento você usou para aplicar a substância?

☐ 1- pulverizador costal manual	☐ 2-pulverizador costal motorizado
☐ 3- pulverizador estacionário	☐ 4-pulverizador estacionário motorizado (tobata)
☐ 5- pulverizador motorizado	☐ 6-outros _____

6-O que vc estava realizando no último mês (podem ocorrer mais de uma resposta):

☐ 1-preparando a terra	☐ 2-semeando	☐ 3-transpondo mudas	☐ 4-manutenção da lavoura
☐ 5-colhendo			

Anexo 7

DETALHAMENTO DE ALGUNS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS ADOTADOS.

Este anexo tem como objetivo apresentar a forma como alguns procedimentos foram especificamente montados, não propondo como necessariamente deveriam ser realizados.

1 - Esquema de construção das curvas de inibição enzimática por etil-paraoxon e aldicarb

A adição de padrões de agrotóxicos nas amostras de sangue foram realizadas a partir de “soluções-mãe” de etil-paraoxon e aldicarb em metanol na concentração de 1000 µg/mL. A partir destas, foram obtidas soluções dos pesticidas por diluição em solução PBS (tampão fosfato de sódio 120 mM, pH 6,8 em solução salina 0,9%) nas seguintes concentrações: solução A [1,0 µg/mL], solução B [5,0 µg/mL], solução C [10,0 µg/mL], solução D [100,0 µg/mL] e solução E [500,0 µg/mL]. A concentração de [500 µg/mL] foi obtida pela evaporação de 500 µL da solução-mãe em nitrogênio, até um volume de 100 µL, sendo posteriormente acrescentado 900 µL de solução salina. Uma solução F [4000 µg/mL] foi preparada somente para aldicarb, sendo obtida pela evaporação em nitrogênio, a partir de 2,0 mL da solução-mãe para 100 µL, adicionando-se em seguida 900 µL de PBS.

As alíquotas de 1,8 mL de sangue foram adicionadas das soluções de pesticidas supra-citadas para atingir concentrações finais estabelecidas entre 0,01 a 50,0 µg de pesticida / mL de sangue total, sendo preparadas curvas de inibição para cada pesticida (esquema 1). Concentrações até 200,0 µg de pesticida / mL de

sangue foram feitas somente para aldicarb, utilizadas na curva de inibição da AChE. Tais concentrações foram obtidas conforme demonstrado no esquema 1, apresentando volume final de 2,0 mL para cada alíquota, em solução PBS. O controle foi obtido pela adição de 200,0 μ L de solução PBS em 1,8 mL de sangue. Foi feito um controle com metanol diluído em PBS na relação de 1:10. Um volume de 200,0 μ L desta solução foi adicionado a 1,8 mL de sangue, obtendo-se uma concentração final de 1% de metanol no sangue. Após a adição dos pesticidas, as alíquotas de sangue foram incubadas à temperatura ambiente por 30 min.

Esquema 1 - de construção da curva de inibição para etil-paraoxon e aldicarb.

2 - Esquema de construção da curva padrão de L-cisteína utilizada no método de Magnotti.

A curva padrão de L-cisteína foi obtida, onde alíquotas foram tomadas a partir de uma solução de L-cisteína 0,5 mM em 200 mL de água destilada. A estas alíquotas foram adicionados diferentes volumes de reagente de Magnotti A (Acetilcolina 0,97 mM em tampão de fosfato de sódio 59 mM, DTNB 38 mM, pH 7,5), à temperatura ambiente em solução TRIS-Triton 1%, conforme demonstrado no esquema 2 apresentado abaixo.

Após adição dos reagentes, a absorvância correspondente a cada concentração de L-cisteína foi determinada espectrofotometricamente a 440nm.

Esquema 2 - Curva-padrão de L-cisteína para o método de Magnotti:

Conc. em nmoles	Branco	10	25	50	100	150	250	500
Reagente A (mL)	4,00	3,98	3,95	3,90	3,80	3,70	3,50	3,00
Tris-Triton (µL)	400	400	400	400	400	400	400	400
L-cisteína (µL)	0	20	50	100	200	300	500	1000

3 - Esquema de construção da curva padrão de L-cisteína para método de Oliveira-Silva

A curva padrão de L-cisteína foi obtida, onde alíquotas foram tomadas a partir de uma solução de L-cisteína 0,5 mM em 200 mL de água destilada. A estas alíquotas foram adicionados tampão fosfato de sódio 0,12 M (pH 7,54), solução de

DTNB 2 mM e água destilada, à temperatura ambiente, conforme demonstrado abaixo no esquema 3.

Após adição dos reagentes, as absorvâncias correspondentes às diferentes concentrações de L-cisteína foram determinadas espectrofotometricamente a 412nm.

Esquema 3 - Construção da curva-padrão de L-cisteína para o método de Oliveira-Silva:

Conc. em nmoles	Branco	10	25	50	100	150	250	500
T. análise (mL)	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
DTNB (mL)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
H ₂ O dest. (μL)	1000	980	950	900	800	700	500	0
L-cisteína (μL)	0	20	50	100	200	300	500	1000

4 - Esquema de construção da curva-padrão de proteína utilizada no método de Oliveira-Silva e determinação da concentração nas amostras

Para determinação da concentração de proteína, em tubos de análise foram adicionados diferentes volumes de água destilada, de solução de albumina (1,0 mg/mL) e 200 μL de NaOH a 25%, conforme descrito abaixo no esquema 4. Nos tubos relativos às amostras foram adicionados 50 μL da suspensão de "ghost".

Esquema 4 - Construção da curva-padrão de proteína utilizada no método de Oliveira-Silva:

	H ₂ O	Sol. albumina
Branco	4,50 mL	—
Padrão 100	4,40 mL	100 µL
Padrão 200	4,30 mL	200 µL
Padrão 300	4,20 mL	300 µL _(F1)
Padrão 400	4,10 mL	400 µL
Amostras	4,45 mL	—

Para a confecção do branco, foram adicionados 300 µL de reagente de Folin, sob agitação por 30 segundos. O mesmo procedimento foi repetido para os demais tubos durante 5 minutos. Transcorrido este tempo, foi iniciada a leitura no espectrofotômetro, onde os valores de absorvância foram determinados a 660 nm. As absorvâncias dos padrões 100 e 300 foram utilizadas para construção de uma curva padrão de albumina. A partir da equação da reta desta curva, foram determinados os valores de concentração de proteína das amostras de "ghost" (mg/mL).