

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

**Colinesterases, parâmetros hematológicos e bioquímicos em
sangue de trabalhadores rurais expostos ao dissulfoton**

Míriam Pimentel de Godoy

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira

São Paulo

2002

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

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

**Colinesterases, parâmetros hematológicos e bioquímicos em
sangue de trabalhadores rurais expostos ao dissulfoton**

Miriam Pimentel de Godoy

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira

São Paulo

2002

17-369

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005023

Ficha Catalográfica

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

G589c Godoy, Míriam Pimentel de
Colinesterases, parâmetros hematológicos e bioquímicos
em sangue de trabalhadores rurais expostos ao dissulfoton /
Míriam Pimentel de Godoy. -- São Paulo, 2002.
107p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Siqueira, Maria Elisa Pereira Bastos de

1. Toxicologia ocupacional 2. Monitorização biológica :
Toxicologia ocupacional I. T. II. Siqueira, Maria Elisa
Pereira Bastos de, orientador.

615.902 CDD

Míriam Pimentel de Godoy

**Colinesterases, parâmetros hematológicos e bioquímicos em sangue
de trabalhadores rurais expostos ao dissulfoton**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira

orientador/presidente

Profa. Dra. Lys Esther Rocha

1º. examinador

Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa

2º. examinador

São Paulo, 08 de Novembro.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Carlos e Glória, pela maneira amável como contribuíram para esta conquista, sempre valorizando aquilo que realmente gostamos de fazer.

À Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira, pelo exemplo de professora admirável e profissional competente, além do apoio, incentivo e paciência na orientação deste trabalho.

Ao Pedro, pelo carinho, companheirismo e otimismo nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

- Aos voluntários que participaram da pesquisa.
 - Aos Coordenadores do Programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de São Paulo.
 - Aos professores do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo.
 - Aos colegas do curso de pós-graduação da Universidade de São Paulo, especialmente à Maria José Nunes Paiva (Bulé), pela ajuda na coleta das amostras, apoio e amizade.
 - Aos amigos e funcionários do Laboratório de Análises Tóxicológicas da Efoa/Ceufe.
 - Aos funcionários do Laboratório Central de Análises Clínicas da Efoa/Ceufe.
 - À Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas/Centro Universitário Federal.
 - Às funcionárias do Centro de Controle de Intoxicações do Hospital das Clínicas-Unicamp: Sueli, Paula e Márcia, pela contribuição em minha formação e incentivo.
-

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. GENERALIDADES.....	5
2.1 Exposição ocupacional a inseticidas organofosforados.....	5
2.2 Características e propriedades.....	9
2.3 Toxicocinética.....	11
2.4 Mecanismo de ação e efeitos nocivos.....	17
2.5 Monitorização biológica.....	23
2.6 Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	29
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 População estudada.....	40
4.2 Material.....	43
4.3 Método.....	44
4.3.1 Otimização do método analítico para a determinação das atividades das colinesterases sangüíneas.....	45
5. RESULTADOS.....	48
5.1 Precisão do método.....	48
5.2 Estabilidade das atividades das colinesterases.....	50
5.3 Estabilidade dos reagentes.....	55
5.4 Atividades enzimáticas das colinesterases sangüíneas no grupo de trabalhadores avaliados.....	56
5.5 Parâmetros bioquímicos e hematológicos no grupo de trabalhadores avaliados.....	58
5.6 Sintomatologia.....	64
5.7 Avaliação estatística dos resultados da população.....	65

6. DISCUSSÃO.....	72
7. CONCLUSÕES.....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
9. ANEXOS.....	98

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Estrutura química geral dos compostos organofosforados..... 09
- FIGURA 2.** Estruturas químicas dos principais grupos de compostos organofosforados..... 09
- FIGURA 3.** Estabilidade a longo prazo das colinesterases plasmáticas em amostras de sangue sem inibição enzimática e conservadas em geladeira..... 51
- FIGURA 4.** Estabilidade a longo prazo das colinesterases em sangue total de amostras sem inibição enzimática e conservadas em geladeira..... 51
- FIGURA 5.** Estabilidade a longo prazo das colinesterases plasmáticas em amostras de sangue sem inibição enzimática e conservadas em freezer..... 52
- FIGURA 6.** Estabilidade a longo prazo das colinesterases em sangue total de amostras sem inibição enzimática e conservadas em freezer..... 52
- FIGURA 7.** Estabilidade a longo prazo das colinesterases plasmáticas em amostras de sangue inibidas "*in vitro*" em 25% e conservadas em geladeira..... 53
- FIGURA 8.** Estabilidade a longo prazo das colinesterases em sangue total de amostras inibidas "*in vitro*" em 25% e conservadas em geladeira..... 53
- FIGURA 9.** Estabilidade a longo prazo das colinesterases plasmáticas em amostras de sangue inibidas "*in vitro*" em 25% e conservadas em freezer..... 54
- FIGURA 10.** Estabilidade a longo prazo das colinesterases em sangue total de amostras inibidas "*in vitro*" em 25% e conservadas em freezer..... 54
- FIGURA 11.** Estabilidade das soluções reagentes na determinação das atividades enzimáticas no plasma, em sangue total e eritrócitos..... 55
- FIGURA 12.** Níveis de uréia em soro de indivíduos expostos..... 59
-

FIGURA 13. Atividades de fosfatase alcalina em soro de indivíduos expostos...	60
FIGURA 14. Atividades de gama-glutamiltransferase em soro de indivíduos expostos.....	61
FIGURA 15. Atividades das colinesterases em sangue total nos períodos de pré e pós-exposição ao inseticida organofosforado.....	67
FIGURA 16. Atividades das colinesterases em plasma nos períodos de pré e pós-exposição ao inseticida organofosforado.....	67
FIGURA 17. Atividades das colinesterases em eritrócitos nos períodos de pré e pós-exposição ao inseticida organofosforado.....	68
FIGURA 18. Distribuição das atividades enzimáticas das colinesterases plasmáticas nos trabalhadores em período de pré-exposição.....	69
FIGURA 19. Distribuição das atividades enzimáticas das colinesterases eritrocitárias nos trabalhadores em período de pré-exposição.....	69

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Precisão intra-ensaio do método, avaliada em amostras de sangue *sem inibição* e com inibições de 25 e 50 % das atividades enzimáticas..... 48
- TABELA 2.** Precisão interensaio do método (% CV), avaliada em amostras de sangue *sem inibição* e com inibições de 25 e 50 % das atividades enzimáticas.. 49
- TABELA 3.** Determinações das atividades e inibições enzimáticas das colinesterases nos trabalhadores avaliados..... 57
- TABELA 4.** Porcentual de variação individual dos parâmetros bioquímicos que sofreram maior alteração entre os períodos de pré e pós-exposição..... 62
- TABELA 5.** Sintomas relatados pelo grupo de trabalhadores avaliado após a exposição..... 64
- TABELA 6.** Valores de z e significância (Wilcoxon) de atividades das colinesterases sangüíneas entre os períodos de pré e pós-exposição nos trabalahdores que mostraram inibições enzimáticas..... 66
- TABELA 7.** Correlação entre as porcentagens de inibição enzimática no plasma (ChE-P), sangue total (ChE-T) e eritrócitos (ChE-E) (n=12)..... 70
- TABELA 8.** Valores de z e significância (Wilcoxon) de parâmetros bioquímicos e hematológicos nos períodos de pré e pós-exposição dos trabalhadores (n=35)..... 70
- TABELA 9.** Valores de z e significância (Wilcoxon) de paraâmetros bioquímicos e hematológicos nos períodos de pré e pós-exposição dos trabalhadores que apresentaram inibição nas atividades das colinesterases em sangue total (ChE-T), plasma (ChE-P) e eritrócitos (ChE-E)..... 71

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1.** Principais sinais e sintomas de intoxicação aguda, causados por inseticidas organofosforados..... 20
- QUADRO 2.** Variações nas atividades enzimáticas das colinesterases eritrocitária (ACHE) e plasmática (PCHE) em indivíduos sadios e em condições patológicas específicas..... 26
- QUADRO 3.** Características gerais da exposição ao inseticida organofosforado (IOF) e do grupo de trabalhadores avaliado..... 42
-

RESUMO

Os inseticidas organofosforados (IOF), conhecidos como inibidores das colinesterases sangüíneas, causam inúmeras intoxicações, principalmente no meio rural. As atividades das colinesterases sangüíneas são utilizadas como indicadores na monitorização biológica de trabalhadores expostos a estes compostos. Outros parâmetros relacionados aos possíveis efeitos destes inseticidas sobre a saúde são relatados na literatura. O objetivo deste trabalho foi verificar alterações bioquímicas e hematológicas em 36 aplicadores de um IOF, o dissulfoton, em lavoura de café, paralelamente à análise das colinesterases. Todas as determinações foram realizadas antes e após a aplicação do inseticida, obtendo-se valores de referência individuais. Os trabalhadores rurais avaliados foram submetidos a exames clínicos pré-admissionais e usaram o equipamento de proteção individual (EPI) corretamente durante todo o período de aplicação do produto. Para a determinação das atividades das colinesterases sangüíneas foi utilizado o método espectrofotométrico de Ellmann *et al.* (1961) modificado, e os diversos parâmetros bioquímicos e hematológicos (uréia, creatinina, bilirrubina, gama GT, fosfatase alcalina, transaminases e hemograma) foram analisados por técnicas rotineiras de laboratórios de análises clínicas. Dentre os parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados, a uréia, gama GT, leucócitos, linfócitos e eosinófilos mostraram diferenças estatisticamente significativas em seus valores medidos nos trabalhadores antes e após a exposição ao dissulfoton, enquanto que as inibições enzimáticas nas atividades das colinesterases sangüíneas se mostraram abaixo dos Índices Biológicos Máximos Permitidos preconizados no país. Pode-se considerar baixo o risco agudo da exposição dos trabalhadores ao dissulfoton e as variações detectadas em alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos poderiam ser atribuídas à exposição ao inseticida; porém, são necessários estudos posteriores para melhor avaliação.

SUMMARY

The organophosphorus insecticides (OP) are widely used in Brazil and a large number of acute poisonings is reported, mainly in applicators engaged in plant protection. Biomonitoring is usually performed through blood cholinesterases, an assay closely related to the action of OP on CNS acetylcholinesterase. Data about other parameters related to effects on other organs are scarce in literature. This work aimed to evaluate the general health effects caused by OP in workers handling disulfoton in coffee cultivation through some biochemical and hematological parameters, besides cholinesterase analysis. All analysis were performed before and after OP exposure using the levels found before the exposure as individual reference values. 36 men were evaluated, all working with masks, gloves and proper clothes, employed in manually disulfoton application in coffee cultivation. All of them were clinically examined before being accepted for the job. A modified Ellmann *et al.* spectrophotometric method was used for cholinesterases assay and biochemical (urea, alkaline phosphatase, transaminases, bilirubin, γ -glutamyl transferase) and hematological (hemogram) parameters according to routine methods used in clinical laboratory diagnosis. No volunteer presented complaints related to his health state when asked about in pre-exposure time. Urea, γ -glutamyl transferase, leucocytes, linfocytes and monocytes showed statistical differences when measured before and after exposure to OP. On the other hand, cholinesterase activities inhibition were bellow the biological limits allowable by Brazilian legislation. The acute risk of the exposure of the population to OP may be regarded as low and biochemical and hematological parameters altered could be due to disulfoton exposure, but certainly more studies are necessary to clarify these effects.

1. INTRODUÇÃO

Os praguicidas ocupam uma posição especial entre vários agentes químicos, aos quais o homem pode estar exposto e que são deliberadamente difundidos no ambiente. O ideal é que as ações prejudiciais dos praguicidas devam ser altamente seletivas para os organismos alvos, e indesejáveis e inócuas para os organismos desejáveis. Entretanto, a maioria das substâncias químicas utilizadas como praguicidas não são completamente seletivas. A falta de seletividade da ação praguicida representa um risco para o homem e outras formas de vida desejáveis presentes no ambiente. Assim, atividades que impliquem no uso de praguicidas devem ser vigiadas, controladas e direcionadas (MARONI *et al.*, 2000).

Desde a década de 40, após a II Guerra Mundial, quando ocorreu a revolução industrial dos defensivos químicos, cientistas ficam apreensivos em relação às conseqüências do uso continuado e maciço de tais produtos. O uso abusivo dos praguicidas é um problema de proporções globais, avaliado pela OMS e outras agências nacionais e internacionais (PASCHOAL, 1979; WHO, 1986).

Nos dias atuais ainda é importante o papel que representam os praguicidas, tanto do ponto de vista econômico, como no da saúde pública. Graças aos modernos praguicidas, a agricultura tem experimentado grande desenvolvimento, com melhor produtividade e qualidade dos produtos agropecuários. Alguns desses compostos também foram de valor inestimável em campanhas de saúde pública como, por exemplo, no combate à malária, à doença de Chagas, à peste bubônica, ao tifo exantemático e à encefalite viral transmitida por mosquitos. (PASCHOAL, 1979; MÍDIO & SILVA, 1995).

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de praguicidas da América Latina (cerca de 50% da quantidade consumida) e o oitavo colocado no mercado mundial, sendo muito difícil assegurar o cumprimento sequer de cuidados mínimos, problema não só do Brasil, como também dos

povos de quase todos os países pobres e subdesenvolvidos (BULL & HATHAWAY, 1986). A extensão do uso de praguicidas no país pode ser avaliada pelo valor envolvido na comercialização, que aumentou de U\$ 988 milhões em 1981 para U\$ 2,2 bilhões em 1997 (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001). Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas (SINDAG), houve um aumento de 158,7% no consumo, entre os anos de 1996 e 2000, como também, um aumento de 24,76% na importação desses produtos entre os anos de 1999 e 2000 (SINDAG, 2001).

As centenas de formulações de praguicidas registradas no país podem ser divididas, de acordo com a finalidade de uso, em: inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas e rodenticidas. A classe mais utilizada é a dos inseticidas – acaricidas (MÍDIO & SILVA, 1995; TEIXEIRA, 1998).

A toxicidade dos inseticidas depende de vários fatores relacionados ao composto e às condições de exposição. Ingredientes inertes, bem como impurezas, solventes, emulsificantes e outros constituintes das formulações também podem contribuir para os efeitos adversos provocados pelos ingredientes ativos (TEIXEIRA, 1998).

Os inseticidas organofosforados (IOF) e carbamatos são atualmente os produtos mais utilizados no combate às pragas da lavoura e da pecuária, sendo os IOF responsáveis por inúmeras intoxicações humanas, inclusive fatais, pois grande parte destes compostos são de elevada toxicidade aguda (MÍDIO & SILVA, 1995; MORITA *et al.*, 1979; OLIVEIRA – SILVA *et al.*, 2001).

WONG & DUARTE (1996), em uma pesquisa realizada pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mostraram que entre os anos de 1991 e 1994, 18 dos 30 Centros de Controle de Intoxicações do Brasil, relataram um total de 153.459 casos de intoxicações. Deste total, 19.643 (12,8%) foram causadas por praguicidas em geral, sendo que a maior parte das exposições ocorreram em áreas rurais (59,8%) e a maior causa foi ocupacional (73,85). Dentre as classes de praguicidas existentes,

os inseticidas organofosforados representaram o principal grupo envolvido (22,3%).

Através do projeto "Avaliação e Prevenção de Intoxicação por Agrotóxico", desenvolvido pela Fundacentro/MG – Fundação Jorge Duprat de Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, no período de 1987 a 1991, foi revelado um elevado índice de intoxicação por inseticidas organofosforados no estado de Minas Gerais. Através de 1.914 análises de sangue de trabalhadores e produtores rurais de 17 municípios mineiros, constatou-se intoxicação em 32,3% deles (ZUCHI, 1995).

Por estas razões fica evidente a necessidade de prevenção de exposição excessiva e conseqüente intoxicação do trabalhador. Assim, destaca-se a importância dos exames clínicos pré-admissionais e de rotina, com a finalidade de evitar intoxicações, principalmente no meio rural. Entretanto, as condições peculiares do trabalho na agricultura, a escassez de laboratórios de apoio, as grandes distâncias e precariedades dos acessos às áreas rurais, dificultam a implantação de programas continuados de monitorização (WHO, 1974; MÍDIO & SILVA, 1995)

Existem na literatura métodos diretos e indiretos para monitorizar a exposição ocupacional aos inseticidas organofosforados. Entre as medidas indiretas, os bioindicadores de efeito proporcionam avaliação do efeito tóxico no organismo, muito úteis no caso de exposição a agentes tóxicos não-persistentes, como os organofosforados, compostos difíceis de se detectar diretamente (HAYES, 1971; HAYES *et al.*, 1980; WALKER, 1992).

A medida das atividades das colinesterases sangüíneas são os mais usuais bioindicadores de efeito na exposição aos IOF (KARR *et al.*, 1992; KALOYANOVA & BATAWI, 1991).

Pesquisas de possíveis efeitos crônicos decorrentes da exposição aos inseticidas organofosforados, também vêm sendo realizadas, para estabelecimento de novos biomarcadores de efeito (LU *et al.*, 1984; BOLOGNESI *et al.*, 1993; MARONI & FAIT, 1993; ANWAR, 1997). Assim, a determinação de parâmetros bioquímicos, como possíveis indicadores de

danos das funções hepática e renal estão sendo avaliados em alguns estudos, além de possíveis alterações relacionadas aos sistemas hematológico e imunológico (GOMES *et al.*, 1999; KOPLOVITZ & YOUNG, 1995).

Alguns estudos epidemiológicos, têm associado a alteração de parâmetros bioquímicos no sangue com distúrbios de função hepática e renal. Estes efeitos, apesar de não-específicos dos IOF, ocorrem com maior prevalência no grupo exposto do que no grupo controle, associados ao grau de inibição das atividades enzimáticas das colinesterases sanguíneas (WHO, 1975).

Como são escassos na literatura os trabalhos relacionados aos efeitos a longo prazo de tais compostos, fica clara a importância de se realizar, paralelamente à biomonitorização, a determinação de parâmetros bioquímicos e hematológicos relacionados à saúde dos trabalhadores rurais, que estão em contato com esses compostos, muitas vezes, sem os devidos cuidados de proteção. Além disso, o baixo grau de escolaridade e analfabetismo, freqüentes nesta população, contribuem para o uso inadequado dos IOF (ECOBICHON, 1998; OLIVEIRA – SILVA *et al.*, 2001).

2. GENERALIDADES

2.1. Exposição ocupacional a inseticidas organofosforados

O uso indiscriminado dos inseticidas organofosforados na agricultura, saúde pública e doméstico, proporciona várias formas e condições de exposição humana e ambiental a tais compostos, havendo um grande interesse por parte dos toxicologistas em avaliar e reduzir esta exposição.

As exposições humanas podem ocorrer de forma involuntária através do contato com os resíduos ambientais, ou intencional como no suicídio, além da exposição ocupacional. Geralmente, resultam do contato com uma matriz fisicamente e quimicamente complexa, na qual o inseticida (ingrediente ativo) está incluído em quantidades variáveis. A exposição ocupacional aos inseticidas organofosforados, vem sendo o assunto de muitos estudos direcionados para a prevenção de danos à saúde (WHO, 1986; CARPIO *et al.*, 1998).

Tais compostos podem apresentar-se sob a forma sólida, líquida ou gasosa. Na exposição ocupacional, as principais vias envolvidas são a dérmica e a respiratória, sendo a oral de pouco significado.

A exposição aos inseticidas organofosforados pode ocorrer nas indústrias de síntese ou de formulação, ou durante as aplicações. Nas áreas agrícolas, a exposição também pode envolver outros trabalhadores que entram na área tratada (HAYES, 1971; WHO 1986; KRIEGER, 1998).

Durante a síntese contínua destes compostos, não é sempre que ocorre contato direto dos trabalhadores com as substâncias, graças ao maquinário adequado para as reações, bombeamento, transporte e armazenamento automático dos produtos. Entretanto, a formulação dos inseticidas pode causar considerável contaminação, pelo fato de haver contato direto dos operários com numerosos tipos

de produtos. Nestes trabalhadores, pode ocorrer intoxicações agudas devido aos acidentes e/ou ao não cumprimento das recomendações de segurança.

Todos os trabalhadores envolvidos no tratamento de lavouras, colheitas, e os que trabalham no controle dos vetores de doenças, estão mais sujeitos à exposição. São expostos, simultaneamente ou sucessivamente, a vários compostos e formulações, muitas vezes, com uma frequência irregular de aplicação e sob grande variedade de condições. Logo, são mais suscetíveis a sofrer intoxicações crônicas, além das agudas (TORDOIR & MARONI, 1994).

Existem diferenças na exposição dos aplicadores e trabalhadores industriais. Os trabalhadores da indústria são geralmente expostos somente a um ou poucos compostos, por um período de tempo prolongado, e a exposição é relativamente constante todo o tempo. Por outro lado, trabalhadores da agricultura e da saúde pública são expostos a numerosos compostos por curtos períodos de tempo, e os níveis de exposição são extremamente variáveis com as condições climáticas, tipo de aplicação e práticas de trabalho. As principais vias de exposição também diferem entre esses trabalhadores. Exposição dérmica prevalece nos aplicadores da agricultura e saúde pública, enquanto a inalação é mais comum durante a produção e formulação (MARONI *et al.*, 2000).

Logo, a exposição ocupacional pode ser maior ou menor de acordo com os seguintes fatores principais: tipo de formulação, concentração da mistura, método de aplicação, condições dos equipamentos de aplicação, presença de vento no momento da aplicação, condições de temperatura e umidade relativa do ar, observação das condições de higiene e condições de uso do equipamento de proteção individual (EPI). Assim, a avaliação geral da exposição para trabalhadores rurais requer observações cuidadosas de práticas de trabalho (TORDOIR & MARONI, 1994).

Alguns autores, através de medidas diretas da exposição ocupacional aos praguicidas como a quantificação do agente tóxico depositado na pele, roupas e equipamentos utilizados confirmaram que as principais vias de exposição envolvidas são a dérmica e a respiratória, sendo, a primeira, de maior importância (DURHAM & WOLFE, 1962; WOLFE *et al.*, 1967; FIELDMAN & MAIBACH, 1974; WOLFE *et al.*, 1978).

Nesses casos, a suposição é de que a quantidade depositada equivale à quantidade absorvida e a exposição ocupacional total pode ser interpretada através da medida direta do praguicida no ar. Por outro lado, a exposição também pode ser medida indiretamente, através da concentração do composto ou de seus produtos de biotransformação, no organismo ou excretados em fluidos biológicos, bem como pela medida do efeito tóxico no organismo (HAYES, 1971; WHO, 1974; HAYES *et al.*, 1980; FRANKLIN *et al.*, 1981).

Os resultados de medidas diretas da exposição aos praguicidas podem ser utilizados para avaliar o risco relativo a diferentes vias de exposição, diferentes procedimentos operacionais e de proteção. Os resultados de medidas indiretas podem ser utilizados com o mesmo propósito, além de servirem como "índices de dosagem" no organismo mostrando algumas vezes, boa correlação com os efeitos clínicos (HAYES, 1971; KRIEGER, 1998).

Entretanto, ECOBICHON (1998), afirma que medida direta da exposição deve ser realizada somente pela detecção dos praguicidas ou seus metabólitos no organismo, qualquer que tenha sido a via de introdução.

Vários estudos mostram que as principais vias de exposição ocupacional podem ser influenciadas quanto à eficiência na absorção pelo tipo e concentração da formulação, métodos e duração da aplicação, além de fatores ambientais e hábitos do trabalhador (HAYES, 1971).

Na agricultura, a extensão da exposição aos IOF depende de muitos fatores: propriedades físico-químicas do composto, biodegradabilidade, natureza do trabalho proposto, e condições do local. Então, diferenças regionais também podem ocorrer (WHO, 1986).

A meta global dos estudos de avaliação da exposição ocupacional aos praguicidas, principalmente os organofosforados, é estabelecer condições seguras de exposição, já que a utilização de tais compostos não pode ser evitada (YOUNG, 1987; HAWKINS *et al.*, 1991; MARONI & FAIT, 1998).

2.2. Características e propriedades

Os inseticidas organofosforados representam uma das mais importantes classes de praguicidas. São compostos orgânicos, derivados do ácido fosfórico e tiofosfórico e são representados pela estrutura geral mostrada na Figura 1, onde R₁ e R₂ são grupamentos metila ou etila.

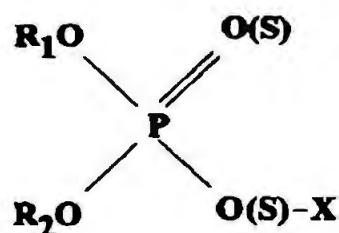


FIGURA 1. Estrutura química geral dos compostos organofosforados (MARONI *et al.*, 2000)

Dependendo da configuração dos átomos de O ou S, seis principais grupos de organofosforados podem ser formados (Figura 2)

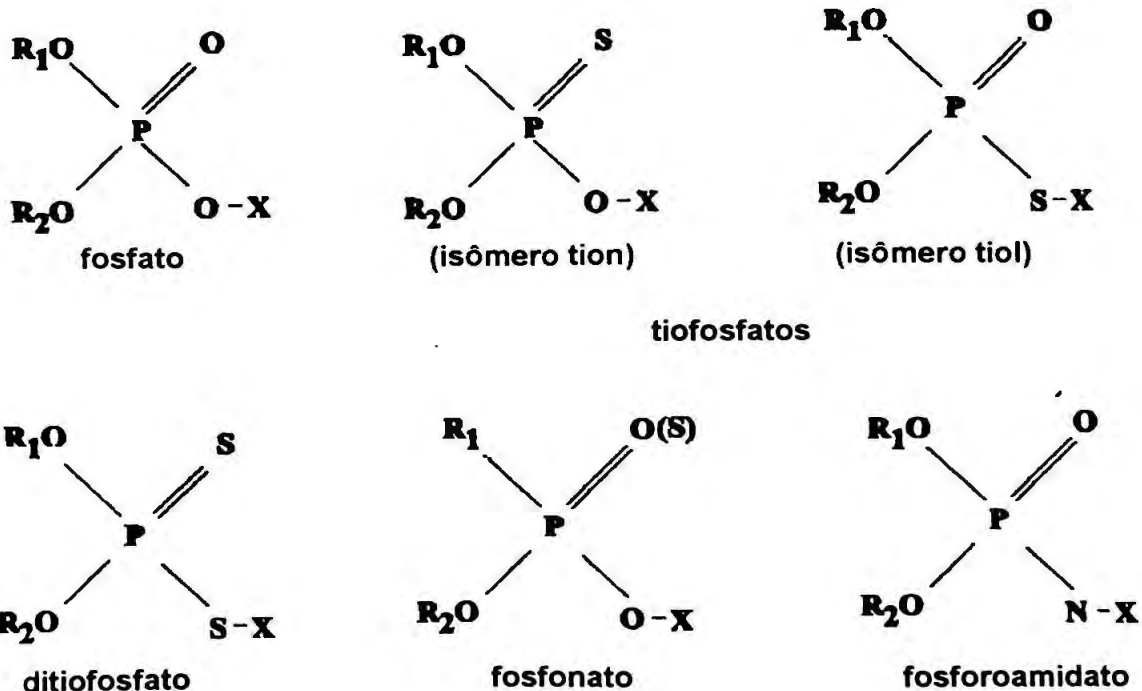


FIGURA 2. Estruturas químicas dos principais grupos de compostos organofosforados (MARONI *et al.*, 2000).

Na sua grande maioria, os IOF são compostos líquidos de alta pressão de vapor e lipossolúveis, dissolvendo-se nos solventes orgânicos, nos quais são normalmente formulados. Também podem se apresentar na forma de pós, granulados e concentrados emulsionáveis, sendo relativamente estáveis em pH neutro. O peso molecular dos organofosforados varia de 183 a 466 (WHO, 1986; MÍDIO & SILVA, 1995).

Todos são rapidamente hidrolisados e oxidados no ambiente e em pH alcalino, portanto, não são persistentes e não se acumulam no organismo, sendo eliminados pela urina após sofrerem reações de biotransformação.

A maioria dos IOF é utilizada como inseticida e age por inibição da enzima acetilcolinesterase nas espécies atingidas, sendo conhecidos como inseticidas anticolinesterásicos. Poucos organofosforados são utilizados como herbicidas, estruturalmente diferentes dos inseticidas, e sua inibição sobre a acetilcolinesterase é bem mais fraca. A ação inseticida e a toxicidade, muitas vezes, não são devidas ao composto em si, mas a um de seus produtos de biotransformação (RUSSI, 1974; MAZON *et al.*, 1982; TORDOIR & MARONI, 1994).

Os fosfatos (P=O) são ativos biologicamente, enquanto que os tiofosfatos (P=S) necessitam ser biotransformados para exercerem ação biológica. A forma P=O do composto pode ser chamada de OXON e isto foi incorporado na nomenclatura. Desde que a forma P=S é intrinsecamente mais estável, alguns inseticidas são produzidos nesta forma, podendo ser convertidos em *oxons* nos tecidos (WHO, 1986; VALE, 1998)

Em relação à estabilidade desses compostos, algumas reações de degradação ocorrem durante o armazenamento de organofosforados a elevadas temperaturas e derivados mais tóxicos são formados. A umidade e a luz solar também desempenham um

papel importante nesta transformação sob condições naturais. Por outro lado, o solvente utilizado na formulação também pode influenciar na estabilidade desses compostos. A degradação microbiológica contribui para o rápido desaparecimento destes compostos em solos (WHO, 1986; KALOYANOVA & BATAWI, 1991).

2.3. Toxicocinética

Absorção

A absorção da maioria dos compostos organofosforados, ocorre por difusão passiva, ou seja, quanto maior a lipossolubilidade da substância mais facilmente atravessará as membranas lipídicas do organismo e, portanto, mais eficiente a absorção. A pele, o trato respiratório e gastrintestinal são as principais vias envolvidas no processo de absorção destes compostos pelo organismo humano (KALOYANOVA & BATAWI, 1991; ECOBICHON, 1996).

A eficiência da absorção dependerá das propriedades físico-químicas do composto, do tipo de formulação e do conteúdo lipídico conferida pelas membranas nos diferentes compartimentos do organismo. A maioria dos inseticidas organofosforados é altamente lipossolúvel, sendo facilmente absorvidos pelo organismo (WHO, 1986; VALE, 1998).

Um grande número destes compostos são líquidos, possuindo diferentes pressão de vapor a temperaturas elevadas; portanto, a eficiência da absorção oferecida pela inalação do vapor varia de composto para composto. A pressão de vapor do ingrediente ativo é reduzida na diluição com solventes ou emulsificantes, diminuindo o perigo da inalação. Além da lipossolubilidade e volatilidade do inseticida, o tamanho do material particulado disperso nos diferentes tipos de formulações, principalmente aerossóis, também influencia a absorção. Da mesma forma, a penetração dérmica é influenciada pelo

tamanho das partículas e o tipo de formulação em que estão dispersas, além das condições de integridade do tecido.

Enquanto a absorção do ingrediente ativo através da pele, em formulações de pós ou grânulos, pode ser relativamente ineficiente, a presença de agentes dispersantes aquosos ou de solventes orgânicos em *sprays* ou em formulações concentradas, podem aumentar consideravelmente a absorção (RUSSI, 1974; WHO, 1986).

HAYES (1971), relatou a influência do tipo de formulação e dos métodos de aplicação na exposição dos trabalhadores aos inseticidas organofosforados e, conseqüentemente, na absorção. Há maior introdução pela via respiratória quando formulados em aerossóis, sendo menor nos pós e baixa nos *sprays* diluídos. Quanto menor o tamanho do material particulado disperso nas formulações, maior proporção poderá ser inalada.

A absorção gastrointestinal de IOF por trabalhadores expostos não é de grande importância. Geralmente, a ingestão destes compostos ocorre em casos de tentativas de suicídio. Em estudos experimentais, em ratos, a absorção da maioria dos inseticidas organofosforados administrados por esta via mostrou-se rápida e eficiente (HAYES, 1971; WHO, 1986).

Distribuição e armazenamento

Os inseticidas organofosforados são caracterizados pela instabilidade química e rápida biotransformação no organismo, não possuindo efeito acumulativo. As reações de biotransformação e as que acontecem com constituintes do tecido ocorrem logo após a absorção.

Estudos de triagem em animais usando material radioativo não fornecem nenhuma pista para a distribuição de compostos inalterados, sendo possível determinar a via de excreção dos metabólitos e estimar a meia-vida aproximada dos inseticidas no

organismo, que é geralmente de poucas horas (WHO, 1986; KALOYANOVA & BATAWI, 1991; MARONI *et al.*, 2000).

Biotransformação

Sendo ésteres, os inseticidas organofosforados sofrem extensa biotransformação em todas as formas de vida. As vias de biotransformação são altamente específicas e dependem do grupo químico substituinte ligado à estrutura básica destes ésteres (ECOBICHON, 1996).

A biotransformação dos IOF ocorre principalmente por oxidação, redução, hidrólise e conjugação. A oxidação pode resultar em produtos mais ou menos tóxicos. Em geral, fosforotioatos requerem oxidação para a formação do metabólito ativo .

O processo de biotransformação pode ser compreendido em duas fases: A Fase I, responsável pela formação dos metabólitos reativos, e a Fase II, onde se processa a conjugação dos metabólitos polares formados na Fase I com alguns compostos endógenos do organismo para formar produtos com considerável solubilidade em água (KALOYANOVA & BATAWI, 1991; QUE HEE, 1993; ECOBICHON, 1996).

As enzimas de ambas as fases de biotransformação são encontradas difundidas em plantas, animais e insetos, responsáveis pela susceptibilidade e resistência natural adquirida pelas espécies a muitos desses inseticidas.

As reações de biotransformação podem ser divididas em três classes distintas: as realizadas pelo sistema das oxidases de função mista (responsável pela maioria das reações oxidativas), pelas hidrolases e transferases. As principais vias de biotransformação alternativas, uma vez avaliadas em animais e homens, são listadas à seguir (WHO, 1986; ECOBICHON, 1996).

Sistema das oxidases de função mista:

Dessulfuração oxidativa

Constitui uma das principais vias de biotransformação dos IOF, e é essencialmente a ativação do precursor fosforotioato (P=S) ao éster fosfato (P=O), com a formação da forma OXON, que resulta em aumento acentuado da toxicidade. Ao mesmo tempo, geralmente, as formas *oxons* são mais facilmente hidrolisadas e, portanto, facilmente excretadas em mamíferos (hidrolases); os insetos, porém, são freqüentemente deficientes destas enzimas, sendo mais suscetíveis aos efeitos tóxicos destes metabólitos (WHO, 1986; ECOBICHON, 1996; LARINI, 1997).

O - Desalquilação oxidativa

A conversão dos triésteres a diésteres é um processo de destoxificação e foi uma vez considerado por ser mediado somente por enzimas hidrolíticas (fosforil fosfatases ou A - esterases). Entretanto a reação requer enzimas microssômicas do fígado, NADPH e oxigênio. Vários fosfatos, mas não fosforotioatos, são biotransformados por essa via nos mamíferos.

Desarilação oxidativa

Ao contrário da O-desalquilação, essa reação parece ocorrer somente com fosforotioatos e não com fosfatos .

As reações de desalquilação oxidativa e de desarilação envolvem enzimas que utilizam a coenzima reduzida NADPH, os sistemas citocromo P-450 e o regenerativo-NADPH, que providenciam elétrons e oxigênio necessários para produzir metabólitos polares (WHO, 1986; QUE HEE, 1993; ECOBICHON, 1996).

Oxidação do grupo tioéter

Esta via também resulta na formação de compostos mais ativos, com a formação de sulfóxidos e sulfonas, que permanecem mais tempo no organismo (WHO, 1986; LARINI, 1997).

Oxidação na cadeia lateral

A oxidação de grupos alquila é um processo bem conhecido na biotransformação de muitos compostos organofosforados. Como exemplo, pode ocorrer a conversão do fenitrothion ao derivado hidrossolúvel, menos tóxico (WHO, 1986).

Redução

A redução de grupamentos nitro e aminas aromáticos pelos microsomas hepáticos ocorre com o composto já oxidado e também, provavelmente, com o não oxidado, através do sistema NADPH-citocromo c redutase (QUE HEE, 1993; LARINI, 1997).

Hidrólise

A principal via de degradação dos ésteres fosforados é a hidrólise, que pode ser realizada por diferentes hidrolases teciduais, tais como as carboxilesterases, fosforilfosfatases e carboxilamidases, presentes em plantas e animais, com atividades altamente dependentes da natureza dos grupos substituintes da molécula destes compostos (WHO, 1986).

As carboxilesterases são capazes de hidrolisar uma variedade de ésteres de ácidos graxos de cadeias curtas arila e alifática, presentes em abundância nos tecidos dos mamíferos e em menor quantidade nos insetos. O malation é o IOF mais conhecido por sofrer hidólise por estas enzimas.

As carboxiamidases, encontradas extensivamente em plantas, insetos e tecidos vertebrados, são de interesse limitado da degradação dos inseticidas, sendo o dimetoato o único inseticida organofosforado conhecido hidrolisado por amidases teciduais em mamíferos (WHO, 1986; QUE HEE, 1993; ECOBICHON, 1996).

As enzimas comumente conhecidas como A-esterases ou fosforilfosfatases, são amplamente encontradas em tecidos de mamíferos, como no fígado, plasma e intestinos, menos abundantes

em pássaros e podem não estar presentes em alguns insetos. Tais enzimas que participam nas reações de hidrólise destes compostos, produzem a maioria dos metabólitos urinários dos inseticidas organofosforados (WHO, 1986; MARONI *et al.*, 2000)

Conjugação: transferases

A única reação de transferases envolvendo os inseticidas organofosforados requer a glutathiona, que é o substrato para inúmeras transferases presentes no fígado e alguns outros tecidos. As reações da glutathiona transferase geram produtos que são, na maioria dos casos, de baixa toxicidade.

As reações da Fase II envolvendo a conjugação de ácidos carboxílicos, alcóois, fenóis e grupamentos aminas, iminas e sulfidrilas, são bem conhecidas e aplicadas pelos compostos endógenos, como grupamentos formados após as reações de oxidação, hidrólise, e outras relacionadas à biotransformação de um inseticida organofosforado. Cada reação de conjugação ajuda na eliminação dos produtos de degradação primária, que são usualmente destituídos de atividade anticolinesterásica. No entanto, podem causar outros efeitos tóxicos se acumularem no organismo (WHO, 1986; QUE HEE, 1993; ECOBICHON, 1996).

Excreção

A maioria dos inseticidas organofosforados são degradados rapidamente pelas reações de biotransformação e não há evidência de armazenamento prolongado destes compostos no organismo. A biotransformação da maioria dos compostos organofosforados geram alquilfosfatos ou alquil(di)tiofosfatos como produtos terminais. O processo de excreção pode ser subdividido de acordo com a velocidade das reações envolvidas, ocorrendo principalmente na urina, em menor quantidade nas fezes e ar expirado, com um pico de 48 h declinando muito rapidamente (WHO, 1986; VALE, 1998; MARONI, *et al.*, 2000;

2.4 Mecanismo de ação e efeitos nocivos

Os inseticidas organofosforados exercem sua ação tóxica através da inibição das colinesterases, enzimas presentes no sistema nervoso (simpático, parassimpático e central). A função normal da enzima é hidrolisar a acetilcolina que foi liberada na terminação nervosa colinérgica em resposta à um estímulo nervoso, impedindo seu acúmulo na fenda sináptica. A perda da atividade pode levar à uma variedades de efeitos resultantes de excessiva estimulação nervosa e culminando em parada respiratória e morte (MUTCH *et al.*, 1992; LOTTI, 1995; ECOBICHON, 1996).

A atividade anticolinesterásica de um IOF depende da reatividade do composto, sendo importante a relação entre sua estrutura química e a inativação da enzima (FUKUTO, 1971).

Todos esses compostos possuem um mecanismo comum de ação, porém, seu potencial como inibidores das colinesterases varia grandemente. Além disso, os compostos organofosforados podem ser classificados como inibidores diretos e indiretos das colinesterases. Os inibidores diretos são efetivos sem nenhuma modificação metabólica após a absorção no organismo. Inibidores indiretos necessitam ser transformados no organismo para serem efetivos, como os fosforotioatos e fosforoditioatos, que requerem ativação por oxidação do grupo P=S a P=O. A importância prática desta classificação é que inibidores diretos causam sinais e sintomas que aparecem rapidamente durante ou após a exposição. Com os inibidores indiretos, os sinais e sintomas demoram mais para aparecerem e os efeitos permanecem após cessar a exposição (JEYARATNAM & MARONI, 1994; VALE, 1998).

As colinesterases possuem dois sítios de ação: um aniônico e um esterásico. Os compostos organofosforados inibem a enzima ligando-se ao seu sítio esterásico. Neste caso, o átomo de fósforo da

molécula liga-se à hidroxila do resíduo do aminoácido serina, tornando a enzima fosforilada e resistente à hidrólise.

Uma vez efetuada a ligação covalente entre a enzima e o inseticida, podem ocorrer dois outros fenômenos: a) a liberação do sítio ativo da enzima (etapa lenta); b) formação de um complexo estável (etapa rápida). Por esta razão, diz-se que esta ligação é praticamente irreversível (KALOYANOVA & BATAWI, 1991; ECOBICHON, 1996; EYER, 1995; MÍDIO & SILVA, 1995)

A reativação da enzima inibida pode ocorrer espontaneamente, com velocidade que depende da espécie e do tecido atingido, assim como dos grupos químicos do IOF. Na maioria dos casos, a enzima fosforilada é altamente estável, tanto que a recuperação de uma intoxicação por inseticidas organofosforados pode ser demorada (WHO, 1986).

Além da inibição das colinesterases, os inseticidas organofosforados podem inibir uma esterase distinta das colinesterases, presente principalmente no sistema nervoso, a *esterase neurotóxica específica* (ENE), causando efeitos neurotóxicos que acometem tanto o sistema nervoso periférico como o sistema nervoso central. Esta inibição ocorre, geralmente, dentro de algumas horas após a exposição sendo, posteriormente, revertida espontaneamente. Apesar disso, algumas semanas após, surge o quadro de efeitos neurotóxicos, a *polineuropatia tardia*, por razões ainda não completamente elucidadas (MUTCH *et al.*, 1992; EYER, 1995).

A função fisiológica da ENE não está bem esclarecida. Acredita-se que funcione como receptor no cérebro, medula e nervos periféricos, estando presente também no fígado, nos linfócitos e em outras células do baço (JOHNSON, 1990; EYER, 1995; MARONI *et al.*, 2000).

A relação estrutura/atividade para inibidores de ENE difere de inibidores de colinesterases, tanto que os últimos podem ser menos efetivos como inibidores de ENE com baixo potencial neurotóxico; o mecanismo de inibição, porém, ocorre de maneira semelhante (WHO, 1986; EYER, 1995; MARONI et al., 2000).

Os sinais e sintomas típicos da intoxicação por compostos organofosforados se devem à instalação da crise colinérgica, resultante do acúmulo da acetilcolina nas sinapses nervosas. Esse quadro sintomático pode variar, quanto à intensidade e gravidade, rapidez de instalação e duração, dependendo da via de absorção, frequência e duração da exposição. As propriedades do composto, como a lipossolubilidade, a inibição direta ou indireta das colinesterases e a estabilidade da enzima fosforilada também afetam os efeitos resultantes.

O intervalo entre a exposição e o aparecimento dos sintomas pode ser curto (poucos minutos), mas geralmente é de uma a duas horas e, nos casos de absorção dérmica predominante, esse intervalo geralmente é maior (NAMBA, 1971; JEYARATNAM & MARONI, 1994).

Os sinais da intoxicação incluem todos aqueles resultantes da estimulação dos receptores muscarínicos (sistema nervoso autônomo parassimpático), dos receptores nicotínicos (gânglios do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático), da junção neuromuscular e do SNC (Tabela 1) (ECOBICHON, 1996).

Dependendo da severidade da intoxicação esses sintomas começam com o aparecimento de vômitos, dores abdominais, diarreia (principalmente em casos de ingestão), salivação e sudorese. O quadro progressivo é caracterizado por fraqueza muscular, geralmente começando nas faces e pálpebras, evoluindo para convulsões e finalmente paralisia (JEYARATNAM & MARONI, 1994).

QUADRO 1. Principais sinais e sintomas de intoxicação aguda, causados por inseticidas organofosforados (ECOBICHON, 1996; JEYARATNAM & MARONI, 1994).

<i>Efeitos muscarínicos</i>	<i>Efeitos nicotínicos</i>	<i>Efeitos no SNC</i>
aumento de secreções	taquicardia	inquietação
broncoconstrição	hipertensão	labilidade emocional
miose	fasciculações	ataxia
diarréia	tremores	letargia
bradicardia	fraqueza muscular	confusão mental
incontinência urinária		perda de memória
		fraqueza generalizada
		convulsão
		coma
		cianose

No estágio final ocorrem: paralisia, convulsão, depressão respiratória e coma. Em casos fatais, geralmente a causa imediata de morte é a asfixia resultante de depressão respiratória. A parada respiratória resulta de uma combinação de bloqueio do trato respiratório por excessiva secreção das glândulas salivares e possível broncoconstrição (NAMBA, 1971; MUTCH *et al.*, 1992; JEYARATNAM & MARONI, 1994).

O diagnóstico de intoxicação aguda geralmente é fundamentado na observação dos sintomas, nas condições de exposição nas últimas 6-8 horas e na baixa atividade das colinesterases.

Existe uma correlação razoável entre inibição das colinesterases e os sinais clínicos da intoxicação aguda. A correlação tende a aumentar rapidamente, tanto quanto a porcentagem de inibição. Quando a inibição é devida às baixas e repetidas exposições, a correlação com os sintomas pode ser baixa ou totalmente inexistente (MARONI *et al.*, 2000).

O início dos sinais clínicos da neuropatia tardia ocorre de uma a três semanas após exposição aguda. Os sintomas principais, câimbras musculares e dolorosas e fraqueza progressiva, começam nas pernas e podem eventualmente envolver os braços. A depressão dos reflexos tendinosos e fraqueza muscular dos membros distais são os sinais mais perceptíveis e a perda subjetiva sensorial é suave ou ausente. O exame eletromiográfico revela uma forma de degeneração parcial dos músculos afetados e a eletroneurografia mostra uma apreciável demora nos movimentos motores terminais enquanto a velocidade de condução motora máxima está normal, ou diminuída na maioria dos casos. A recuperação da neuropatia é muito lenta e os prejuízos funcionais evoluem para atrofia muscular ou comprometimento da coluna vertebral (JEYARATNAM & MARONI, 1994; EYER, 1995; HENRY, 1997).

Uma outra manifestação neurológica, conhecida como "*síndrome intermediária*", é caracterizada pelo comprometimento muscular afetando os músculos da respiração e os flexores do pescoço e dos membros. Os sintomas aparecem de 24 a 96 horas após uma crise colinérgica aguda e antes do aparecimento dos primeiros sinais da *polineuropatia tardia*. Sua etiologia ainda não é conhecida e vem sendo discutida (EYER, 1995; ECOBICHON, 1996; HENRY, 1997).

A grande maioria dos compostos organofosforados são rapidamente biotransformados e excretados, portanto intoxicações crônicas são mais difíceis de ocorrer. Entretanto, como vários IOF

causam inibição lentamente reversível das colinesterases, a acumulação desses efeitos pode se manifestar, de forma menos pronunciada, como dores de cabeça, vertigens, insônia, fraqueza, aumento da sudorese, náuseas, perda do apetite e tremores (KALOYANOVA & BATAWI, 1991; JEYARATNAM & MARONI, 1994).

São poucos os estudos que investigam efeitos a longo prazo de exposição a praguicidas, sendo de grande importância, o estudo dos efeitos de hepatotoxicidade, imunotoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade, bem como de alterações fisiológicas (MARONI & FAIT, 1993).

Os estudos sobre efeitos crônicos causados por estes inseticidas são difíceis de se avaliar devido à interferência de outras substâncias tóxicas presentes na produção desses compostos, bem como da exposição a outros praguicidas durante a aplicação (GOMES *et al.*, 1999).

Em estudos epidemiológicos, os distúrbios mais encontrados são hepáticos, renais, hematopoiéticos, dérmicos, cardiovasculares e respiratórios, bem como agravamento das condições do estado geral de saúde (MARONI & FAIT, 1993).

Alterações de alguns parâmetros bioquímicos, como aumento do nível de aminoácidos, proteínas totais e de algumas enzimas no soro, vêm sendo atribuídos a distúrbios hepáticos.

Já foram relatados, em estudos epidemiológicos, alterações nos níveis de albuminas/globulinas e na atividade enzimática da fosfatase alcalina, aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), asparagina amino transferase e ornitina amino transferase, bem como aumento de certos aminoácidos no soro, como histidina, valina, cistina, lisina, arginina, alanina e outros (WHO, 1975; KALOYANOVA & BATAWI, 1991)

LU *et. al.* (1984) detectaram alterações neurológicas e cardiovasculares, através de eletroencefalogramas e

eletrocardiogramas, em exposição ocupacional ao dipterex e atribuíram tais alterações a possíveis efeitos crônicos.

ANWAR (1997), relata a ocorrência de linfomas e pancreatite em indivíduos expostos ocupacionalmente aos inseticidas organofosforados.

Exposições anormais a esses agentes podem induzir reações de hipersensibilidade, de manifestações cutâneas, não havendo evidências de que alterem o mecanismo de defesa orgânica (KALOYANOVA & BATAWI, 1991). Entretanto, COLOSIO *et al.* (1999) relataram possíveis efeitos imunotóxicos decorrentes da exposição ocupacional e ambiental a tais compostos, considerando a possibilidade de que os efeitos observados dependam da presença de outros componentes nas formulações.

Ainda há necessidade de se estudar e avaliar os possíveis efeitos crônicos destes compostos e cada vez mais cresce o número de estudos epidemiológicos, investigando efeitos adversos resultantes de exposições crônicas aos praguicidas.

2.5 Monitorização biológica

A monitorização biológica é particularmente importante na avaliação da exposição de trabalhadores aos praguicidas, devido às várias vias de exposição envolvidas e à possível combinação de exposição ocupacional e não - ocupacional. Por outro lado, a monitorização ambiental em trabalho no campo é dificultada.

A medida do praguicida inalterado e/ou de seus metabólitos em sangue e urina, pode ser usada como indicador de exposição, ou melhor, para estimar a dose interna. Embora possa ser útil para avaliar a exposição por todas as vias, fornece poucas informações sobre o risco à saúde, devido à falta de conhecimento sobre a relação dose – efeito, principalmente nos casos de exposição à baixas

concentrações ou à misturas complexas de compostos (KRIEGER, 1998; MARONI *et al.*, 2000)

A monitorização biológica de aplicadores de praguicidas e trabalhadores rurais foi primeiramente realizada em 1950, com a introdução dos inseticidas organofosforados no mercado e o risco elevado de intoxicações agudas.

Com o aumento contínuo do uso desses compostos na agricultura e a incidência de intoxicações, particularmente entre os aplicadores rurais, a necessidade da monitorização biológica tem aumentado nas últimas décadas. A determinação das atividades enzimáticas das colinesterases sangüíneas ainda é o bioindicador mais utilizado na avaliação da exposição ocupacional aos IOF (MAZON *et al.*, 1982; COYE *et al.*, 1986 b; OLIVEIRA – SILVA *et al.*, 2000).

LOTTI (1995), MC QUEEN (1995) e CHEN *et al.* (1999), consideram que a pseudocolinesterase plasmática é mais sensível a alguns IOF, refletindo melhor sua absorção pelo organismo e podendo ser considerada um bioindicador de exposição, além de ser inibida e regenerada mais rapidamente em relação à enzima do eritrócito. Esta, reflete o estado de inibição da enzima no sistema nervoso relacionado aos efeitos tóxicos agudos, podendo ser interpretada como um bioindicador de efeito.

A inibição das colinesterases está altamente correlacionada à intensidade e duração da exposição aos IOF. Após diversas intoxicações, a redução da atividade enzimática se prolonga por volta de 30 dias no plasma e 100 dias nos eritrócitos, correspondendo ao tempo de síntese hepática das pseudocolinesterases e à vida média das células vermelhas (COYE *et al.*, 1986b; JEYARATNAM & MARONI, 1994).

Entretanto, existem certas limitações na interpretação dos resultados quando se utiliza a medida das colinesterases como

bioindicadores de exposição devido à variação natural das atividades enzimáticas na população não-exposta (interindividual). Por outro lado, a existência de flutuações entre uma análise e outra na mesma amostra de sangue, contribui para a variabilidade intra-individual. Outros fatores também podem afetar as atividades das colinesterases (idade, sexo, raça, estado nutricional e patologias). A acetilcolinesterase eritrocitária é menos afetada do que a pseudocolinesterase, a não ser em condições que deteriorem a membrana da célula vermelha. A Tabela 2 reúne algumas situações que alteram as atividades das colinesterases (COYE *et al.*, 1986b; MUTCH *et al.*, 1986; JEYARATNAM & MARONI, 1994; MARONI *et al.*, 2000).

A sensibilidade dos testes pode ser aumentada ao adotar valores individuais de pré – exposição como referência. Na ausência destes valores, a interpretação dos resultados pode ser dificultada, podendo haver substancial declínio da atividade enzimática do trabalhador exposto, e o resultado estar dentro do valor de referência estabelecido pelo método utilizado no laboratório (NAMBA, 1971; COYE *et al.*, 1986).

QUADRO 2. Variações nas atividades enzimáticas das colinesterases eritrocitária (ACHE) e plasmática (PCHE), em indivíduos saudáveis e em condições patológicas específicas (MARONI *et al.*, 2000).

Condições	ACHE	PCHE
<i>Indivíduos Sadios</i>		
Variação intra-individual	3 – 7%	6%
Variação inter-individual	10 – 18%	15 – 25%
Sexo	nenhuma	10 – 15% > em homens
Raça	nenhuma	< na raça negra
Idade	< de 6 meses	nenhuma
Massa corpórea	nenhuma	correlação direta
Colesterol sérico	nenhuma	correlação direta
Menstruação	nenhuma	diminuída
Gravidez	nenhuma	diminuída
<i>Condições Patológicas</i>		
Atividade reduzida	Leucemias e neoplasias	Distúrbios hepáticos Distúrbios cardiovasculares Reações alérgicas Infecções agudas Anemias, uremias Hipertireoidismo Câncer, infarto Condições de elevada função metabólica
Atividade aumentada	Policitemia, talassemia e outras discrasias	

No Brasil, o Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) para exposição aos organofosforados é a depressão da atividade da acetilcolinesterase eritrocitária em 30%, da pseudocolinesterase plasmática em 50 % ou das colinesterases totais em 25% em relação às atividades iniciais da enzima (BRASIL, 1994).

O diagnóstico das intoxicações pode ser auxiliado pelo estudo das características da exposição, pela observação de sintomas clínicos, e também por informações obtidas geralmente através de questionários.

Em intoxicações agudas, geralmente o grau de inibição enzimática correlaciona - se com os sintomas observados. Nos casos de exposições a longo prazo e em baixas concentrações, a dificuldade é maior, pois a faixa de atividade das colinesterases geralmente é contínua, variando pouco e podendo haver um acúmulo do efeito do inseticida no organismo, muitas vezes, sem a evidência clínica da intoxicação. Logo, é de grande importância o estabelecimento dos valores pré - exposição, além da utilização de outros exames que avaliem o estado de saúde geral do trabalhador exposto (COYE *et al.*, 1986b; KALOYANOVA & BATAWI, 1991).

Vários métodos foram desenvolvidos para a medida das atividades das colinesterases sangüíneas. Entre eles, destacam - se os potenciométricos, colorimétricos e titulométricos. O método espectrofotométrico de ELLMAN *et al.* (1961), com suas variadas modificações, tem sido o mais recomendado (KALOYANOVA & BATAWI, 1991; SILVA *et al.*, 1994; MARONI *et al.*, 2000; OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2000).

A detecção de organofosforados inalterados no sangue geralmente não é possível, exceto durante ou logo após a absorção de quantidades substanciais do inseticida devido sua rápida biotransformação no organismo. Em geral, não permanecem inalterados no sangue por mais de poucos minutos ou horas. Esse

tipo de análise geralmente é feita em pacientes com intoxicação aguda ou tentativas de suicídio (YASHIKI *et al.*, 1990; QUE HEE, 1993; FUTAGAMI *et al.*, 1995; MARONI *et al.*, 2000).

NAMERA *et al.* (2000) estabeleceram um método colorimétrico, simples e sensível, para a determinação de inseticidas organofosforados em urina, em casos de ingestão de grande quantidade.

Os alquilfosfatos, produtos de biotransformação dos IOF, podem ser detectados em urina durante a absorção do praguicida, e até 48 horas após, uma vez que a maioria dos organofosforados geram alquilfosfatos ou aril(di)tiofosfatos como produtos terminais.

Essas análises são algumas vezes utilizadas na identificação de um composto específico, ao qual os trabalhadores foram expostos. A medida de *p* – nitrofenol na urina para avaliar a dose interna do paration é um dos testes pioneiros desenvolvido (QUE HEE, 1993; JEYARATNAM & MARONI, 1994; KRIEGER, 1998; MARONI *et al.*, 2000).

A principal vantagem destas análises é que permitem avaliar a exposição a concentrações mais baixas de que as necessárias para serem detectadas em monitorização das colinesterases sangüíneas (SHAFIC *et al.*, 1971 e 1973; SINGH *et al.*, 1986; APREA *et al.*, 1994; VIDAL *et al.*, 1998).

A medida de alquilfosfatos em urina requer métodos analíticos mais sofisticados, baseados na derivação dos compostos, separação e detecção cromatográfica por espectrometria de massa. Por isso, ainda não é realizada em exames de rotina (JEYARATNAM & MARONI, 1994).

Alguns autores revisaram métodos para a detecção de metabólitos urinários de organofosforados na população em geral, onde são feitas considerações práticas, mostrando a importância dos

alquilfosfatos na avaliação da exposição (APREA *et al.*, 1996; MOATO *et al.*, 1999).

Outros parâmetros também podem ser utilizados como indicadores de exposição aos inseticidas organofosforados. A medida da atividade da “esterase neurotóxica” em linfócitos periféricos foi sugerida como teste bioquímico para neuropatia tardia. A eletroneuromiografia, um teste eletrofisiológico objetivo e sensível para avaliar a função neuromuscular, também pode ser utilizado para avaliar a neurotoxicidade dos IOF (JOHNSON, 1990; LOTTI, 1995; EYER, 1995; CARPIO *et al.*, 1998).

A atividade de A-esterase, também conhecida como paraoxonase pode ser usada para determinar a sensibilidade dos trabalhadores aos inseticidas organofosforados (KALOYANOVA & BATAWI, 1991).

As alterações nas funções fisiológicas ou em determinados órgãos podem ser avaliadas através das determinações de parâmetros bioquímicos e hematológicos, como avaliação da função renal e hepática, e até mesmo alterações no sistema cardiovascular, detectadas através de eletrocardiograma. (WHO, 1975; KALOYANOVA & BATAWI, 1991; BOLOGNESI *et al.*, 1993; GOMES *et al.*, 1999).

2.6 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

A determinação de alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos, paralelamente à medida da atividade das colinesterases sangüíneas, em períodos de pré e pós – exposição ocupacional aos inseticidas organofosforados, é uma maneira de avaliar o estado de saúde do trabalhador exposto, considerando que vários fatores podem alterar a atividade enzimática das colinesterases. Por outro lado, esses parâmetros podem se alterar como consequência do efeito do inseticida sobre determinado órgão

ou função, ou de seu efeito direto sobre enzimas (WHO, 1975; MARONI & FAIT, 1993).

A análise de diversas enzimas no soro, tem-se mostrado de grande valor clínico, para fins de avaliação de distúrbios hepáticos. Esse tipo de exame baseia-se no conceito de que o achado no soro de teores elevados de enzimas intracelulares significa a existência de alteração funcional ou orgânica das células que as contém. Logo, pode-se dizer de uma maneira geral, que quanto mais elevados forem os níveis enzimáticos no soro, mais intensa será a lesão celular. Contudo, uma restrição na síntese e uma redução de atividade podem ser observadas nas lesões crônicas, sendo a amilase, a lipase pancreática e as fostatases, exemplos para este grupo (NOGUEIRA *et al.*, 1990; MILLER, 1999).

Algumas provas laboratoriais que se mostram úteis na avaliação rotineira das hepatopatias são consideradas como provas funcionais (como a determinação de bilirrubina) e outras como indicadoras de lesão hepatocelular, pois denotam, principalmente, a saída das enzimas para o soro. Entre elas, destacam-se: (MILLER, 1999)

Bilirrubina : a excreção e retenção de bilirrubina é considerada, de fato, uma prova funcional, pois reflete a capacidade de transporte e metabolização do hepatócito. A bilirrubina é um pigmento resultante do catabolismo da hemoglobina, após a destruição (normal ou patológica) das hemácias. Ao passar pelo interior do hepatócito, a bilirrubina conjuga – se ao ácido glicurônico, podendo ser encontrada no soro sob duas formas: a forma conjugada (fração direta e solúvel em água) e a forma não conjugada (fração indireta e insolúvel, ligada às proteínas plasmáticas). Somente a forma conjugada de bilirrubina é eliminada pelo fígado e rim, podendo ocorrer um aumento de bilirrubina no soro (icterícia), com ou sem excreção urinária. Nas icterícias causadas por lesão hepatocelular a bilirrubina está presente

na urina (urina escura), já que o pigmento retido é do tipo direto (KÜHN *et al.*, 1977; MILLER, 1999).

Transaminases: pertencentes à classe das transferases, constituem um grupo de enzimas que catalisam a transferência de um grupo amino de um aminoácido a um hidrocarboneto para formar um aminoácido diferente. As duas transaminases de interesse clínico são aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), amplamente distribuídas no coração, fígado, músculo estriado, rim e pâncreas, predominando a AST no coração e ALT no fígado. Consideradas como indicadores de lesão hepatocelular, análises dessas enzimas em soro mostram-se de grande utilidade no acompanhamento de distúrbios hepáticos ou lesões hepatocelulares. No soro normal, a atividade da AST é menor que a atividade da ALT; no hepatócito, a AST ocorre tanto no citoplasma como na mitocôndria, enquanto a ALT é uma enzima citoplasmática. Logo, o aumento predominante da AST indica lesão hepatocelular profunda. A elevação dessas enzimas no soro pode indicar também infarto do miocárdio, distrofia muscular, dermatomiose, embolia pulmonar e pancreatite aguda (NOGUEIRA *et al.*, 1990; MILLER, 1999).

Fosfatase alcalina: pertencente à classe das hidrolases que atuam sobre ésteres fosfóricos, liberando fosfato inorgânico. Encontra-se presente em praticamente todos os tecidos corporais, no citoplasma das células, mas ocorre em níveis particularmente elevados em alguns órgãos, entre os quais se encontra o fígado. Acredita-se que a enzima do soro proceda deste órgão, embora existam indícios que apoiam sua possível origem no tecido ósseo. São observadas elevações leves ou moderadas em muitos pacientes com hepatite e cirrose, e transitórias em praticamente todos os tipos de hepatopatias. Também são encontrados valores aumentados em gravidez, em crianças e algumas condições patológicas como, osteopatias e hipertireoidismo. Valores diminuídos ocorrem no raquitismo congênito,

hipotireoidismo infantil, no escorbuto e na doença celíaca (NOGUEIRA *et al.*, 1990; JOHN SCHAFFNER & FENTON SCHAFFNER, 1995)

Gama-glutamil transferase: esta enzima alcança sua maior concentração no tecido renal, mas seu significado clínico refere-se principalmente às doenças do fígado e das vias biliares, para as quais exibe grande sensibilidade. Sua elevação representa a alteração laboratorial mais freqüente nas doenças hepatobiliares, sendo observadas também nas lesões hepáticas inflamatórias e tóxicas (KÜHN *et al.*, 1977; JOHN SCHAFFNER & FENTON SCHAFFNER, 1995; MILLER, 1999).

A função renal, pode ser avaliada de uma maneira grosseira através da dosagem de creatinina e uréia no soro. A relação uréia/creatinina em sangue é freqüentemente utilizada para discriminar azotemias (alterações da taxa de uréia no sangue) renais, pré-renais e pós-renais. As dosagens de uréia em soro são muito menos sensíveis como provas de função renal, do que os testes de depuração, realizados em urina.

Uréia: é a principal forma excretora do nitrogênio proveniente do catabolismo protéico. Forma-se no fígado a partir dos grupos NH₂ liberados pela desaminação dos aminoácidos. Sua análise constitui o recurso mais utilizado para uma avaliação grosseira do estado de funcionamento renal. A hiperazotemia pode ser devida à causas renais, pré-renais e pós-renais. Entre as causas renais, contam-se, a glomerulonefrite aguda, nefrite crônica, o rim policístico, a nefrosclerose, necrose tubular aguda e coma diabético. A insuficiência cardíaca, desidratação, choque, hemorragias digestivas, quadros neurológicos agudos e insuficiência córtico supra-renal, representam as principais causas de hiperazotemia pré-renal. As causas pós renais são constituídas por qualquer tipo de obstrução acentuada do trato urinário. Causas de uréia baixa são devido à insuficiência hepática

grave, nefrose não complicada de insuficiência renal, caquexia e hemodiluição.

Creatinina: elimina-se do plasma por filtração glomerular e não é reabsorvida nos túbulos renais em grau significativo, o que resulta em velocidade de depuração mais elevada do que a da uréia. Além disso, quando os níveis de creatinina no soro ou plasma, ultrapassam seu valor normal, o rim pode eliminar essa substância, por excreção tubular ativa. Por isso, as elevações da taxa de creatinina no sangue são, em geral, mais tardias do que as da uréia. Esse fato tem particular interesse nos prognósticos dos quadros de insuficiência renal acompanhados de uremia. Em casos precoces, devido à facilidade de excreção da creatinina, observa-se apenas o aumento da taxa de uréia. A elevação considerável de creatinina no soro só se observa em casos fatais, de evolução rápida (NOGUEIRA *et al.*, 1990; MILLER, 1999).

O hemograma constitui o meio mais direto e mais prático de se estudar os elementos figurados do sangue periférico, sendo considerado um exame de rotina (KERBAUY & MIEZA, 1990).

Os exames hematológicos da série vermelha, constituem-se basicamente na contagem de hemácias (por mm^3 de sangue) e determinação do hematócrito (%), hemoglobina (%) e índices hematimétricos:

Hemácias: As hemácias são os mais numerosos elementos figurados do sangue, com uma vida média de cerca de 120 dias. O número de hemácias por mm^3 de sangue está sujeito a três tipos de variações: as fisiológicas, que correspondem a uma oscilação de até $\pm 5\%$ em torno dos valores normais; as anemias, bastante comuns na prática médica e caracterizadas por uma redução do número de hemácias, associando-se com suas alterações morfológicas e baixa

concentração de hemoglobina; e as policitemias e poliglobulias, que correspondem a um aumento do número de hemácias.

Hemoglobina: A hemoglobina é o pigmento contido nas hemácias e encarregado do transporte do oxigênio do pulmão aos tecidos e do dióxido de carbono em sentido inverso. As hemácias normais encontram-se saturadas de hemoglobina. A concentração normal de hemoglobina no sangue pode variar, sendo um pouco mais elevada no homem. O aumento é devido à hemoconcentração, ou por aumento da massa globular total no organismo, e o decréscimo, à anemia.

Hematócrito: O valor de hematócrito ou volume globular reflete a massa total de células sangüínea na unidade de volume, ou seja, expressa a porcentagem do volume sangüíneo ocupado pelos glóbulos vermelhos, sendo portanto de fundamental importância no estudo das anemias e policitemias. Seu valor está diminuído em todas as anemias, e sua elevação pode depender do aumento do número de hemácias (policitemias, poliglobulias e eritrocitoses) ou da diminuição do volume plasmático (hemoconcentração), como ocorre nas desidratações, no choque e nas queimaduras.

Valores hematimétricos: são calculados a partir das determinações hematológicas citadas anteriormente, e se mostram de grande utilidade na avaliação e classificação morfológica das anemias. O VGM (volume globular médio) expressa o volume médio das hemácias em relação ao volume globular médio normal; O HGM (hemoglobina globular média) é o conteúdo médio de hemoglobina da hemácia em relação à quantidade normal; e o CHGM (concentração hemoglobínica globular média) é a concentração hemoglobínica globular do paciente em relação à concentração normal (KERBAUY & MIEZA, 1990; CARVALHO, 1994; MILLER, 1999).

Nas análises da série branca hematológica, estão envolvidas a contagem global e específica de leucócitos, os quais desempenham papel essencial no mecanismo de defesa e reparação do organismo (KERBAUY & MIEZA, 1990).

Existem 3 classes de leucócitos: os granulócitos, linfócitos e monócitos. Os linfócitos e monócitos desenvolvem-se, principalmente em tecidos linfóides e os granulócitos são produzidos normalmente na medula óssea, e se dividem em neutrófilos, basófilos e eosinófilos.

Na contagem global de leucócitos, situações fisiológicas ou patológicas diversas, podem causar um aumento (leucocitose) ou diminuição (leucopenia) do número total de leucócitos circulantes, ocorrendo em um tipo morfológico que predomina sobre os demais ou em todos os tipos ao mesmo tempo.

Na prática, encontra-se leucocitoses caracterizadas por neutrofilia, eosinofilia, basofilia, linfocitose e monocitose, e podem ser observadas, de uma maneira geral, em infecções, intoxicações, traumatismos, hemorragias agudas, reações leucemóides, leucemias; na criança, pode ser fisiológica. A intensidade depende do agente etiológico, da resistência do indivíduo, e do estado dos órgãos hematopoéticos (CARVALHO, 1994; MILLER, 1999).

Causas freqüentes de leucopenia incluem infecções, doenças viróticas, distúrbios hematológicos, protozooses, septicemias, medicamentos ou substâncias tóxicas (como inseticidas, amidopirina, sulfonamidas, barbituratos), drogas antineoplásicas e radioativas, neoplasias. Embora todos os tipos de leucócitos possam estar envolvidos, pode ocorrer predomínio de neutrófilos e linfócitos principalmente (KERBAUY & MIEZA, 1990; CARVALHO, 1994).

As alterações na contagem específica dos leucócitos, podem estar associadas a diversas causas, e as mais conhecidas são citadas a seguir:

Neutrofilia:

- infecções piogênicas, como septicemia, escarlatina, abscessos, apendicite, artrite supurada, osteomielite, otite e meningite;
- algumas infecções viróticas, como encefalite, poliomielite e raiva;
- destruição do tecido, que ocorre por exemplo no infarto do miocárdio e em queimaduras extensas;
- perda de sangue, período pós operatório, neoplasias, intoxicações e leucocitoses transitórias (por liberação de adrenalina endógena ou outras causas).

Neutropenia:

- ausência congênita de tecido linfóide;
- uremia e insuficiência cardíaca congestiva;
- administração de glicocorticóides.

Eosinofilia:

- infecções parasitárias, principalmente por helmintos;
 - reações alérgicas e certas dermatoses;
 - certas hemopatias, como leucemia mielóide aguda ou crônica, anemia perniciosa e doença de Hodgkin;
 - tumores, como carcinoma brônquico, tumores do ovário e ósseos;
 - fase de cura dos processos infecciosos agudos;
 - anomalia familiar, conhecida como eosinofilia familiar;
 - outras condições patológicas, como escarlatina, periartrite nodosa, certos tóxicos e irradiações.
-

Eosinopenia ou ausência completa:

- fase inicial do processos infecciosos agudos ou reagudização de processos crônicos;
- intoxicações ou distúrbios endógenos (coma diabético, uremia, porfíria);
- choque, queimaduras, anóxia;
- administração de corticóides ou adrenalina;
- esforço físico extenuante, inclusive trabalho de parto;
- síndrome de Cushing.

Basofilia e basopenia:

Pouco ou nada representam os basófilos para a interpretação do quadro hematológico. Pode haver basofilia na leucemia mielóide crônica, varíola, varicela, doença de Hodgkin, anemias hemolíticas crônicas e após esplenectomia.

Linfocitose:

- convalescença de infecções agudas, constituindo a chamada linfocitose pós-infecciosa;
- infecções agudas com intensa leucocitose linfocítica (coqueluche, mononucleose infecciosa e linfocitose infecciosa);
- infecções crônicas (tuberculose, sífilis e brucelose);
- leucemia linfocítica e linfomas;
- linfocitose fisiológica em crianças de até cinco anos.

Linfocitopenia:

- alguns estados de imunodeficiência;

- certas doenças de naturezas diversas, tais como, cirrose hepática, estados caquéticos, processos infecciosos graves, tuberculose ganglionar, fase final das neoplasias, doença de Hodgkin, linfomas, fase aguda da febre tifóide e da gripe;
- administração de drogas citostáticas.

Monocitose:

- certas infecções bacterianas (tuberculose, brucelose, tifo exantemático, febre tifóide, e endocardite bacteriana subaguda);
- fase defensiva das infecções agudas;
- diversas infecções por protozoários (malária, calazar e tripanossomíase);
- doença de Hodgkin e doença de Gaucher;
- leucemia monocítica;
- comprometimento de certos órgãos;

Monocitopenia:

- fase aguda de processos infecciosos;
 - caquexia e desnutrição (KERBAUY & MIEZA, 1990; CARVALHO, 1994; MILLER, 1999).
-

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

Vista a importância de se realizar uma avaliação mais ampla da saúde dos trabalhadores expostos aos inseticidas organofosforados, este trabalho tem como objetivo avaliar a exposição de trabalhadores rurais ao dissulfoton através das medidas das atividades das colinesterases sangüíneas, bem como de alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos relacionados às funções hepática e renal.

As etapas do trabalho proposto, foram:

- levantamento de estudos de vários aspectos da exposição de trabalhadores aos inseticidas organofosforados, particularmente trabalhadores rurais;
 - otimização do método de ELLMAN *et al.* (1961) modificado, pelo estudo de sua precisão, estabilidade das atividades enzimáticas e dos reagentes utilizados;
 - seleção de trabalhadores rurais que usam IOF e determinação das atividades das colinesterases sangüíneas e dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, antes e após o período de aplicação do praguicida;
 - verificação da existência de correlação entre as atividades enzimáticas das colinesterases sangüíneas e avaliação da ocorrência de alterações na atividade enzimática destas enzimas e nos parâmetros bioquímicos (uréia, creatinina, fosfatase alcalina, AST, ALT, gama GT e bilirrubina em soro) e hematológicos (hemograma) antes e após a exposição ao IOF;
 - análise estatística dos resultados para possibilitar interpretações;
-

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 População estudada

A população estudada foi constituída por um grupo de 36 trabalhadores rurais, do sexo masculino, com idades entre 21 e 50 anos, que manipularam o inseticida *Bysiston[®], que contém o dissulfoton, em uma indústria agropecuária. Nesta indústria é utilizado em lavoura de café, em aplicação no solo uma vez por ano, por um período de dois meses, para o controle de “ferrugem” (*Hemileia vastatrix*) e “bicho mineiro” (*Perileucoptera coffeella*) no cafeeiro. O produto, em forma de granulado, é aplicado no solo em concentrações de 40 a 70 kg/ha utilizando máquinas granuladeiras costais, comumente conhecidas como “matracas”.

O trabalhador se expunha ao composto desde a manipulação do produto até a aplicação. A jornada de trabalho era de 6 horas por dia/5 dias na semana, e o tempo total de exposição ao inseticida foi de 2 meses, com 2 intervalos de 5 dias após as primeiras 2 semanas e antes das 2 últimas semanas de aplicação. Todos declararam que não se expuseram a qualquer outro praguicida anteriormente. Durante todo o período de aplicação do inseticida, os trabalhadores usaram luvas, máscara, macacão e botas como equipamento de proteção individual (EPI). O material da roupa era impermeável, repelente a líquidos e vapores tóxicos, a bota era de borracha, as luvas de latex natural e as máscaras apropriadas para partículas PF2 (até 10 vezes o limite de tolerância), descartáveis, constituídas por camadas de fibras sintéticas de poliprotileno.

*Bysiston[®]: 1-(4-clorofenox)-3,3-dimetil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il) butan-2ol (Triadimenol) 15% + O,O-dietil-S-2(etiltio)etil-fosforoditioato (Dissulfoton) 75%.

As coletas de sangue, foram feitas no Laboratório de Análises Toxicológicas, estando os trabalhadores em jejum, e realizadas cerca de 24h antes do início da aplicação, e 12h após o término do período de aplicação do inseticida (pós-exposição).

Em seringa plástica e descartável, foram colhidos 12 mL de sangue, divididos em três tubos coletores: 8mL para separação do soro destinado à determinação dos parâmetros bioquímicos, 2ml com anticoagulante EDTA para o hemograma, e 2mL com heparina para a determinação das atividades das colinesterases.

As amostras destinadas à determinação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas, enquanto que a determinação das atividades das colinesterases foi realizada no Laboratório de Análises Toxicológicas, depois de feita a separação do plasma, imediatamente após a coleta.

Cada trabalhador respondeu um questionário, nos dois períodos de coleta, para levantamento de dados considerados relevantes à interpretação dos resultados, tais como idade, hábitos pessoais e alimentares, uso de medicamentos, presença de patologias, entre outros (anexos I e III). Também assinaram um termo de consentimento de participação no trabalho (anexo II). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) (anexo IV).

Esses trabalhadores foram submetidos a uma avaliação médica pré-admissional, onde certos critérios de exclusão do candidato foram adotados, tais como: idade (acima de 60 anos), peso (menos de 50 kg), problemas gástricos ou alérgicos, alcoolismo e hipertensão.

O Quadro 3 denota as características gerais da exposição e da população estudada.

QUADRO 3. Características gerais da exposição ao inseticida organofosforado (IOF) e do grupo de trabalhadores rurais avaliados.

Características Gerais da Exposição

IOF usado	Tipo de formulação	Método de aplicação	Tempo total de exposição	Frequência da exposição	Uso do EPI
Dissulfoton	Granulado	Polvilhamento	2 meses c/ intervalos	30 h /semana	completo

Características Gerais da População

Idade	Ingestão de bebidas alcoólicas		Ingestão de medicamentos	Patologias
	Fumante	Baixa* Moderada**		
21 a 50 anos	41,7%	41,7%	25,0%	5,6%***

*Baixa: a cada 5 dias. **Moderada: a cada 1 ou 2 dias. ***Patologias presentes: bronquite e sinusite.

4.2 Material

- solução tampão fosfato pH $7,4 \pm 0,2$ em água destilada isenta de CO_2 ; fosfato monobásico de potássio p.a. - Dinâmica[®], lote n.º 1835 e fosfato dibásico de potássio p.a. - ISO FAR, lote n.º 970499;
 - iodeto de acetilcolina - Sigma[®], lote n.º 35H0021 (solução a 17,4 g/L);
 - ditiobisnitrobenzoato (DTNB) - Sigma[®], lote n.º 71H7702 (solução a 3,96g /L);
 - difosfato de cloroquina - Sigma[®], lote n.º 51H025;
 - espectrofotômetro de duplo feixe, Micronal-B 493[®], controlado por microcomputador;
 - peagâmetro TECNAL[®] - modelo TE-089;
 - balança analítica KERN[®]- modelo 410;
 - balança digital de precisão KERN[®] modelo 430-21;
 - agitador de tubos Marcon[®] - modelo MA-162;
 - centrífuga FANEM LTDA- modelo 205 N;
 - cronômetro digital;
 - pipetas automáticas de diferentes capacidades volumétricas OXFORD[®];
 - kits para realização dos exames bioquímicos e hematológicos.
-

4.3 Método

As atividades das colinesterases sangüíneas foram determinadas pelo método espectrofotométrico de ELLMAN *et al.* (1961), modificado. Este método tem por base a capacidade da enzima do material biológico em hidrolizar a acetiltiocolina utilizada como substrato da reação originando a tiocolina, a qual reage com o ditiobisnitrobenzoato (DTNB) resultando na formação de um complexo de cor amarela. A estimativa da velocidade de reação é usada como medida da atividade colinesterásica da amostra.

Como a reação é feita à temperatura ambiente, cada atividade deve ser corrigida por um fator de correção, segundo tabela oferecida pelo método.

A técnica usada foi a seguinte:

- centrifugar à 1500 rpm 1,5mL de sangue heparinizado e separar o plasma;
 - pipetar 10 μ L de sangue total (40 μ L para plasma) e 9mL de solução tampão para tubo de ensaio de 15ml e homogeneizar por inversão;
 - passar 3mL da suspensão para cubeta de referência e outros 3mL para cubeta de amostra;
 - adicionar em ambas as cubetas, 100 μ L de solução de DTNB, homogeneizar e acertar 100% da transmitância;
 - adicionar 50 μ L de substrato (sol. de acetiltiocolina) à cubeta da amostra e acionar o cronômetro, homogeneizar;
 - fazer a primeira leitura após 30 segundos e a segunda após 3 minutos da primeira em comprimento de onda 430 nm.
-

As atividades colinesterásicas (em $\Delta A/\text{min/mL}$) são calculadas:

Para o sangue total (ChE-T): $A \times 100 \times f_c$;

Para o plasma (ChE-P): $A \times 25 \times f_c$;

Segundo fator de correção para plasma e sangue total oferecido pelo método.

Para o eritrócito (ChE-E): $100/Ht [(ChE-T)-(ChE-P \times 1 - H/100)]$, onde se faz a correção pelo valor do Ht = hematócrito;

A determinação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos foi realizada paralelamente às análises das colinesterases, utilizando métodos rotineiros de laboratórios de análises clínicas (anexo V).

4.3.1. Otimização do método analítico para a determinação das atividades das colinesterases sanguíneas

As amostras destinadas à otimização do método analítico foram obtidas de voluntários sadios, não expostos aos inseticidas organofosforados, não fumantes, e que não haviam ingerido qualquer medicamento ou bebida alcóolica.

Foram utilizadas 3 tipos de amostras: sem inibição enzimática, e com cerca de 25% e 50% de inibição "*in vitro*", provocada com a adição de 7,5mg e 15mg de difosfato de cloroquina em 5mL de sangue respectivamente, adaptada do método de WRIGHT & SABINE (1941).

Com essas amostras foram realizados os estudos de precisão e de estabilidade.

Precisão da determinação das atividades enzimáticas das colinesterases sangüíneas

Foram realizados os estudos de precisão intra e interensaio. No estudo de precisão intra-ensaio, foram analisadas 10 replicatas de cada amostra por vez, utilizando os mesmos reagentes.

Já para o estudo de precisão interensaio, as amostras anteriores foram analisadas, em duplicata, durante seis dias consecutivos, sendo que a cada dia foram utilizados novos reagentes (DTNB e sol. de acetiltiocolina).

As variações foram medidas através dos coeficientes de variação obtidos.

Estabilidade das atividades enzimáticas das colinesterases sangüíneas

Para se realizar este estudo utilizou-se 2 tipos de amostras, sem inibição e com 25% de inibição, conservadas em geladeira a 4°C e em freezer, a -20°C.

Durante o estudo da estabilidade a longo prazo, as amostras conservadas em geladeira e freezer foram analisadas 2 vezes por semana durante um mês, com exceção da primeira semana, onde foram analisadas dia-após-dia. Todos os reagentes foram preparados a cada análise.

Estabilidade dos Reagentes

As soluções reagentes iodeto de acetiltiocolina (17,4g/L) e ditiobisnitrobenzoato (3,96g/L) foram avaliadas quanto à estabilidade durante a conservação em freezer.

As análises foram realizadas em duplicata de amostras de sangue sem inibição, recém coletadas de um mesmo voluntário durante 6 dias consecutivos.

No primeiro dia utilizou-se as soluções reagentes recém preparadas e a cada dia manteve-se uma solução e preparou-se outra, sempre alternando a ordem.

5. RESULTADOS

5.1 Precisão do método

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos nos ensaios realizados em 10 replicatas, tratadas conforme descrito em 4.3.1

TABELA 1. Precisão intra-ensaio do método (%CV), avaliada em amostras de sangue *sem inibição* e com inibições de 25 e 50% das atividades enzimáticas.

Amostras	Atividade enzimática ($\Delta A/\text{min/mL}$)		
	sem inibição	25% de inibição	50% de inibição
Sangue Total			
média	20,3	14,2	10,9
DP	0,6	0,8	0,2
%CV	3,0	5,5	2,1
Plasma			
média	6,6	5,6	3,8
DP	0,1	0,1	0,2
%CV	1,4	2,0	4,0
Eritrócitos			
média	36,3	24,3	19,3
DP	1,3	1,7	0,6
%CV	3,7	6,9	3,0

A Tabela 2 apresenta os resultados da precisão interensaio, em análises durante seis dias consecutivos, tratadas conforme descrito em 4.3.1.

TABELA 2. Precisão interensaio do método (% CV), avaliada em amostras de sangue sem inibição e com inibições de 25 e 50% das atividades enzimáticas.

Amostras	Atividade enzimática ($\Delta A/\text{min}/\text{mL}$)		
	sem inibição	25% de inibição	50% de inibição
Sangue Total			
média	19,1	12,2	9,9
DP	0,9	2,2	2,0
%CV	4,6	17,7	20,0
Plasma			
média	6,4	4,7	3,3
DP	0,4	0,5	0,4
%CV	5,8	11,6	12,9
Eritrócitos			
média	36,0	22,2	18,6
DP	1,7	4,9	4,2
%CV	4,6	22,1	22,4

5.2 Estabilidade das atividades das colinesterases

As Figuras numeradas de 3 a 10 revelam as atividades enzimáticas das colinesterases no plasma e em sangue total, determinadas em amostras sem inibição e inibidas "*in vitro*" em 25% e mantidas por um mês em geladeira e em freezer.

Para as amostras sem inibição enzimática, os coeficientes de variação (%CV) obtidos no estudo de estabilidade das enzimas no plasma e em sangue total, foram respectivamente 5,0% e 7,7% em geladeira, e 5,8% e 6,5% em freezer.

Para as amostras inibidas "*in vitro*" em 25%, os coeficientes de variação obtidos para a estabilidade da enzima no plasma e em sangue total, foram respectivamente: 6,1% e 16,7% em geladeira, e de 3,3% e 11,5% em freezer.

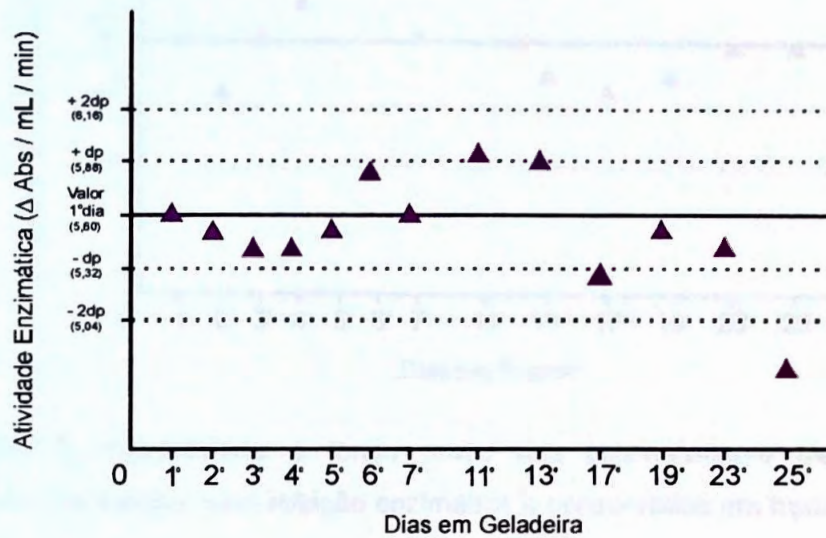


FIGURA 3. Estabilidade a longo prazo das colinesterases plasmáticas em amostras de sangue sem inibição enzimática e conservadas em geladeira.

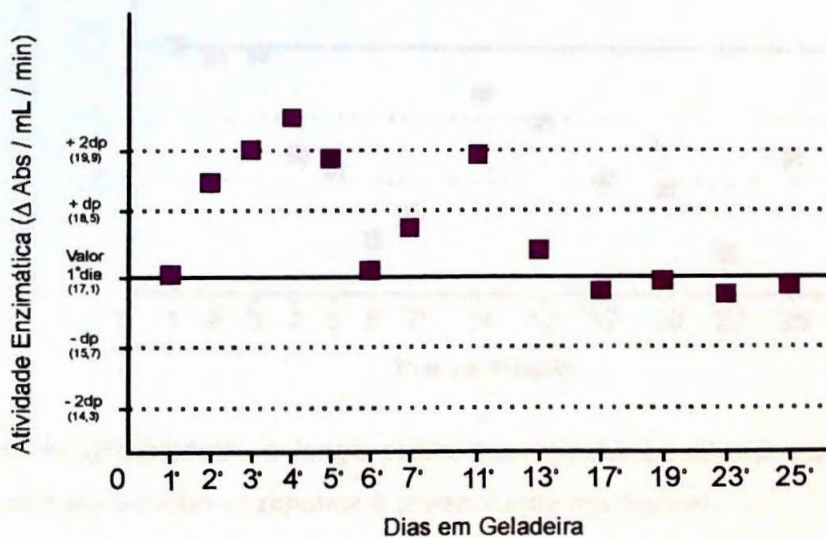


FIGURA 4. Estabilidade a longo prazo das colinesterases em sangue total de amostras sem inibição enzimática e conservadas em geladeira.

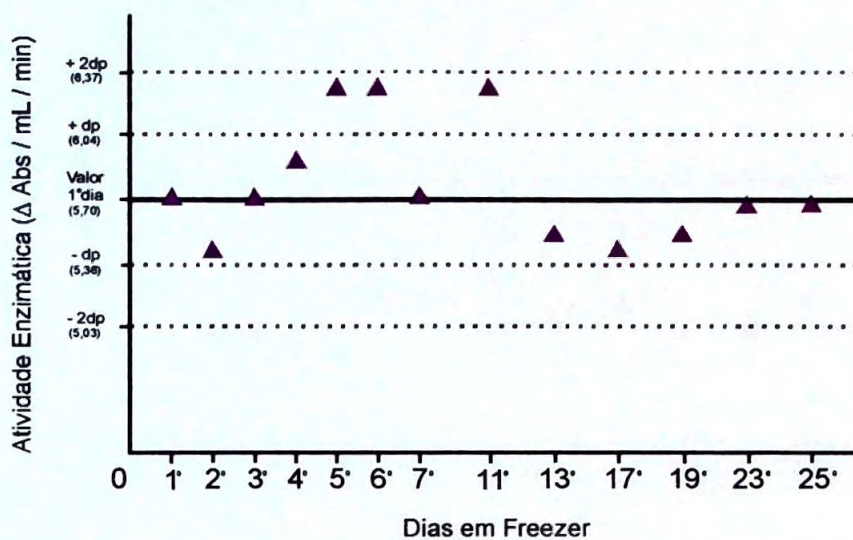


FIGURA 5. Estabilidade a longo prazo das colinesterases plasmáticas em amostras de sangue sem inibição enzimática e conservadas em freezer.

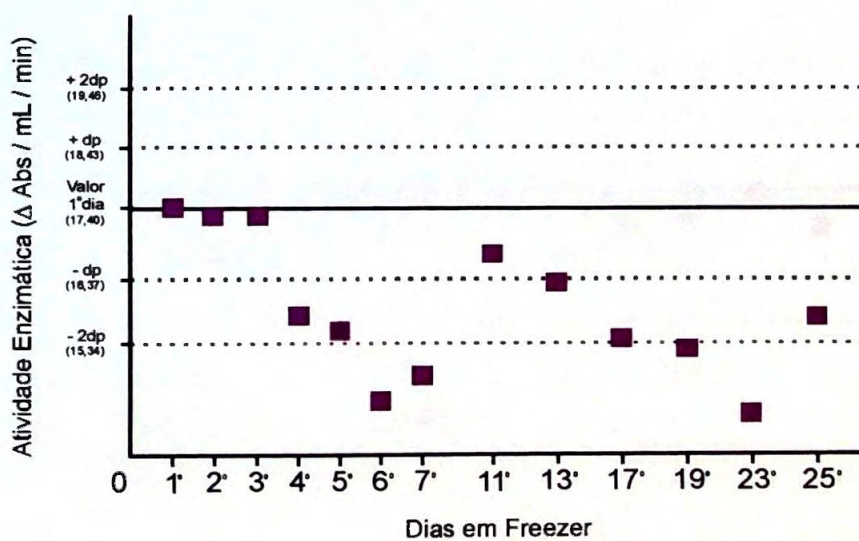


FIGURA 6. Estabilidade a longo prazo das colinesterases em sangue total de amostras sem inibição enzimática e conservadas em freezer.

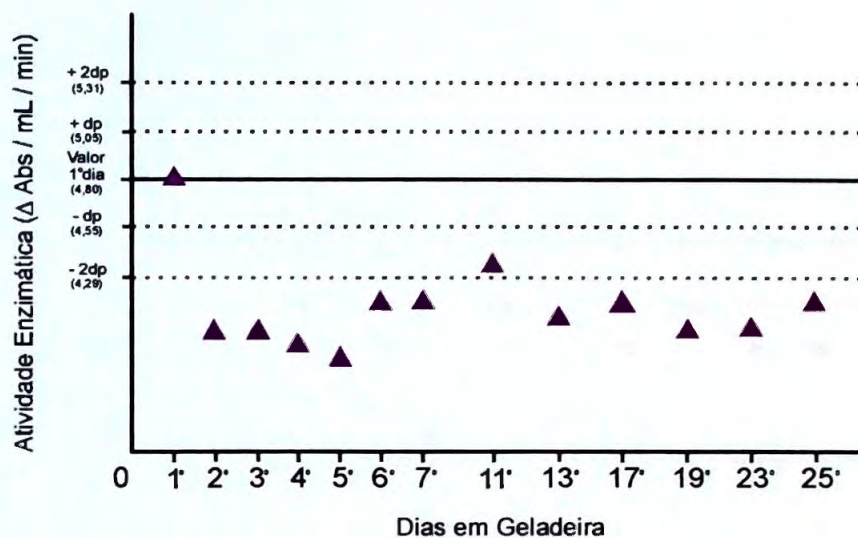


FIGURA 7. Estabilidade a longo prazo das colinesterases plasmáticas em amostras de sangue inibidas *in vitro* em 25% e conservadas em geladeira.

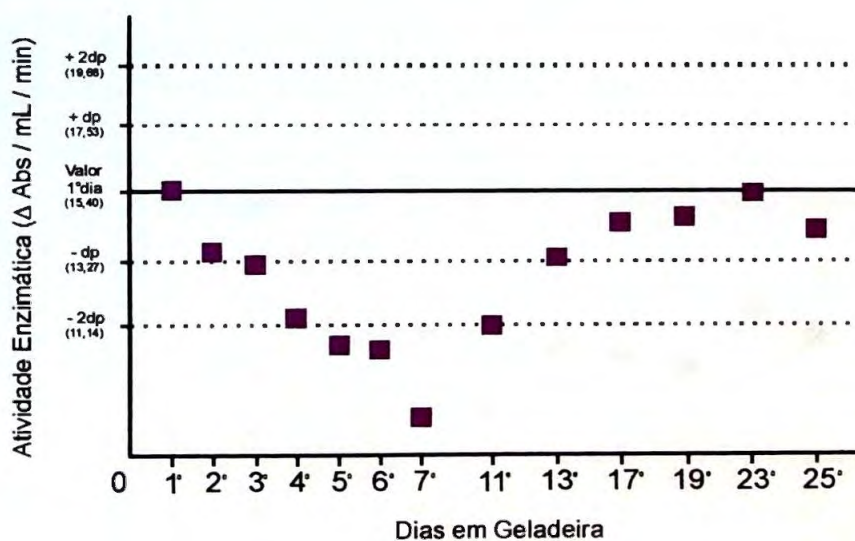


FIGURA 8. Estabilidade a longo prazo das colinesterases em sangue total de amostras inibidas *in vitro* em 25% e conservadas em geladeira.

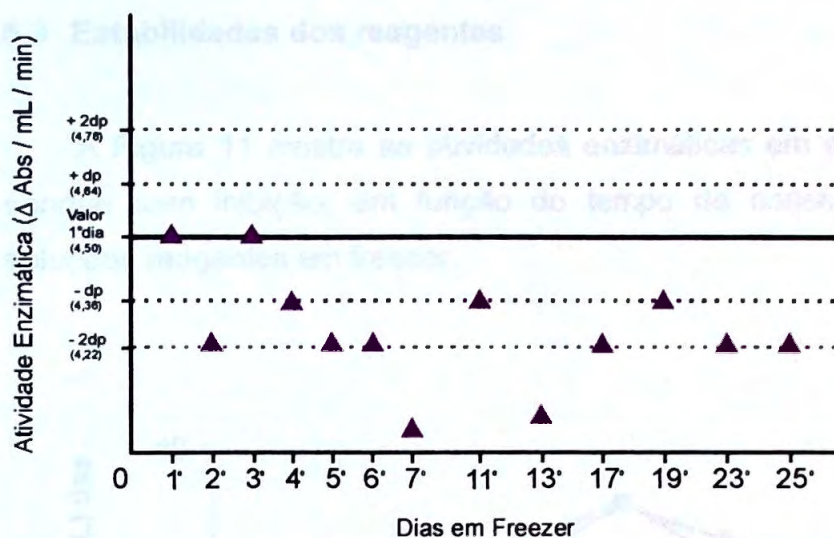


FIGURA 9. Estabilidade a longo prazo das colinesterases plasmáticas em amostras de sangue inibidas *in vitro* em 25% e conservadas em freezer.

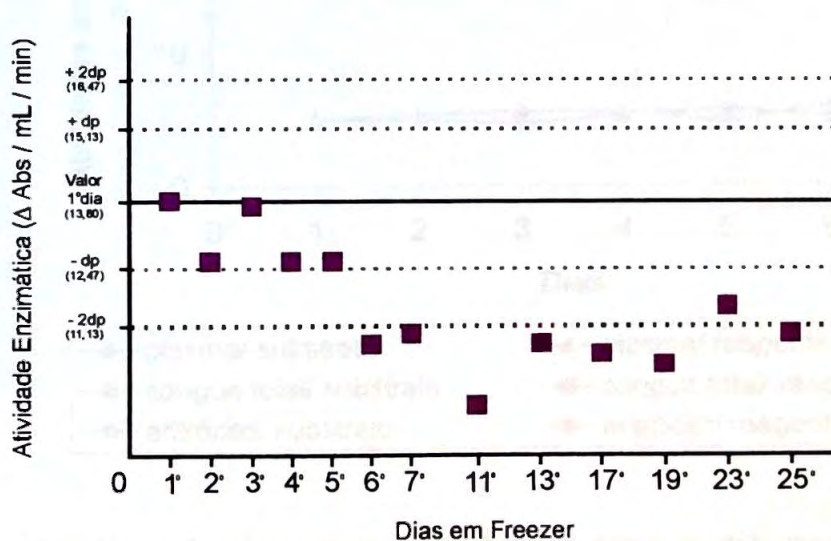


FIGURA 10. Estabilidade a longo prazo das colinesterases em sangue total de amostras inibidas *in vitro* em 25% e conservadas em freezer.

5.3 Estabilidades dos reagentes

A Figura 11 mostra as atividades enzimáticas em amostras de sangue sem inibição, em função do tempo de conservação das soluções reagentes em freezer.

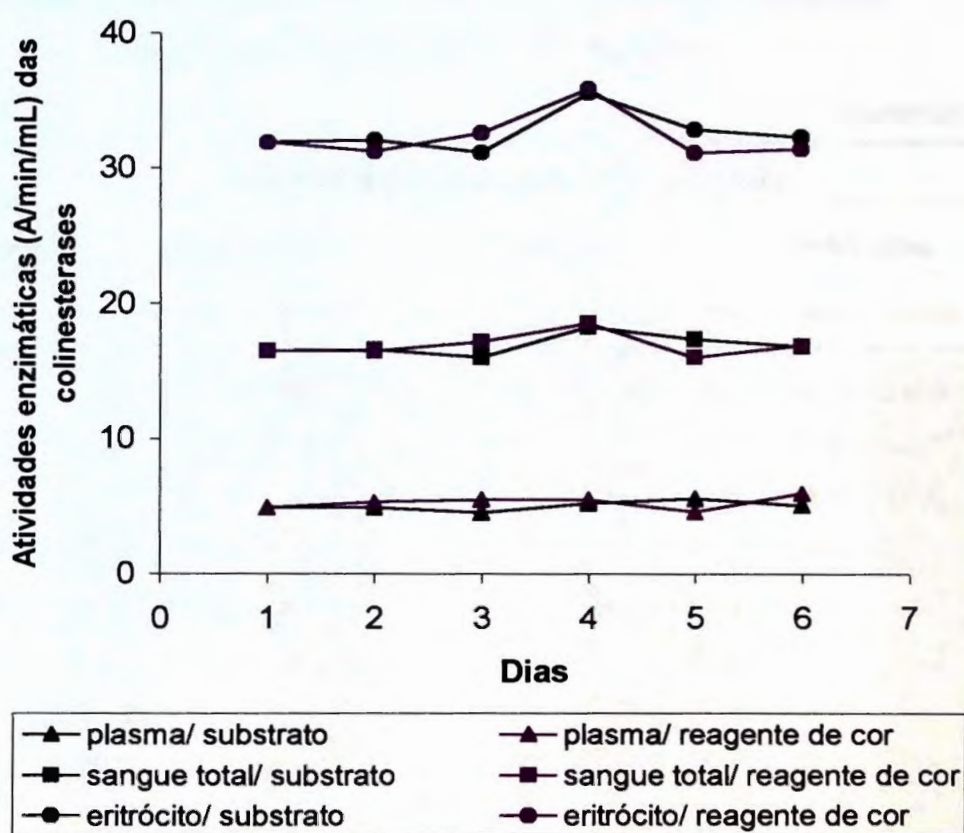


FIGURA 11. Estabilidade das soluções reagentes na determinação das atividades enzimáticas no plasma, em sangue total e eritrócitos.

Os coeficientes de variação (% CV) obtidos foram: 7,3% (plasma) e 4,8% (sangue total) utilizando-se DTNB recém preparado e substrato do primeiro dia de análise e 9,3% (plasma) e 5,2% (sangue total), quando se inverteu a ordem.

5.4 Atividades enzimáticas das colinesterases sangüíneas no grupo de trabalhadores avaliados.

A Tabela 3 mostra as atividades enzimáticas das colinesterases sangüíneas determinadas nos trabalhadores em períodos de pré e pós-exposição ao IOF e as porcentagens de inibição detectadas.

TABELA 3. Determinações das atividades e inibições enzimáticas das colinesterases nos trabalhadores avaliados.

(continua)

Trabalhadores	Atividade enzimática ($\Delta A/ \text{min}/ \text{mL}$)								
	Sangue total			Plasma			Eritrócitos		
	pré	pós	%inib	pré	pós	%inib	pré	pós	%inib
01	27,6	21,0	23,9	8,0	7,0	12,5	51,9	38,5	25,8
02	23,1	19,7	14,7	7,5	7,1	5,3	44,2	37,1	16,1
03	23,0	18,2	20,9	7,5	6,2	17,3	42,0	34,0	19,0
04	26,7	25,5	4,5	5,8	6,0	—	48,8	53,9	—
05	20,6	20,0	2,9	7,5	5,0	33,3	35,0	37,3	—
06	21,0	18,0	14,3	6,1	6,6	—	38,0	31,5	17,1
07	18,4	19,0	—	6,1	6,5	—	30,6	32,0	—
08	19,7	20,3	—	6,8	6,1	10,3	35,2	35,8	—
09	22,0	23,3	—	4,9	5,2	—	42,5	44,0	—
10	26,5	24,0	9,4	8,2	6,0	26,8	44,8	41,0	8,5
11	20,2	21,5	—	6,6	6,8	—	40,7	41,6	—
12	15,9	16,8	—	5,2	5,5	—	28,7	30,1	—
13	23,5	24,2	—	8,6	5,8	32,5	39,9	44,7	—
14	23,1	24,0	—	8,6	6,0	30,2	40,5	49,2	—
15	20,6	21,0	—	7,5	6,5	13,3	34,9	37,2	—
16	22,9	24,7	—	7,5	7,8	—	46,0	47,2	—
17	28,0	25,4	9,3	7,2	5,2	27,7	50,1	46,3	7,6
18	21,3	22,2	—	5,4	5,9	—	40,3	40,5	—

TABELA 3. Determinações das atividades e inibições enzimáticas das colinesterases nos trabalhadores avaliados.

(conclusão)

Trabalhadores	Atividade enzimática ($\Delta A / \text{min} / \text{mL}$)								
	Sangue total			Plasma			Eritrócitos		
	pré	pós	%inib	pré	pós	%inib	pré	pós	%inib
19	19,4	22,0	—	5,9	6,1	—	38,2	43,2	—
20	21,3	25,6	—	8,3	6,0	27,7	39,5	54,9	—
21	18,0	20,7	—	9,1	7,1	21,9	27,6	33,1	—
22	17,7	18,8	—	6,3	6,5	—	32,4	33,7	—
23	22,2	24,1	—	6,6	6,9	—	44,0	44,5	—
24	18,8	21,6	—	7,1	4,5	36,6	36,4	44,4	—
25	21,3	23,8	—	8,9	5,1	42,7	37,3	45,8	—
26	21,8	24,5	—	6,0	5,3	11,6	42,4	48,3	—
27	16,8	20,6	—	6,1	5,8	4,9	30,4	39,7	—
28	27,4	24,5	10,6	7,2	6,0	16,6	52,5	48,2	8,2
29	28,1	20,8	25,9	5,4	4,4	18,5	60,5	44,8	26,0
30	28,3	27,0	4,6	6,1	6,0	1,6	59,3	53,8	9,3
31	21,7	19,3	11,0	7,0	5,9	15,7	37,2	34,5	7,3
32	17,7	23,7	—	5,5	6,0	—	27,4	36,9	—
33	19,6	18,2	7,1	5,6	5,7	—	35,8	32,5	9,2
34	21,0	18,1	13,8	5,9	5,1	13,5	40,0	33,1	17,3
35	24,3	21,3	12,3	6,9	5,4	21,7	46,1	42,2	8,5
36	27,4	22,8	16,8	6,6	6,0	9,0	50,8	39,7	21,9
média	22,1	21,8		6,8	5,9		40,9	41,0	
DP	3,5	2,6		1,1	0,7		8,1	6,7	
% CV	15,7	12,0		16,4	12,4		19,9	16,4	

5.5. Parâmetros bioquímicos e hematológicos no grupo de trabalhadores avaliados

As Figuras 12, 13 e 14 expressam a distribuição dos parâmetros bioquímicos que se mostraram alterados em relação aos valores de referência do método utilizado.

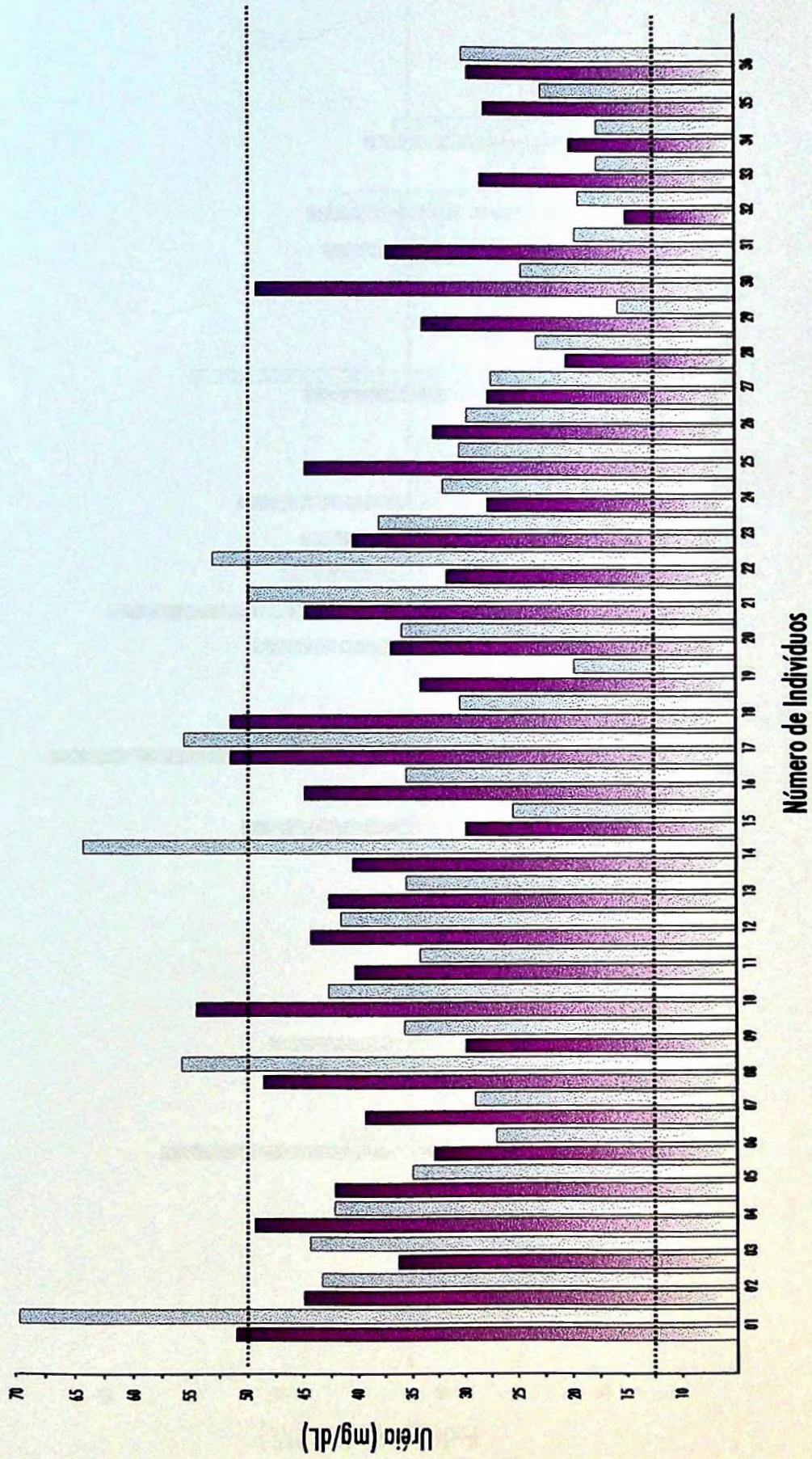


Figura 12. Níveis de uréia em soro de indivíduos expostos.

(valores pré-exposição: ■ e pós-exposição: ■ Valor de referência:)

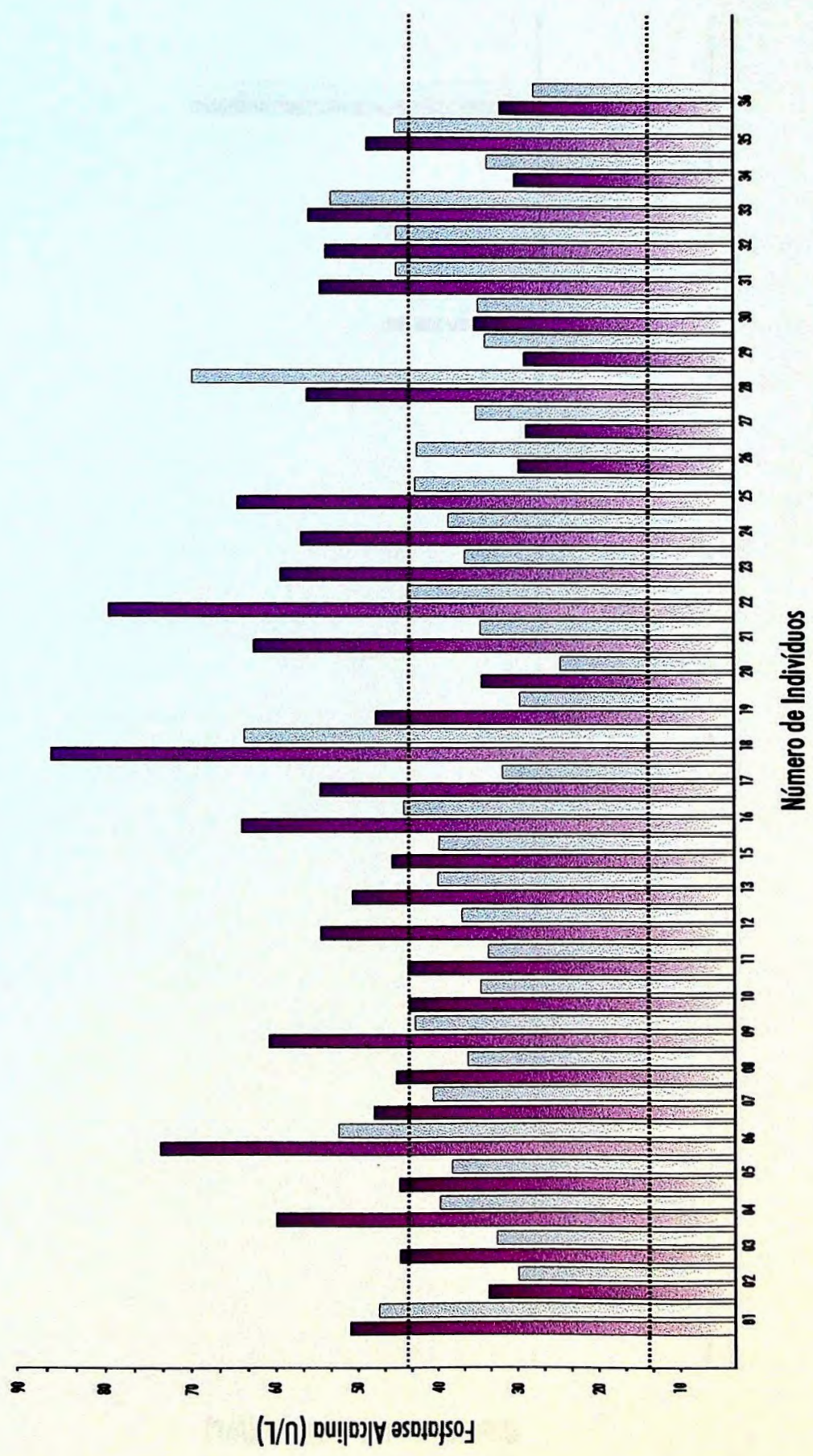


Figura 13. Atividades de fosfatase alcalina em soro de indivíduos expostos.
 (valores pré-exposição: ■ e pós-exposição: ■ Valor de referência:)

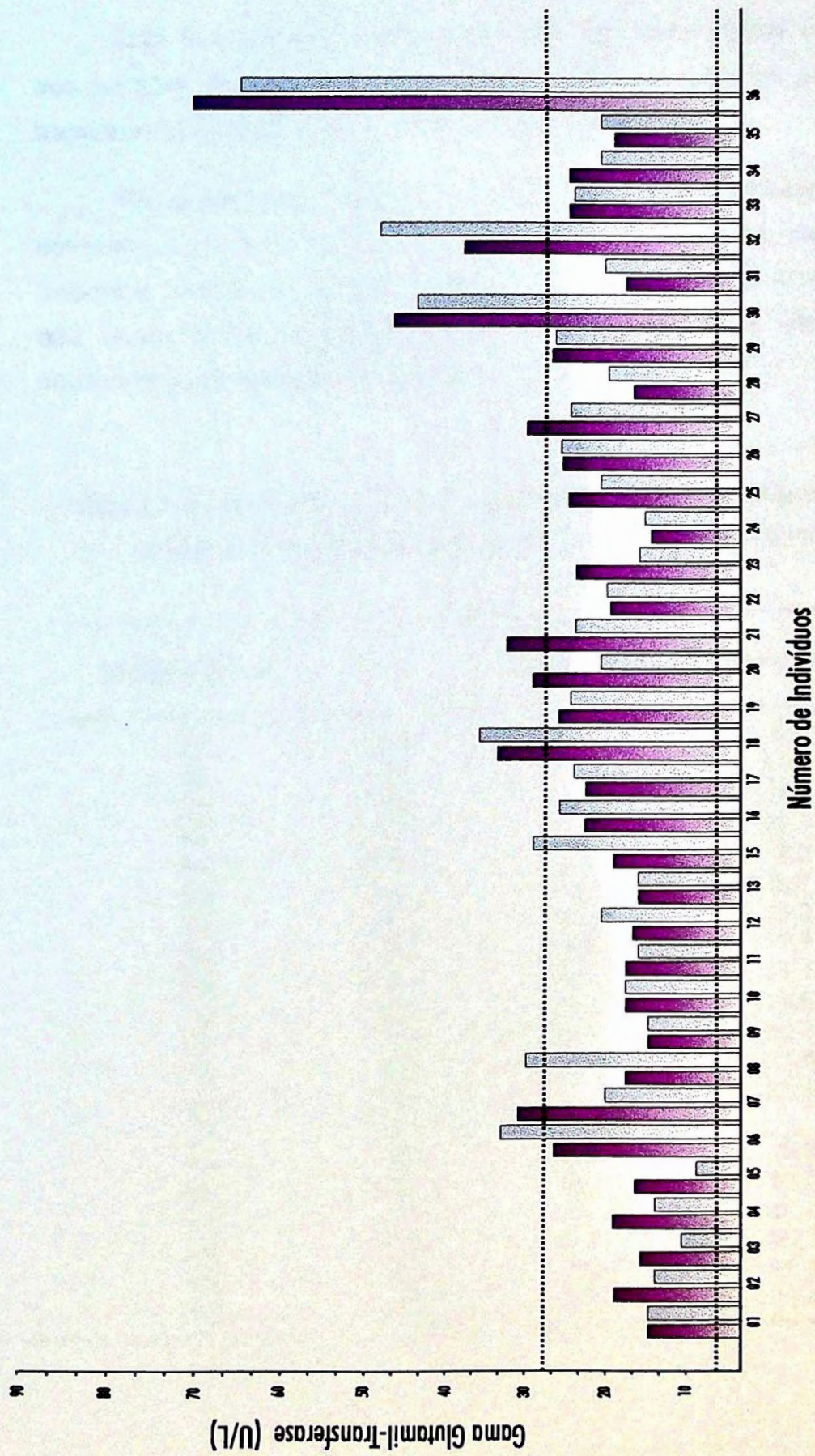


Figura 14. Atividades de gama glutamil-transferase em soro de indivíduos expostos.
 (valores pré-exposição: ■ e pós-exposição: ■ Valor de referência:)

Não foi verificada qualquer alteração nos níveis séricos em relação aos valores de referência dos métodos utilizados para os parâmetros: transaminases (AST e ALT), creatinina e bilirrubina.

Os parâmetros bioquímicos: uréia, gama GT e fosfatase alcalina sofreram variações individuais maiores que 10%, conforme mostrado na Tabela 9, enquanto AST, ALT, creatinina e frações de bilirrubina, além de não terem sofrido variações em relação aos valores de referência, os coeficientes de variação individuais foram menores que 10%.

TABELA 4. Percentual de variação individual dos parâmetros bioquímicos que sofreram maior alteração entre os períodos de pré e pós-exposição.

(continua)

trabalhadores	uréia	gama GT	fosfatase alcalina
01	+32,6	0	-5,8
02	-4,4	-27,8	-11,7
03	+18,9	-31,3	-27,3
04	-14,3	-31,6	-33,3
05	-16,6	-52,4	-13,3
06	-18,2	+18,5	-29,7
07	-28,2	-34,5	-29,3
08	+16,6	+66,6	-17,7
09	+20,0	0	-31,1
10	-20,4	0	-18,6
11	-17,0	-11,1	-23,3
12	-4,5	+23,5	-31,0
13	-16,2	0	-21,5
14	+56,0		
15	-13,3	+52,6	-13,0
16	-28,0	+18,2	-32,8
17	+7,6	+9,0	-41,8
18	-40,4	+9,0	-26,7
19	-41,2	-3,8	-37,5
20	-2,7	-27,6	-31,4

TABELA 4. Porcentual de variação individual dos parâmetros bioquímicos que sofreram maior alteração entre os períodos de pré e pós-exposição.

(conclusão)

trabalhadores	uréia	gama GT	fosfatase alcalina
21	+11,1	-28,1	-43,0
22	+65,6	+5,3	-46,3
23	-7,3	-30,4	-38,3
24	+14,3	+7,1	-31,5
25	-31,1	-12,5	-34,3
26	-9,1	+10,2	+40,9
27	-4,3	-18,7	+24,1
28	+9,0	+21,9	+22,8
29	-53,5	-3,5	+17,2
30	-4,9	-8,2	-2,7
31	-47,8	+12,7	-20,0
32	+26,0	+32,7	-16,6
33	-40,7	-7,8	-8,7
34	-21,0	-14,5	+6,4
35	-19,6	+12,2	-10,2
36	+1,3	-7,6	-12,5

___ quantidade de soro insuficiente para análise

Nenhum parâmetro medido da série vermelha (hemácias, hemoglobina, hematócrito e índices hematimétricos) se mostrou alterado com relação aos valores de referência do método utilizado em análise, assim como com relação aos valores de referência individual (pré-exposição).

Verificou-se após a exposição ao IOF alterações hematológicas com relação aos valores de referência do método utilizado nos seguintes elementos da série branca: leucócitos (11,1%), neutrófilos (16,6%), eosinófilos (55,5%), linfócitos (5,5%) e monócitos (25%).

5.6 Sintomatologia

A Tabela 5 reúne os sintomas relatados pelos trabalhadores através de questionários aplicados após o término da aplicação do inseticida.

TABELA 5. Sintomas relatados pelo grupo de trabalhadores avaliados após a exposição

sintomas	trabalhadores (n=36)	
	n	(%)
náuseas	4	11
irritabilidade	7	19
depressão	7	19
formigamento em pernas e braços	6	17
*mal - estar	17	47
sudorese	18	50
ardência nos olhos, nariz e garganta	7	19

* mal – estar: cansaço excessivo, dor de cabeça, dor muscular, falta de ar e escurecimento da visão.

5.7 Avaliação estatística dos resultados da população

O teste não-paramétrico de Wilcoxon (Wilcoxon Matched Pair Test) foi usado para verificar possíveis diferenças nos dois períodos: pré e pós-exposição para os diversos parâmetros estudados. A avaliação do tipo de distribuição foi feita pelo teste de Shapiro Wilk (W) para as atividades das colinesterases. As correlações entre as atividades dessas enzimas nos diferentes compartimentos do sangue foram obtidas usando-se o coeficiente de correlação de Pearson (r) e o de determinação (r^2).

Os programas utilizados foram: SAS System for Windows. 1999. SAS. SAS Institute Inc., Cary, NC e STATISTICA for Windows. 1996. StatSoft Inc., Tulsa, OK.

A Tabela 6 mostra os resultados do teste para verificar diferenças estatisticamente significativas nas atividades enzimáticas das colinesterases sanguíneas nos períodos de pré e pós-exposição.

As Figuras 15, 16 e 17 representam graficamente os valores medianos, o percentil 25-75% e os valores mínimos e máximos das atividades das colinesterases, respectivamente, em sangue total, plasma e eritrócitos, nos dois períodos avaliados. A distribuição das atividades enzimáticas das colinesterases plasmática e eritrocitária é mostrada nas Figuras 18 e 19 respectivamente.

A Tabela 7 mostra as correlações entre os percentuais de inibição das atividades enzimáticas das colinesterases no sangue, plasma e eritrócitos, agrupadas duas a duas, em trabalhadores que mostraram inibição nas 3 enzimas.

A Tabela 8 denota os resultados do teste para detecção de diferenças significativas entre os diversos parâmetros bioquímicos e hematológicos determinados em períodos de pré e pós-exposição ao IOF.

TABELA 6. Valores de z e significância (Wilcoxon) de atividades das colinesterases sangüíneas entre os períodos de pré e pós-exposição nos trabalhadores que mostraram inibições enzimáticas.

enzima	n	z	p
ChE-T	16	3,5161	0,0004
ChE-P	23	4,1972	0,0000
ChE-E	14	3,2957	0,001

ChE-T = colinesterase em sangue total; ChE-P = colinesterase plasmática;
ChE-E = colinesterase eritrocitária.

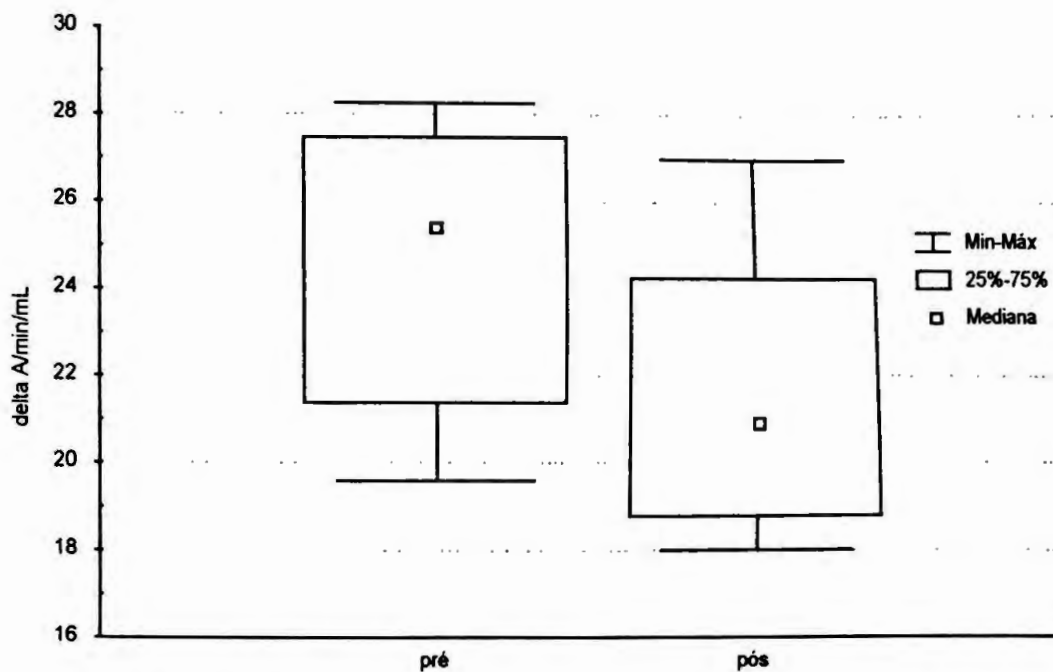


FIGURA 15. Atividades das colinesterases em sangue total nos períodos de pré e de pós-exposição ao inseticida organofosforado.

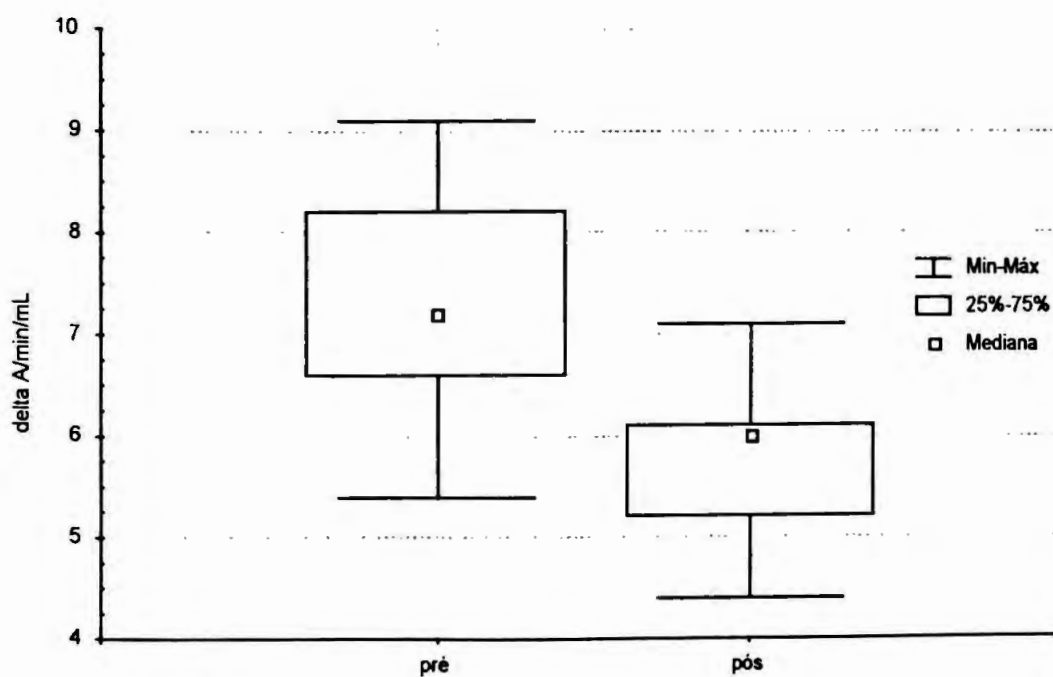


FIGURA 16. Atividades das colinesterases em plasma nos períodos de pré e pós-exposição ao inseticida organofosforado.

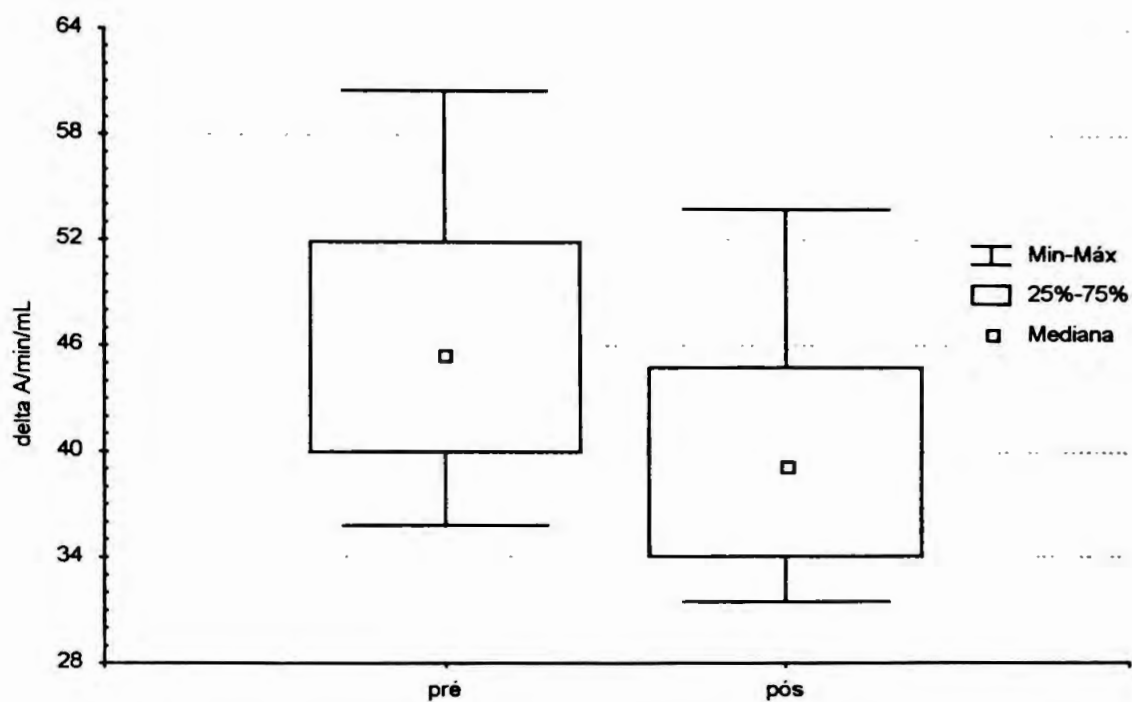


FIGURA 17. Atividades das colinesterases em eritrócitos nos períodos de períodos de pré e pós-exposição ao inseticida organofosforado.

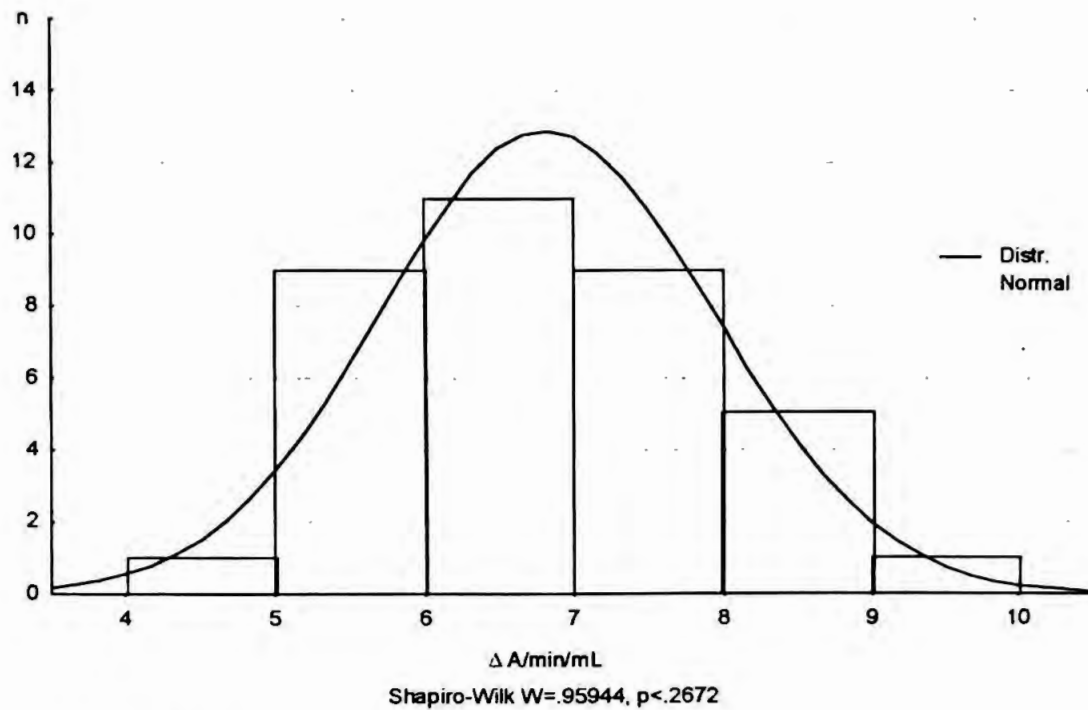


FIGURA 18. Distribuição das atividades enzimáticas das colinesterases plasmáticas nos trabalhadores em período de pré – exposição.

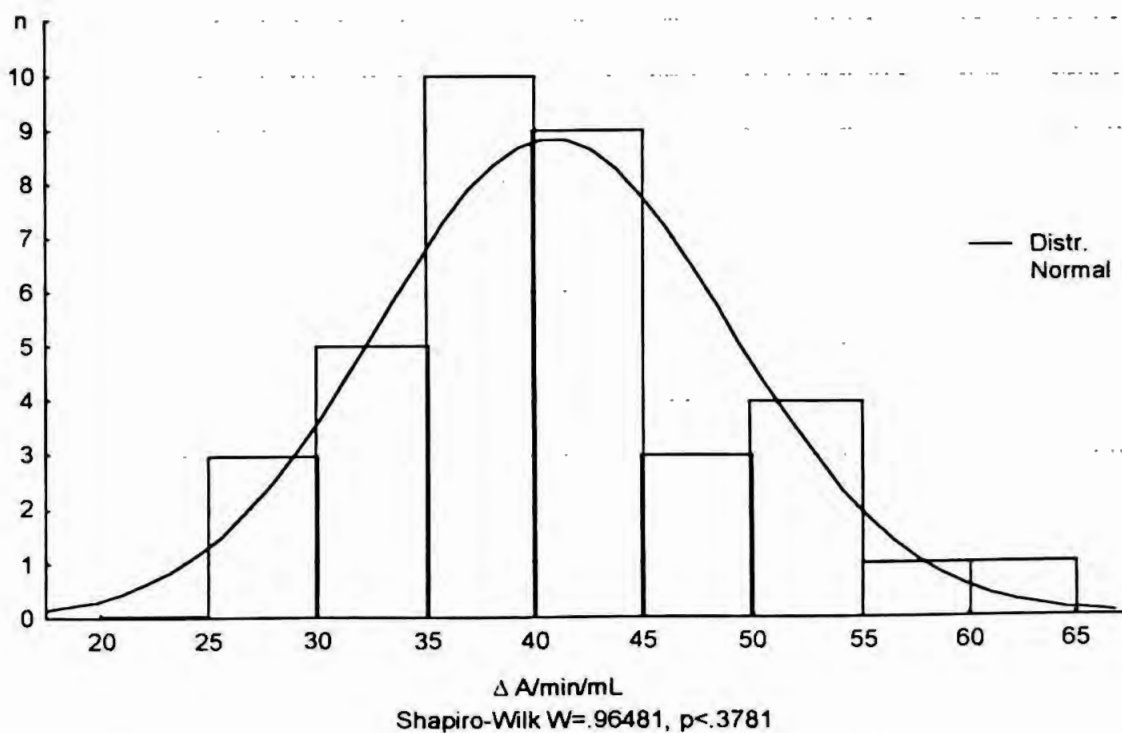


FIGURA 19. Distribuição das atividades enzimáticas das colinesterases eritrocitárias nos trabalhadores em período de pré – exposição.

TABELA 7. Correlação entre as porcentagens de inibição enzimática no plasma (ChE-P), sangue total (ChE-T) e eritrócito (ChE-E) (n=12).

enzimas	r	r²	p
ChE-T X ChE-P	2,7x10 ⁻⁴	7,04x10 ⁻⁸	n.s
ChE-T X ChE-E	0,9044	0,8178	0,00005
ChE-P X ChE-E	-0,2961	0,0877	n.s

n.s = não significativo

TABELA 8. Valores de z e significância (Wilcoxon) de parâmetros bioquímicos e hematológicos nos períodos de pré e pós-exposição dos trabalhadores (n=35)

parâmetros	z	p
uréia	1,963822	0,05
fosfatase alcalina	0,823055	n.s
gama GT	4,160302	0,00003
leucócitos	3,111566	0,0018
neutrófilos	0,049137	n.s
eosinófilos	3,963753	0,00007
basófilos	2,986614	0,0028
linfócitos	4,537023	0,000005
monócitos	1,048265	n.s

n.s = não-significativo; gama GT=gama-glutamilttransferase

A Tabela 9 mostra os resultados do teste para detecção de diferenças significativas entre os diversos parâmetros bioquímicos e hematológicos nos trabalhadores que apresentaram alguma porcentagem de inibição enzimática.

TABELA 9. Valores de z e significância (Wilcoxon) de parâmetros bioquímicos e hematológicos nos períodos de pré e pós-exposição dos trabalhadores que apresentaram inibição nas atividades das colinesterases em sangue total (ChE-T), plasma (ChE-P) e entrócitos (ChE-E).

parâmetros bioquímicos	ChE-T (n=16)		ChE-P (n=23)		ChE-E (n=14)	
	z	p	z	p	z	p
uréia	2,0166	0,0437	1,0645	n.s	1,6635	n.s
fosfatase alcalina	1,4752	n.s	1,1871	n.s	0,7844	n.s
gama GT	2,3786	0,0174	2,3699	0,0178	1,9774	0,048
leucócitos	1,9390	n.s	2,3571	0,0184	1,5066	n.s
neutrófilos	0,2585	n.s	0,1824	n.s	0,0941	n.s
eosinófilos	2,3268	0,0200	3,1631	0,0016	2,2913	0,022
basófilos	1,3522	n.s	2,3411	0,0192	1,2135	n.s
linfócitos	3,4127	0,0006	3,5585	0,0004	3,1702	0,0015
monócitos	2,2751	0,0229	0,2129	n.s	1,7891	n.s

n.s = não significativo; gama GT= gama-glutamilttransferase

6. DISCUSSÃO

São poucos os estudos encontrados na literatura com o objetivo de realizar uma avaliação biológica em indivíduos expostos ocupacionalmente aos inseticidas organofosforados, considerando outros parâmetros, além das colinesterases sangüíneas (WHO, 1975; LEVINE *et al.*, 1986; ÖZTURK *et al.*, 1990; MARONI & FAIT, 1993; GRACE *et al.*, 1999).

Geralmente, trabalhos de monitorização biológica através da determinação das atividades das colinesterases sangüíneas são os mais encontrados, sendo o método espectrofotométrico de ELLMAN *et al.* (1961), com ou sem modificação, o mais indicado.

O método utilizado neste trabalho para determinação das atividades das colinesterases sangüíneas foi o de ELLMAN *et al.* (1961) adaptado por VANDEKAR (1980).

Este método mostra boa precisão, simplicidade, rapidez e facilidade na interpretação dos resultados, dispensando a separação dos eritrócitos e utilizando o sangue total e plasma como amostras, além de baixo custo. Apresenta uma relação direta entre a atividade enzimática e a leitura, ou seja, a intensidade da absorvância é diretamente proporcional à atividade da enzima. Assim, quanto maior a variação de absorvância por minuto, maior é a atividade enzimática.

WOREK *et al.* (1999) relataram que a interferência do conteúdo de hemoglobina em sangue total na absorvância pode ser reduzida ao fazer a leitura em comprimento de onda de 436 nm, diferente de 412 nm preconizado no método original, com maior diluição do sangue e utilizando espectrofotômetro de duplo feixe.

Para otimizar o método amostras de sangue de indivíduos não expostos a inibidores de colinesterases e inibidas "*in vitro*", em cerca de 25 e 50%, foram utilizadas. A inibição enzimática pelo uso do difosfato de cloroquina foi descrita por SILVA (1996), que mostrou ser esta substância

eficiente como inibidor, tanto da acetilcolinesterase eritrocitária quanto da pseudocolinesterase plasmática.

O primeiro passo para a otimização foi o estudo de precisão intra-ensaio na determinação das atividades enzimáticas das colinesterases sangüíneas. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), o método mostrou boa precisão, sendo que as determinações enzimáticas no plasma tiveram o melhor resultado (CV entre 1,4 e 4,0%) com relação às atividades eritrocitárias (CV entre 3,0 e 6,9%).

Quanto à precisão interensaio, considerando os resultados mostrados na Tabela 2, as determinações enzimáticas realizadas em amostras sem inibição mostraram melhor precisão do que as inibidas "*in vitro*". Isso, provavelmente, está relacionado aos problemas de estabilidade da inibição das amostras pelo difosfato de cloroquina e pode não refletir a variabilidade de amostras autênticas com estes níveis de inibição (SILVA, 1996).

OLIVEIRA-SILVA *et al.* (2000), utilizando um método modificado de Ellman's, mostraram coeficientes de variação obtidos em estudos de precisão de: 9,5% e 4,7% (intra-ensaio) e de 3,9% e 6,8% (interensaio) para colinesterase eritrocitária e plasmática respectivamente. MUCH *et al.* (1992), observaram CV de 6,7% e 3,7% em estudos de precisão intra-ensaio para atividades das colinesterases eritrocitária e plasmática e WOREK *et al.* (1999) em ensaios de precisão interensaio relataram CV de 2,9% e 3,4% para atividades enzimáticas em sangue total e plasma, respectivamente.

O estudo de estabilidade a longo prazo das atividades enzimáticas em amostras sem inibição e com 25% de inibição "*in vitro*", e conservadas em geladeira e freezer, foi realizado devido estes dados serem importantes, especialmente, na avaliação de trabalhadores rurais, quando nem sempre é possível processar análises no mesmo dia da coleta do sangue.

A estabilidade a longo prazo foi avaliada pela conservação das amostras em geladeira e em freezer. As atividades das colinesterases

plasmática e em sangue total nas amostras sem inibição se mostraram estáveis, respectivamente, por um período de 21 dias e 3 dias quando conservadas em geladeira e 25 dias e 5 dias quando conservadas em freezer, considerando as variações entre ± 2 dp da média (Figuras 3 a 10).

JUUL (1967) constatou estabilidade em freezer de 8 dias para as atividades eritrocitária e plasmática, enquanto WOREK *et al.* (1999) relataram estabilidade de 27 dias para a eritrocitária e 34 dias para a plasmática.

OLIVEIRA-SILVA *et al.* (2000), quando realizaram estudo de estabilidade das atividades das colinesterases eritrocitária e plasmática em amostras sem inibição e conservadas em freezer durante 28 dias, perceberam que a colinesterase eritrocitária e plasmática eram estáveis por 7 e 3 dias, respectivamente, apresentando um decréscimo contínuo em suas atividades.

As atividades das colinesterases plasmáticas e em sangue total nas amostras com 25% de inibição "*in vitro*" se mostraram estáveis, respectivamente, por um período de 1 e 4 dias quando conservadas em geladeira e 2 e 5 dias quando conservadas em freezer, considerando as variações entre ± 2 dp da média.

Os coeficientes de variação (CV%) obtidos no estudo de estabilidade a longo prazo das colinesterases no plasma e em sangue total, nas amostras de sangue sem inibição enzimática, foram respectivamente: 5,0% e 7,7% em geladeira, e 5,8% e 6,5% em freezer. Já para as amostras inibidas "*in vitro*" em 25%, foram: 6,1% e 16,7% em geladeira e 3,3% e 11,5% em freezer.

Os coeficientes de variação mais elevados do estudo de estabilidade das atividades enzimáticas em sangue total de amostras inibidas, pode ser decorrente de problemas relacionados ao inibidor usado, o difosfato de cloroquina, ou à sua homogeneização com o sangue. A homogeneização foi

feita manualmente, por um período de aproximadamente 3 minutos, devido à possibilidade de hemólise no uso de agitador mecânico.

SILVA (1996) cita a possibilidade da mistura do difosfato de cloroquina com o sangue não se dar de maneira totalmente homogênea, como um dos fatores que pode gerar coeficientes de variação mais altos. O autor relata estabilidade da inibição “*in vitro*” de 25% das colinesterases sangüíneas pelo difosfato de cloroquina por até 8 dias, quando a amostra é armazenada em geladeira.

Alguns autores, como ELLMAN *et al.* (1961) e WOREK *et al.* (1999), recomendam a conservação das soluções reagentes em freezer. Assim, foi feito o estudo de estabilidade destas soluções (substrato e reagente de cor) conservadas em freezer, utilizando amostras de sangue recém-coletadas de um mesmo voluntário não exposto a inibidores de colinesterase.

A forma como foi realizado este estudo, utilizando sempre um dos reagentes recém preparado e o outro preparado no primeiro dia de análise e conservado em freezer, mostrou que a solução reagente do substrato (acetiltiocolina) possui estabilidade ligeiramente maior que o reagente de cor (DTNB) quando conservada por um período de 6 dias (Figura 11). Isso se evidencia através dos respectivos coeficientes de variação obtidos. Quando utilizou-se o mesmo substrato do primeiro dia e DTNB recém preparado, os CVs obtidos foram: 7,3% para plasma e 4,8% para sangue total. Ao ser invertida a ordem, utilizando a mesma solução reagente de cor (DTNB) preparada no primeiro dia com o substrato recém preparado, os CVs obtidos foram: 9,3% e 5,2% para plasma e sangue total, respectivamente.

OLIVEIRA-SILVA *et al.* (2000) relataram estabilidade para solução substrato de acetiltiocolina de 15 dias, quando conservada em freezer (-20°C).

Finalizada a otimização do método foram selecionados os voluntários que forneceriam as amostras para o estudo.

A indústria agropecuária, onde trabalham os indivíduos avaliados nesta pesquisa, teve problemas no passado com a ocorrência de intoxicações por exposição a um organofosforado de elevada toxicidade aguda, comercialmente conhecido como Altomix®. A partir daí, houve interesse por parte desta indústria em realizar anualmente a monitorização biológica por ocasião do uso do praguicida na lavoura de café, além de uma avaliação geral do estado de saúde destes trabalhadores, com o devido acompanhamento do médico da empresa. Também por este motivo, o uso do EPI completo foi exigido e bastante fiscalizado durante a aplicação do Bysiston®.

As interrupções na aplicação do inseticida (2 de 5 dias cada) foram devidas à ocorrência de chuvas abundantes na região, impossibilitando o trabalho nestes períodos. O Bysiston® apresenta 75% de dissulfoton e 15% de triadimenol (fungicida). Não foi encontrado na literatura pesquisada qualquer relato de interação deste fungicida com as colinesterases sangüíneas, assim como, de intoxicação em humanos.

A variabilidade intra-individual das atividades das colinesterases, provavelmente, é a causa da não observação de inibições enzimáticas em parte dos trabalhadores, como também de baixas inibições (Tabela 3).

A variabilidade nas atividades das colinesterases sangüíneas é bem documentada na literatura, sendo maior entre os indivíduos do que no mesmo indivíduo e também maior para a enzima do plasma com relação à do eritrócito (ALCINI *et al.*, 1988; JEYARATNAM & MARONI, 1994; MARONI *et al.*, 2000).

Segundo MARONI *et al.* (2000), os coeficientes de variação interindividual estão por volta de 15-25% para colinesterase plasmática e 10-18% para eritrocitária e os de variação intra-individual, 6% e 3-7%, respectivamente.

Através dos resultados das atividades das colinesterases sangüíneas (Tabela 3), observou-se que a atividade plasmática sofreu maior número de inibições (63,8%), seguida da atividade em sangue total (44,4%) e eritrocitária (38,8%). As inibições detectadas, variaram entre valores de: 4,9%-42,7%; 4,6%-25,9%; e 7,3%-26%, em plasma, sangue total e eritrócitos respectivamente. Logo, pode-se dizer que a atividade plasmática foi o indicador biológico mais sensível na situação de exposição desta pesquisa.

Em um estudo de avaliação de exposição crônica a inseticida organofosforado, SITTERT & DUMAS (1990) relataram que a atividade da colinesterase plasmática foi o indicador biológico de exposição mais sensível. Por outro lado, MC QUEEN (1995) considera a atividade plasmática mais sensível às inibições; porém a atividade da colinesterase eritrocitária é melhor indicador de efeitos nocivos dos IOF em exposições crônicas. CHEN *et al.* (1999) e LOTTI (1995) também concordam que a atividade da colinesterase plasmática pode ser considerada um bom indicador de exposição devido sua sensibilidade à ação dos inseticidas anticolinesterásicos, mas é a atividade da colinesterase eritrocitária que deve ser interpretada como um indicador de efeito.

As inibições enzimáticas detectadas nos trabalhadores estiveram abaixo do IBMP, preconizado no país (BRASIL, 1994), com exceção de uma amostra para o sangue total (Tabela 3). Como mencionado na descrição da população (Quadro 3), os trabalhadores estavam sem exposição prévia aos IOF e usavam corretamente o EPI durante a aplicação do inseticida. Estes fatos, somados à formulação do produto, como granulado, certamente contribuíram para tais resultados (Tabela 3).

LOTTI (1995) relata que quando valores pré-exposição são disponíveis, pequenas porcentagens de inibição na atividade da colinesterase eritrocitária (mínimo de 15%) podem ser consideradas estatisticamente significativas.

Observou-se que entre os 36 trabalhadores avaliados, 7 mostraram inibição da atividade da colinesterase eritrocitária maior que 15%.

Segundo o teste Shapiro-Wilk, as atividades das colinesterases plasmática e eritrocitária possuem uma distribuição normal em período de pré-exposição, conforme mostrado nas Figuras 18 e 19, sendo os coeficientes de variação obtidos neste período (Tabela 3) próximos aos de variação interindividual relatados na literatura (MARONI *et al.*, 2000).

As atividades das colinesterases em sangue total ($p=0,0004$), plasma ($p=0,0000$) e eritrócito ($p=0,0010$) em períodos de pré e pós-exposição, apresentaram significância pelo teste de Wilcoxon para os trabalhadores com alguma porcentagem de inibição enzimática (Tabela 6) e estão representadas pelas Figuras 15, 16 e 17.

A atividade enzimática em sangue total está altamente correlacionada com a atividade eritrocitária, apresentando coeficiente de correlação de Pearson, $r = 0,904362$ ($p = 0,00005$) (Tabela 7).

Segundo VANDEKAR (1980), a colaboração fornecida pela enzima plasmática na atividade total do sangue é pequena. Assim, para um hematócrito de 50%, a colaboração da enzima plasmática não será mais do que 10% da atividade total do sangue, sendo o restante proveniente dos eritrócitos. Portanto, a determinação da atividade enzimática em sangue total reflete, principalmente, a atividade da enzima eritrocitária.

Algumas considerações podem ser feitas com relação aos resultados obtidos nas análises dos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos trabalhadores avaliados, determinados paralelamente às medidas das atividades das colinesterases sangüíneas.

Para avaliar a função hepática foram analisadas em soro as atividades enzimáticas de gama-glutamilttransferase (gama GT), aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina

e frações de bilirrubina. A função renal foi avaliada através da creatinina e uréia em soro.

Os parâmetros que se mostraram alterados em relação aos valores de referência dos métodos utilizados foram a uréia (Figura 12) e os níveis enzimáticos de gama GT (Figura 13) e fosfatase alcalina (Figura 14). Tais parâmetros também foram os que sofreram maior variação intra-individual (Tabela 4).

Foi observado um aumento nos níveis de uréia em 13,8% dos trabalhadores com variação mínima de 7,6% e máxima de 65,6%. Entretanto, como os níveis de creatinina não se mostraram elevados, o aumento de uréia em pequeno número de indivíduos não pode ser considerado um indicador de alteração de função renal.

A diminuição dos níveis de uréia também pode ter significado clínico e ocorreu em 50% dos trabalhadores com variação mínima de 7,3% e máxima de 47,8%. Segundo NOGUEIRA *et al.* (1987) e MILLER (1999), a hiporuremia pode ocorrer na insuficiência hepática grave.

Também foi observado aumento na atividade enzimática de gama GT em 19,4% dos trabalhadores (variando entre 9% e 66%) e de fosfatase alcalina em 13,8% dos voluntários (variando entre 6,4 e 40,9%) (Tabela 4).

Talvez tais alterações sejam reflexo de distúrbios hepáticos provocados pela exposição aos IOF ou outros fatores não identificados.

Não foi encontrada na literatura possíveis causas de redução na atividade enzimática de gama GT. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos da Tabela 4, foi verificado um abaixamento de atividade em 41% dos trabalhadores variando entre 7,6% a 52,4%. A fosfatase alcalina mostrou-se reduzida em 83% dos trabalhadores (variando entre 5,8% a 46,3%) (Tabela 4).

Esta redução na atividade da fosfatase alcalina não deixa de ser importante pois ocorreu na maioria dos trabalhadores (Figura 14) e poderia estar relacionada à uma ação direta do inseticida sobre estas enzimas.

Mesmo sabendo que os IOF não possuem efeito cumulativo, em casos de exposições prolongadas os danos causados no organismo têm sido bastante discutidos.

BULUSU & CHAKRAVARTY (1987) pesquisaram a susceptibilidade hepática à toxicidade dos IOF através da administração subcrônica em ratos sob condições nutricionais variáveis e constataram que baixa dieta proteica agrava os níveis de fosfatases hepáticas.

KALOYANOVA & BATAWI (1991) publicaram estudo, no qual algumas alterações bioquímicas e hematológicas foram consideradas como resultantes de efeitos crônicos decorrentes da exposição aos inseticidas organofosforados. Alterações nas atividades das transaminases, AST e ALT, da fosfatase alcalina e efeitos nefrotóxicos foram relatados.

AGARWAL (1993), através de estudos experimentais em ratos submetidos a exposições prolongadas aos IOF, relatou albuminúria e azotemia (índices elevados de albumina na urina e uréia no sangue), como oriundos dos efeitos nefrotóxicos desses compostos.

GOMES *et al.* (1999), em um outro estudo semelhante, constataram que o aumento dos níveis enzimáticos de AST e ALT, bem como alterações no metabolismo de aminoácidos, podem ser interpretados como sinais de disfunção hepática causada por exposição crônica aos IOF

LAKEW & MEKONNEN (1998) avaliaram trabalhadores rurais expostos ao clorpirifós, um inseticida organofosforado, em períodos de pré e pós-exposição e encontraram redução significativa nas atividades das colinesterases sangüíneas ($p < 0,05$), enquanto que, as atividades de fosfatase alcalina e gama-GT permaneceram dentro dos valores normais.

GOEL *et al.* (2000) detectaram aumento nas atividades de fosfatase alcalina, AST e ALT em soro de ratos tratados com clorpirifós durante 8 semanas.

Quanto aos parâmetros hematológicos, nenhuma alteração foi detectada na série vermelha nos dois períodos de avaliação do grupo com relação aos valores de referência preconizados pela técnica utilizada.

Na contagem específica da série branca, observou-se a presença de algumas alterações entre os trabalhadores após a aplicação do inseticida.

Não foi encontrado na literatura pesquisada, qualquer trabalho sobre a significância para a saúde, com base individual, destas oscilações, uma vez que normalmente tais parâmetros são avaliados uma única vez em laboratório de análises clínicas com a finalidade de auxiliar o diagnóstico clínico.

LEVINE *et al.* (1986), durante a avaliação de um grupo de trabalhadores expostos na produção de inseticidas organofosforados, detectaram diferenças estatisticamente significativas na contagem específica de linfócitos e neutrófilos, mas consideraram essas alterações inconsistentes.

ÖZTÜRK *et al.* (1990) em um estudo de avaliação das intoxicações causadas por IOF, constataram leucocitose e neutrofilia em 43,43% e 71,43% dos pacientes respectivamente. Também constataram proteinúria (16%) e glicosúria (19%) atribuídos aos efeitos nefrotóxicos desses compostos.

KALOYANOVA & BATAWI (1991) relataram leucocitose com neutrofilia e eosinopenia, como alterações hematológicas observadas em intoxicações agudas, além de leucopenia e anemia como efeitos crônicos decorrentes da exposição aos IOF.

AKAY *et al.* (1999), em estudo experimental em ratos, avaliaram os efeitos da combinação de 3 inseticidas organofosforados em parâmetros imunológicos (IgG e IgM) e hematológicos (hemograma) durante 3 meses e meio e constataram aumento e diminuição na contagem dos leucócitos e linfócitos (com as diferentes combinações), aumento dos monócitos e granulócitos e diminuição em IgG e IgM.

Foi realizado o teste de significância de Wilcoxon para os parâmetros bioquímicos e hematológicos em períodos de pré e pós-exposição dos trabalhadores e foi constatada diferença significativa para: uréia ($p=0,0496$), gama GT ($p<0,0003$), leucócitos ($p=0,0018$), eosinófilos ($p<0,00007$), basófilos ($p=0,0028$) e linfócitos ($p<0,000005$) (Tabela 8).

Através do teste de Wilcoxon, pois a maioria das variáveis não possui distribuição normal, os trabalhadores com alguma inibição das colinesterases em sangue total possuem diferença significativa entre os períodos de pré e pós-exposição para: uréia ($p=0,0437$), gama GT ($p=0,0174$), eosinófilos ($p=0,02$), linfócitos ($p=0,0006$) e monócitos ($p=0,0229$). Os trabalhadores que tiveram inibição da enzima no plasma, possuem diferença significativa para: gama GT ($p=0,0178$), leucócitos ($p=0,0184$), eosinófilos ($p=0,0016$), basófilos ($p=0,0192$) e linfócitos ($p=0,0004$). E para aqueles que tiveram a enzima inibida no entrócito, possuem diferença significativa para: gama GT ($p=0,048$), eosinófilos ($p=0,022$) e linfócitos ($p=0,0015$) (Tabela 9).

De acordo com a interpretação estatística dos resultados, entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados, aqueles que apresentaram diferença significativa em todos os trabalhadores, foram gama GT, linfócitos e eosinófilos.

Considerando as informações recolhidas através dos questionários percebe-se a ocorrência de alguns sintomas relacionados ao estado de saúde declarados pelos trabalhadores e apresentados na Tabela 5. Entretanto, não se pode afirmar uma relação causal com a aplicação do

dissulfoton, ainda que antes da exposição não houvesse queixas relativas à saúde.

Segundo a análise estatística realizada em período de pré-exposição (valores de referência individuais) não foi verificada correlação entre as atividades enzimáticas em sangue total, plasma e eritrócitos com as variáveis: idade, tempo do último contato e tempo de trabalho na lavoura ($p > 0,1053$), assim como, com o uso de tabaco ou bebidas alcólicas ($p > 0,2344$).

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- ⇒ O método espectrofotométrico de Ellman modificado e otimizado, mostrou ser rápido, simples e preciso para a análise das colinesterases em sangue.
 - ⇒ As amostras de sangue podem ser conservadas por até 3 dias em geladeira (4°C) ou 5 dias em freezer (-20°C) e as de plasma por 21 dias, em geladeira ou freezer, sem que haja perdas significativas nas respectivas atividades enzimáticas das colinesterases. As soluções do substrato (acetiltiocolina) e do reagente de coloração (DTNB) se mostraram estáveis se conservadas a - 20° C por, no mínimo, 6 dias.
 - ⇒ As colinesterases plasmática e do sangue total de pré exposição (valores de referência individuais) mostraram distribuição Gaussiana e ampla variação interindividual.
 - ⇒ A medida da atividade da pseudocolinesterase plasmática mostrou ser o bioindicador mais sensível na exposição dos trabalhadores ao dissulfoton.
 - ⇒ Houve elevada correlação entre a inibição da enzima no sangue total e no entrócito ($p = 5 \cdot 10^{-5}$), o mesmo não tendo sido observado com relação à do plasma ou entre esta e a eritrocitária. Este fato corrobora a informação da maior representatividade da acetilcolinesterase eritrocitária com relação à pseudocolinesterase plasmática na atividade enzimática total do sangue.
 - ⇒ Dentre os parâmetros bioquímicos avaliados, a uréia e a gama-glutamilttransferase mostraram diferenças estatisticamente significativas em seus valores medidos antes e após a exposição. Apesar da fosfatase alcalina ter se mostrado reduzida em 83% dos trabalhadores, não se
-

pôde estabelecer significância estatística a este achado, provavelmente devido à ampla variabilidade individual dos resultados.

- ⇒ Leucócitos, linfócitos e eosinófilos foram os parâmetros hematológicos que mostraram alterações estatisticamente significativas em seus valores medidos antes e após a exposição ao dissulfoton.
- ⇒ Se forem considerados os parâmetros bioquímicos e hematológicos nos trabalhadores que apresentaram algum grau de inibição enzimática nos três meios (sangue total, plasma e eritrócitos), apenas a gama-glutamyltransferase, os eosinófilos e os linfócitos se mostraram estatisticamente alterados antes e após a exposição ao inseticida.
- ⇒ A exposição dos trabalhadores ao dissulfoton parece ter sido de baixo risco, uma vez que nenhum deles mostrou valor de inibição da acetilcolinesterase eritrocitária superior ao índice biológico máximo permitido no Brasil, de 30%. O significado clínico das alterações bioquímicas e hematológicas verificadas numa base individual, antes e após a exposição, ainda não é claro pois poderiam ser atribuídas ao inseticida ou a outro fator não identificado, seja com base nas informações obtidas através do questionário, ou após exame médico. Entretanto, não podem ser ignoradas e estudos posteriores, em condições controladas, e em diferentes níveis de exposição, poderiam esclarecer o achado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGARWAL, S.B. A clinical, biochemical, neurobehavioral, and sociopsychological study of 190 patients admitted to hospital as a result of acute organophosphorus poisoning. *Environ. Res.*, Orlando, v.62, p.63-70, 1993.
2. AKAY, M.T., OZMEN, G., ELCÜMAN E.A. Effects of combinations of endosulfan, dimethoate and carbaryl on immune and hematological parameters of rats. *Vet. Hum. Toxicol.*, Manhattan, v.41, n.5, p.296-299, 1999.
3. ALCINI, D., MARONI, M., COLOMBI, A., XAIZ, D., FOÀ, V. Valutazione di un metodo standardizzato su base europea per la determinazione della colinesterasi plasmatica ed eritrocitaria. *Med. Lav.*, Fidenza, v.79, n.1, p.42-53, 1988.
4. ANWAR, W.A. Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environ. Health Perspect.*, Research Triangle Park, v.105, n.4, p.801-806, 1997.
5. APREA, C., SCIARRA, G., ORSI, D., BOCCALON, P., SARTORELLI, P., SARTORELLI, E. Urinary excretion of alkylphosphates in the general population (Italy). *Sci. Total Environ.*, Shannon, v.177, p.37-41, 1996.
6. APREA, C., SCIARRA, G., SARTORELLI, P., DESIDERI, E., AMATI, R., SARTORELLI, E. Biological monitoring of exposure to organophosphorus insecticides by assay of urinary alkylphosphates: influence of protective measures during manual operations with treated plants. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.66, p.333-338, 1994.

De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (Cassi), 2002

7. BOLOGNESI, C., BONASSI, S., MERLO, F., PARRINI, M., REGGIARDO, G. Biomonitoring of workers exposed to pesticides. *Int. Arch. Occup. Health*, Berlin, v. 65, p. 185-187, 1993.
 8. BRASIL. Portaria n.24, de 29 de dezembro de 1994. NR-7-Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho. *Diário Oficial da União*, Brasília, n.248, 30 dez. 1994. Seção 1, p.21.278-21.279.
 9. BULL, D., HATHAWAY, D. Envenenamento Acidental e Profissional. In: __. *Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo*. Petrópolis: Vozes Ltda, 1986. cap.4, p. 39-57.
 10. BULUSU, S., CHAKRAVARTY, I. Effect of subacute administration of three organophosphorus pesticides on the hepatic phosphatases under various nutritional conditions. *Environ. Res.*, Orlando, v.44, n.1, p.126-135, 1987.
 11. CARPIO, F., COLE, D.C., JULIAN, J., LÉON, N. Assessment of peripheral nerve function in an Ecuadorian rural population exposed to pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health*, Washington, v.55, n.2, p.77-91, 1998.
 12. CARVALHO, W.F. *Técnicas médicas de hematologia e imunohematologia*. 6 ed. Belo Horizonte: Coopmed, 1994. 342p.
 13. CHEN, W.L., SHEETS, J.J., NOLAN, R.J., MATTSSON, J.L. Human red blood cell acetylcholinesterase inhibition as the appropriate and conservative surrogate endpoint for establishing chlorpyrifos reference dose. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, Orlando, v. 29, n.1, p.15-22, 1999.
 14. COLOSIO, C., CORSINI, E., BARCELLINI, W., MARONI, M. Immune parameters in biological monitoring of pesticide exposure: current knowledge and perspectives. *Toxicol. Lett.*, Shannon, v.108, p.285-295, 1999.
-

15. COYE, M. J., LOWE, J. A., MADDY, K.T. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides: I. Cholinesterase activity determinations. *J. Occup. Med.*, Chicago, v.28, n.8, p.619-627, 1986b.
 16. COYE, M.J., BARNETT, P.G., MIDTLING, J.E., VELASCO, A.R., ROMERO, P., CLMENTS, C.L., O'MALLEY, M.A., TOBIN, M.W., LOWRY, L. Clinical confirmation of organophosphate poisoning of agricultural workers. *Am. J. Med.*, New York, v.10, p.399-409, 1986.
 17. DURHAM, W.F., WOLFE, H.R. Measurement of the exposure of workers to pesticides. *Bull. W.H.O.*, Geneva, v.26, p.75-91, 1962.
 18. ECOBICHON, D.J. Toxic effects of pesticides. In: AMDUR, M.O., DOULL, J., KLASSEN, C.D. *Cassarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons*. 5.ed. New York: Pergamon Press, 1996. p.643-689.
 19. ECOBICHON, D.J. Introduction. In: __, ed. *Occupational hazards of pesticide exposure: sampling, monitoring, measuring*. Philadelphia: Taylor & Francis, 1998. cap.1, p.1-7.
 20. ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRS, V., FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v. 7, p. 88-95, 1961.
 21. EYER, P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds: a review. *Hum. Exp. Toxicol.*, London, v.14, p.857-864, 1995.
 22. FELDMAN, R.J., MAIBACH, H.I. Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Orlando, v.28, p.126-132, 1974.
 23. FRANKLIN, C. A., FENSKE, R.A., GREENHALGH, R., MATHIEU, L., DENLEY, H.V., LEFFINGWELL, J.J., SPEAR, R.C. Correlation of urinary pesticide metabolite excretion with estimated dermal contact in
-

- the course of occupational exposure to guthion. *J. Toxicol. and Environ. Health*, Washington, v.1, p.715-731, 1981.
- 24.FUTAGAMI, K., OTSUBO, K., NAKAO, Y., AYOMA, T., IIMORI, E., URAKAMI, S., IDE, M., OISHI, R. Acute organophosphate poisoning after disulfoton ingestion. *Clin. Toxicol.*, New York, v.33, n. 2, p.151-155, 1995.
- 25.FUKUTO, T.R. Relationships between the structure of organophosphorus compounds and their activity as acetylcholinesterase Inhibitors. *Bull. W.H.O.*, Geneva, v.44, p.31-42, 1971.
- 26.GOEL, A., CHAUHAN, D.P., DHAWAN, D.K. Protective effects of zinc in clorpyrifos induced hepatotoxicity: a biochemical and trace elemental study. *Biol. Trace Elem. Res.*, Totowa, v.74, n.2, p.171-183, 2000.
- 27.GOMES, J., DAWWOUD, A.H., LLOYD, O., REVITT, D.M., ANILAL, S.V. Hepatic injury and disturbed amino acid metabolism in mice following prolonged exposure to organophosphorus pesticides. *Hum. Exp. Toxicol.*, London, v.18, p.33-37, 1999.
- 28.GRACE, J.A., MITOKO, A., KROMHOUT, H., KARUMBA, P.N., BOLEIJ, J.S.M. Identification of determinants of pesticide exposure among kenyan agricultural workers using empirical modelling. *Ann. Occup. Hyg.*, Oxford, v.43, n.8, p.519-525, 1999.
- 29.HAWKINS, N.C., NORWOOD, S.K., ROCHR, J.C. Monitoring. In: *_. A strategy for occupational exposure assessment*. Akron: American Industrial Hygiene Association, 1991. cap.4, p.41-52.
- 30.HAYES, W. J. J. Studies on exposure during the use of anticholinesterase pesticides. *Bull. W.H.O.*, Geneva, v. 44, p.277-288, 1971.
-

- 31.HAYES, A. L., WEIR, F.W., WISE, R. A. Assessment of occupational exposure to organophosphate in pest control operators. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Chicago, v.41, n.8/80, p.568-575, 1980.
- 32.HENRY, G.C. Exterminators. In: GREENBERG, M.I., HAMILTON, R.J., PHILLIPS, S.D., eds. Occupational, industrial, and environmental toxicology. Saint Louis: Mosby, 1997.p.101-104.
- 33.JEYARATNAM, J., MARONI, M. Organophosphorus compounds. *Toxicology*, Oxford, v.91, p.15-27, 1994.
- 34.JOHN SHAFFNER,M.D., FENTON SCHAFFNER, M.D. – Avaliação das condições do fígado. In: HENRY, J.B.M.D. *Diagnósticos clínicos & tratamento por métodos laboratoriais*. 18.ed. São Paulo: Manole Ltda, 1995. cap.12, p.261-285.
- 35.JOHNSON, M.K. Contemporary issues in toxicology: organophosphates and delayed neuropathy – Is NTE alive and well?. *Toxicol. App. Pharmacol.*, Orlando, v.102, p.385-399, 1990.
- 36.JUUL, P. Stability of plasma enzymes during storage. *Clin. Chem.*, Washington, v.13, n.5, p.417-422, 1967.
- 37.KALOYANOVA, F.P., EL BATAWI, M.A. Organophosphorus compounds. In:_. EL BATAWI, M.A., KALOYANOVA, F.P. *Human toxicology of pesticides*. Florida: CRC Press, 1991. cap.2, p.3-41.
- 38.KARR, C., DEMERS, P., COSTA, L.G., DANIELL, W.E., BARNHART, S., MILLER, M., GALLAGHER, G., HORSTMAN, S.W., EATON, D., ROSENSTOCK, L. Organophosphate pesticide exposure in a group of washington state orchard applicators. *Environ. Res.*, Orlando, v.59, p. 229-237, 1992.
- 39.KERBAUY, J., MIEZA, M.A. Interpretação clínica do hemograma. In: GUIMARÃES, R.X., GUERRA, C.C.C, eds. *Clínica e laboratório*:
-

Interpretação clínica das provas laboratoriais. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 1990. cap.6, p.273-296.

- 40.KOPLOVITZ, I., YOUNG, G.D. Acute toxicity of cyclohexylmethylphosphonofluoridato (CMPF) in rhesus monkeys: serum biochemical and hematologic changes. *Arch. Toxicol.*, Berlin, v.69, p.379-383, 1995.
- 41.KRIEGER, R.I. Biomonitoring human pesticide exposures. In: ECOBICHON, D.J. *Occupational hazards of pesticide exposure: sampling, monitoring, measuring*. Philadelphia: Taylor & Francis, 1998. cap.7, p.187-206.
- 42.KÜHN, H.A, LIEHR, H., RICHTER, E. Fígado. In: KÜHN, H.A., LASCH, H.-G. *Avaliação clínica e funcional do doente: coração, regulação circulatória, sistema vascular*. São Paulo: EDUSP, 1977. V.3, p.49-99.
- 43.LAKEW, K., MEKONNEN, Y. The health status of northern Omo State Farm workwers exposed chlorpyrifos and profenofos. *Ethiop. Med. J.*, Addis Ababa, v.36, n.3, p.175-184, 1998.
- 44.LARINI, L. Inseticidas. In: *Toxicologia*. 3.ed. São Paulo: Manole Ltda, 1997. cap.6, p.145-187.
- 45.LEVINE, M., FOX, N.L., THOMPSON, B., TAYLOR, W., DARLINGTON, A.C., HOEDEN, J., EMMETT, E.A., RUTTEN, W. Inhibition of esterase activity and na undercouting of circulating monocytes in a population of production workers. *J. Occup. Med.*, Chicago, v. 28, n.3, 1986.
- 46.LOTTI, M. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin. Chem.*, Washington, v.4, p. 1814-1818, 1995.
- 47.LU, Y., LU, P.K., XUE, S., GU, X. Investigation on the chronics effects of dipterex in occupational exposure. *Med. Lav.*, Fidenza, v.75, n.5, p. 376-384, 1984.
-

- 48.MARONI, M., COLOSIO, C., FERIOLI, A., FAIT, A. Organophosphorus pesticides. *Toxicology*, Oxford, v.143, p.9-37, 2000.
- 49.MARONI, M., FAIT, A. Health effects in man from long-term exposure to pesticides: a review of the 1975-1991 literature. *Toxicology*, Oxford, v.78, 1993.
- 50.MARONI, M., FAIT, A. Risk assessment and health surveillance of pesticide workers. *Med. Lav.*, Fidenza, v.89, n.2,p.81-90, 1998.
- 51.MAZON, R., KATO, M., AZEVEDO, F.A., DELLA ROSA, H.V., LEYTON, V. Análise toxicológica de trabalhadores expostos a Inseticidas. *SOS, Saúde Ocup. Segur.*, São Paulo, v.17, n.6, p.250-254, 1982.
- 52.MCQUEEN, M.J. Clinical and analytical considerations in the utilization of cholinesterase measurements. *Clin. Chim. Acta*, Oxford, v.23, p.91-105, 1995.
- 53.MÍDIO, A.F, SILVA, E.S. *Inseticidas-acaricidas organofosforados e carbamatos*. São Paulo: Roca Ltda, 1995. 84p.
- 54.MILLER, O. *Laboratório para o clínico*. 8.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 607p.
- 55.MOATO, T.F., LU, C., FENSKE, R.A., HAHNE, R.M.A.,KALMAN, D.A. Improved cleanup and determination of dialkyl phosphates in the urine of children exposed to organophosphorus insecticides. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.23, p.230-236, 1999.
- 56.MORITA, S.M., XAVIER, O.G., MORRONE, L.C., ALI, S.A., NAKAMURA, K., ZAIA, P.A. Intoxicação por inseticidas organofosforados. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, São Paulo, v.7, n.28, p.70-72, 1979.
- 57.MUTCH, P., BLAIN, P.G., WILLIAMS, F.M. Interindividual variations in enzymes controlling organophosphate toxicity in man. *Hum. Exp. Toxicol.*, London, v.11, p.109-116, 1992

58. NAMERA, A., UTSUMI, Y., YASHIKI, M., OTHANI, M., IMAMURA, T., KOJIMA, T. Direct colorimetric method for determination of organophosphates in human urine. *Cin. Chim. Acta*, Oxford, v.291, p.9-18, 2000.
59. NAMBA, T. Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects. *Bull. W.H.O.*, Geneva, v.44, p.289-307, 1971.
60. NOGUEIRA, D.M, STRUFALDI, B., HIRATA, M.H., ABDALLA, D.S.P., HIRATA, R.D.C. Métodos de Bioquímica Clínica: Técnica e Interpretação. 3.ed. São Paulo: Pancast, 1990. 467p.
61. OLIVEIRA-SILVA, J.J., ALVES, S.R., MEYER, A., PEREZ, F., SARCINELLI, P.N., MATTOS, R.C., FERREIRA, M.F.A., CUNHA, J.C., MOREIRA, J.C. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: na improvement to the occupational monitoring in developing countries. *Hum. Exp. Toxicol.*, London, v.19, p.173-177, 2000.
62. OLIVEIRA-SILVA, J.J., ALVES, S.R., MEYER, A., PEREZ, F., SARCINELLI, P.N., MATTOS, R.C.O.C., MOREIRA, J.C. Influência de fatores sócio-econômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.35, nº2, p.130-135, 2001.
63. ÖZTÜRK, M.A., KELESTIMUR, F., KURTOGLU, S., GÜVEN, K., ARSLAN, D. Anticholinesterase poisoning in Turkey: clinical, laboratory and radiologic evaluation of 269 cases. *Hum. Exp. Toxicol.*, London, v.9, p.273-279, 1990.
64. PASCHOAL, A.D. Introdução. In:_. *Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções*. Rio de Janeiro: Fundação Getulio Vargas, 1979. cap.1, p.1-89.

- 65.QUE HEE, S.S. Biological monitoring and pesticides. In: *Biological Monitoring: an introduction*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. cap.22, p.488-493.
- 66.RUSSI, J.C. Moléstias profissionais na agricultura. *SOS, Saúde Ocup. Segur.*, São Paulo, v.9, n.2, p.51-56, 1974.
- 67.SHAFIK, M.T., BRADWAY,D., ENOS, H.F. A cleanup procedure for determination of low levels of alkyl phosphates, thiophosphates, and dithiophosphates in rat and human urine. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v. 19, p. 885-889, 1971.
- 68.SHAFIC, T.M, BRADWAY, D.E., ENOS, H.E., YOBS, A.R. Human exposure to organophosphorus pesticides: a modified procedure for the gas-liquid chromatographic analysis of alkylphosphate metabolites in urine. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v.21, n.4, p.625, 1973.
- 69.SILVA, E.S. Determinação da atividade de colinesterases sanguíneas por três métodos: correspondência entre suas unidades. São Paulo, 1996.103p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- 70.SILVA, E.S., MÍDIO, A.F., GARCIA, E.G. – A field method for the determination of whole blood cholinesterase. *Med. Lav., Fidenza*, v.85, n.3, p. 249-254, 1994.
- 71.SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/index.php3>. Acesso em em: 14 ago. 2001.
- 72.SINGH, A.K., HEWESTSON, D.W., JORDON, K.C., ASHRAF, M. Analysis of organophosphorus by selective ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrometogr.*, Amsterdam, v.369, p.83-96, 1986.

73. SITTERT, N.J.V., DUMAS, E.P. Field study on exposure and health effects of an organophosphate pesticide for maintaining registration in the Philippines. *Med. Lav., Fidenza*, v.81, n.6, p.463-473, 1990.
74. TEIXEIRA, F. **Utilização de pesticidas agrícolas**. Lisboa: Instituto de Desenvolvimento e Inspeção das Condições de Trabalho, 1998, 23p.
75. TORDOIR, W.F., MARONI, M. Basic concepts in the occupational health management of pesticide workers. *Toxicology*, Oxford, v.91, p.5-14, 1994.
76. UNITED NATIONS. Environmental Programme, WORLD HEALTH ORGANIZATION, INTERNATIONAL PROGRAMME CHEMICAL SAFETY. *Organophosphorus Insecticides: a general Introduction*. Geneva: WHO, 1986. 181p. (Environmental Health Criteria, 63).
77. VALE, J.A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphate insecticide poisoning. *Toxicol. Lett.*, Shannon, v.95, n.1, p.35, 1998.
78. VANDEKAR, M. Minimizing occupational exposure to pesticides: cholinesterase determination and organophosphorus poisoning. *Residue Rev.*, New York, v.75, p.67-80, 1980.
79. VIDAL, J.L.M., ARREBOLA, F.J., GUTIÉRREZ, A.F., RAMS, M.A. Determination of endosulfan and its metabolites in human urine using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.719, p.71-78, 1998.
80. WALKER, C.H. Biochemical responses as indicators of toxic effects of chemicals in ecosystems. *Toxicol. Lett.*, Shannon, v.64/65, p.527-533, 1992.
81. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Early Detection of health impairment in occupational exposure to health hazards*. Geneva: WHO, 1975. 78p. (Technical Reports Series, n.571)
-

82. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Scientific Group on the Chemical and Biochemical Methodology for the Assessment of Hazards of Pesticides for Man. *Chemical and biochemical methodology for the assessment of hazards of pesticides for man: report of a WHO Scientific Group*. Geneva: WHO, 1974. 26p. (World Health Organization Technical Report Series, n.560).
83. WOLFE, H.R., DURHAM, W.F., ARMSTRONG, J.F. Exposure of workers to pesticides. *Arch. Environ. Health*, Washington, v.14, p.622 –633, 1967.
84. WOLFE, H.R., STAIFF, D.C., ARMSTRONG, J.C. Exposure of pesticide formulating plant workers to parathion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, New York, v.20, p.340-343, 1978.
85. WONG, A., DUARTE, J.G. Organophosphate poisoning in Brazil. *Hum. Exp. Toxicol.*, London, v.15, p.71-80, 1996.
86. WOREK, F., MAST, U., KIDERLEN, D., DIEPOLD, C., EYER, P. Improved determination of acetylcholinesterase in human whole blood. *Clin. Chim. Acta*, Oxford, v.288, p.73-90, 1999.
87. WRIGHT, C., SABINE, J.C. Cholinesterase of human erythrocytes and plasma and their inhibition by antimalarial drugs. *J. Pharmacol.*, Paris, v.93, p.230-239, 1984.
88. YASHIKI, M., KOSIMA, T., OHTANI, M., CHIKASUE, F., MIYAZAKI, T. Determination of disulfoton and its metabolites in the body fluids of a dy-syston intoxication case. *Forensic Sci. Int.*, Shannon, v.48, p.145-154, 1990.
89. YOUNG, A. L. Minimizing the risk associated with pesticide use: an overview. In: RAGSDALE, N.N., KUHR, R.J., eds. *Pesticides: minimizing the risks*. Washington: American Chemical Society, 1987.p.1-11. (ACS Symposium series, 0097-6156, 336). (developed
-

from a symposium sponsored by the Division of Agrochemicals at the 191st Meeting of the American Chemical Society).

- 90.ZUCHI, P.S. Intoxicações por agrotóxicos organofosforados no Estado de Minas Gerais. *Ver. CIPA*, São Paulo, v.17, n.193, p.81-87, Dezembro, 1995.

9. ANEXOS

Anexo I

PROTOCOLO TOXICOLÓGICO – período de pré - exposição N°

A) DADOS SOBRE AMOSTRAGEM

Data da coleta:

Hora da Coleta:

Volume de sangue coletado:

B) INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome:

Idade:

Endereço:

Local de Trabalho atual:

C) SOBRE SEU TRABALHO

1) Quantas horas trabalha por dia ?

.....

2) Há quanto tempo trabalha na lavoura?

.....

3) Tem algum outro emprego ou bico? O que faz ?

.....

4) Qual era sua profissão anterior?

.....

5) Do mês passado até agora aplicou algum inseticida/ herbicida ou fertilizante? Quais?

.....

.....

.....

D) HÁBITOS PESSOAIS E ALIMENTAÇÃO

1) Você é fumante? () sim () não. Quantos cigarros fuma por dia?

.....

2) Há quanto tempo fuma?

.....

3) Fuma no local de trabalho? () sim () não.

4) Qual o tempo decorrido entre o último cigarro e a coleta de sangue?

.....

5) Você costuma beber:

Cerveja () sim () não, quanto por dia?..... garrafas.

Pinga ou outra bebida destilada () sim () não, quanto por dia?..... doses.

6) Qual o tempo decorrido entre a última ingestão de bebida alcóolica e a hora da coleta?

.....

7) Qual o tipo de alimentação que você tem?

.....

8) Você está em jejum? () sim () não. Qual o tempo decorrido entre sua última refeição e a hora da coleta?

.....

9) Você está tomando algum remédio? Qual?

.....

.....

.....

.....

Anexo II



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:

.....

Documento de Identidade Nº :..... Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto...

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável

Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.).....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:

.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa:.....

2. Pesquisador:.....

Cargo/Função:.....Inscrição Conselho Regional Nº:.....

Departamento FCF/USP:.....

.....

.....

.....

1 - 14.569

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco () Risco Mínimo () Risco Médio ()
 Risco Baixo () Risco Maior ()

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento.)

4. Duração

Pesquisa.....

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa; 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. Desconfortos e riscos esperados; 4. Benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO

SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Da indenização por parte do Patrocinador por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DO TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

1. Este termo conterà o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
 2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
 3. O formulário poderá ser em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
 4. A vida do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FCF) deverá ser idêntica aquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.
-

Anexo III

PROTOCOLO TOXICOLÓGICO – período de pós-exposição N°.....

A) DADOS SOBRE AMOSTRAGEM

Data da coleta:

Hora da coleta:

Volume de sangue coletado:

B) INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome:

C) SOBRE SEU TRABALHO

1) Você trabalhou com aplicação de inseticida quantas vezes por semana?

.....

2) Qual (is) produto (s) você usou? De que maneira (forma de aplicação) ?

.....

.....

3) Você interrompeu este trabalho nesta última semana? Pôr quantos dias?

.....

4) Isto ocorreu em outra ocasião desde que você começou a aplicar o produto? Quantas vezes e por quanto tempo?

.....

.....

5) Usou o equipamento de proteção ?

() sim () não () às vezes.

Qual(is)?.....

.....

.....

D) HÁBITOS PESSOAIS E ALIMENTAÇÃO

1) Você é fumante? () sim () não. Quando fumou o último cigarro?

.....

2) Costuma beber? () pouco () moderado () muito. Quando foi a última ingestão de bebida alcóolica?

.....

3) Está em jejum? () sim () não. Quando foi a última vez que comeu? O que comeu?

.....

E) SOBRE SUA SAÚDE

1) Você tem dificuldades para se concentrar ou para se lembrar das coisas?

.....

2) Você sente dores musculares ou fraquezas nas pernas e braços?

.....

3) Você sente dores de cabeça com frequência?

.....

4) Se sente cansado, com bateadeira no coração ou sufocado, mesmo com pouco esforço físico?

.....

5) Transpira muito, mesmo quando não está calor?

.....

6) Fica nervoso e irritado com facilidade? () sim () não.

7) Fica deprimido com certa frequência? () sim () não.

8) Costuma ter formigamento em alguma parte do corpo? () sim () não.

9) Você já percebeu algum tipo de dificuldade de coordenação motora? Qual?

.....

10) Possui algum problema de saúde, qual? Existe casos na família, quais?

.....

11) Você dorme bem, acorda descansado? () sim () não.

12) Você acorda durante a noite? () sim () não.

13) Você sente algum incômodo quando aplica o inseticida?

- () tontura
- () dor de cabeça
- () sua vista escurece
- () sente gosto ruim na boca
- () arde o nariz
- () arde a garganta
- () arde os olhos
- () tosse

Alguma outra coisa?

.....



Anexo IV
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Assistência Acadêmica

Ofício CEP nº 83

São Paulo, 29 de Novembro de 2000.

Prezada Senhora

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião de 27/11/00, aprovou o projeto "Avaliação biológica de trabalhadores rurais expostos à inseticida organofosforado" apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do CEP/FCF

Ilma. Sra.
Miriam Pimentel de Godoy
Pós-Graduada do FBC - Toxicologia

Anexo V

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

parâmetro	Kit/método	Valor de referência
série vermelha	Automatizado Coulter Micro DIFF II	preconizados
série branca	esfregaço em lâmina (coloração May Grunwald Giensa)	preconizados
uréia	Labtest® (enzimático-UV)	15 - 50 mg/dL
creatinina	Labtest® (picrato)	0,4 - 1,4 mg/dL
fosfatase alcalina	Labtest® (Roy modificado)	13 – 43U/L
alanina-aminotransferase	Labtest® (cinética-UV)	3 – 50 U/L
aspartatoaminotransferase	Labtest® (cinética-UV)	12 – 46U/L
gama glutamil-tranferase	Labtest® (Szasz modificado)	6 – 28 U/L
bilirrubina total, direta e indireta	Labtest® (Sims-Horn)	até 1,2 mg/dL, 0,4 mg/dL e 0,8 mg/dL