

JULIANA DE OLIVEIRA PASIANI

**CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICAS DE TRABALHADORES RURAIS EM
RELAÇÃO AO USO DE AGROTÓXICOS E BIOMONITORAMENTO DA
EXPOSIÇÃO**

Brasília-DF

2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JULIANA DE OLIVEIRA PASIANI

**CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICAS DE TRABALHADORES RURAIS EM
RELAÇÃO AO USO DE AGROTÓXICOS E BIOMONITORAMENTO DA
EXPOSIÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília
Área: Toxicologia

ORIENTADORA: Eloísa Dutra Caldas

Brasília – DF
2012

JULIANA DE OLIVEIRA PASIANI

**CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICAS DE TRABALHADORES RURAIS EM
RELAÇÃO AO USO DE AGROTÓXICOS E BIOMONITORAMENTO DA
EXPOSIÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília
Área: Toxicologia

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE

Prof.^a. Dr.^a. Eloísa Dutra Caldas
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

MEMBROS:

Prof. Dr. Fernando Ferreira Carneiro
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Sergio Rebello Alves
Membro Externo do Programa
Fundação Oswaldo Cruz

SUPLENTE:

Prof.^a. Dr.^a. Anadergh Barbosa de Abreu Branco
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

À minha família e ao Tiago
pela constante presença em minha vida
e por fazerem tudo valer à pena.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Eloísa Dutra Caldas, por ter me recebido no Laboratório de Toxicologia e ter me ensinado tudo que aprendi.

Ao Alann Ferreira, da Fiocruz, pelo treinamento na metodologia e por tirar todas as minhas dúvidas que surgiram no decorrer da pesquisa.

À Secretarias de Saúde de Goianápolis e Taquara e à Emater Taquara, por contribuírem para a realização desse trabalho.

Aos moradores e trabalhadores dessas regiões, por responderem aos questionários, pelas amostras de sangue doadas e pela oportunidade de conhecer um pouco de suas vidas.

Ao Juciê, Bruno e Jullyane, que souberam tão bem me ajudar em todas as etapas da pesquisa.

À Priscila, por seu constante entusiasmo e contribuição com a pesquisa e por sua amizade.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia, pelos ensinamentos e convívio diário.

À Alessandra, pela ajuda nas análises estatísticas.

À Patrícia e Mariana, pela amizade e companheirismo.

À Marol, por alegrar meus dias na academia.

À minha família, por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA.....	VII
LISTA DE QUADRO	VIII
LISTA DE TABELA.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT	XII
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 - AGROTÓXICOS E A AGRICULTURA NO CENTRO-OESTE.....	3
2.2 - INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS (OF) E CARBAMATOS (CAR).....	6
2.3 - COLINESTERASES	9
2.4 - ACETILCOLINA, AChE E BChE	10
2.5 - MECANISMO DE AÇÃO DOS OF E CAR.....	13
2.6 - SINAIS E SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO	16
2.7 - CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICAS	18
2.7.1 Características gerais do ambiente rural.....	18
2.7.2 Uso de equipamentos de proteção individual e aplicadores	20
2.7.3 Higiene e embalagens vazias.....	22
2.7.4 Receituário agrônomo.....	23
2.8 - EXPOSIÇÃO E INTOXICAÇÃO POR AGROTÓXICOS.....	24
2.9 - COMUNICAÇÃO E PERCEPÇÃO DE RISCO.....	26
2.10 - REGULAMENTAÇÃO	28
2.11 - BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS.....	29
3 - OBJETIVOS.....	33
3.1 - GERAL.....	33
3.2 - ESPECÍFICOS	33
4 - MÉTODOS	34
4.1 - POPULAÇÃO DE ESTUDO	34
4.2 - ESTUDO CAP (CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICAS)	36
4.3 - COLETAS DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	37
4.4 - PADRÕES E REAGENTES	37
4.5 - METODOLOGIA.....	38
4.5.1 Princípio das análises.....	38
4.5.2 Preparo das amostras	40
4.5.3 Quantificação protéica da porção eritrocitária	40
4.5.4 Determinação das atividades específicas de cada enzima.....	41
4.5.5 Preparo da curva padrão de L-cisteína	42
4.5.6 Cálculos	42
4.6 - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	43
4.6.1 Linearidade	43
4.6.2 Otimização do tempo de análise de AChE e BChE após coleta da amostra de sangue	44
4.7 - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA	47
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 - KNOWLEDGE, ATTITUDES, PRACTICES AND BIOMONITORING OF FARMERS AND RESIDENTS EXPOSED TO PESTICIDES IN BRAZIL	48
6 - CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO A	85
ANEXO B	90
ANEXO C	91
ANEXO D	92
ANEXO E.....	93

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Venda de agrotóxicos de 2006 a 2010 no Brasil, em US\$ milhões	4
Figura 2: Mercado de agrotóxicos acumuladas no período de janeiro a maio de 2010 e 2011, em R\$ milhões.....	4
Figura 3: Padrão de ocupação do território pela agropecuária no período 1995-1996 (1) e 2006 (2) na região centro-oeste.	5
Figura 4: Estrutura química geral dos inseticidas organofosforados e alguns compostos dessa classe.....	7
Figura 5: Estrutura geral dos metilcarbamatos e alguns compostos dessa classe....	8
Figura 6: Organização das subunidades das formas moleculares das colinesterases.	10
Figura 7: Acetilcolina e acetilcolinesterase na fenda sináptica.	11
Figura 8: Esquema do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase com a molécula de acetilcolina. SE: sítio esterásico. SA: sítio aniônico.....	12
Figura 9: Estrutura da acetilcolina e do aldicarb.	14
Figura 10: Reação da enzima, mostrando apenas o sítio catalítico com o resíduo serina e uma molécula de organofosforado, resultando na enzima livre ou “envelhecida”	15
Figura 11: Localização de Goianópolis e Planaltina.	35
Figura 12: Esquema das reações de formação do ácido nitrobenzóico.	39
Figura 13: Curva padrão de L-cisteína construída na validação da metodologia analítica para avaliar a linearidade do método.	43
Figura 14: Análise da enzima AChE após diferentes dias de congelamento após a coleta da amostra de sangue; n= 5 em cada dia. Resultados marcados com asteriscos são estatisticamente iguais ($p>0.05$)	45
Figura 15: Análise da enzima BChE após diferentes dias de congelamento após a coleta da amostra de sangue; n= 5 em cada dia. Resultados marcados com asteriscos são estatisticamente iguais ($p>0.05$)	46

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Fatores que podem estar envolvidos na alteração das enzimas AChE e BChE.	16
Quadro 2: Relações sugeridas de níveis de inibição da AChE e BChE com significados e/ou ações a serem tomadas.	30

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Concentrações de cada reagente utilizado no preparo da curva padrão de albumina	41
Tabela 2: Concentrações de cada reagente utilizado no preparo da curva padrão de L-cisteína.	42
Tabela 3: Média, desvio padrão (DesPad) e o coeficiente de variação (CV, %) da atividade enzimática da AChE	44
Tabela 4: Média, desvio padrão (DesPad) e o coeficiente de variação (CV, %) da atividade enzimática da BChE.	45
Tabela 5: Resultados dos p-valores para a combinação total dos 5 dias de análise de amostras de plasma e eritrócitos congeladas.....	47

RESUMO

O uso de agrotóxicos na agricultura tem o objetivo de preservar as culturas da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, aumentar a produção de alimentos e sua qualidade e diminuir o trabalho no campo. Entretanto, o uso indevido desses produtos pode gerar danos à saúde e ao meio ambiente. Nesse estudo, o conhecimento, atitudes e práticas em relação ao uso de pesticidas e os níveis de exposição dos agricultores e suas famílias aos pesticidas inibidores da colinesterase, organofosforados (OF) e carbamatos (CAR), foram avaliados em duas comunidades rurais do Centro-Oeste do Brasil, Goianópolis e Núcleo Rural Taquara. Um questionário padronizado com 59 questões objetivas e 2 subjetivas foi aplicado em 112 agricultores com idade ≥ 18 anos. Os níveis de exposição aos agrotóxicos dos trabalhadores e seus familiares foram avaliados por meio da análise de colinesterase sanguínea. A média da idade dos trabalhadores foi de 37,7 anos, 6,3% eram analfabetos ou apenas alfabetizados e 29,4% tinham pelo menos o ensino fundamental completo. Eles trabalhavam em pequenas áreas de cultivo, caracterizadas por baixa tecnologia. A maioria acredita que os agrotóxicos podem fazer mal à saúde (87,5%). Entretanto, quase metade deles relatou usar raramente (48,2) equipamentos de proteção individual (EPI), ou até nunca os usam (7,2); 11,2% acham que os agrotóxicos podem prejudicar a saúde daqueles que vivem perto da área de plantio. Foi encontrada uma associação entre regime de trabalho e o uso de EPI ($p=0,001$), que são mais usados entre meeiros do que aqueles envolvidos na agricultura familiar. Uma correlação significativa ($p=0,027$) foi encontrada entre reportar sintomas adversos e o uso de aplicador costal. A atividade da acetilcolinesterase (AChE) dos agricultores ($n=76$) e dos familiares ($n=18$) foi significativamente maior do que o grupo controle ($n=41$ e $n=23$, respectivamente) ($p=0,02$ e $p<0,01$). A atividade da butirilcolinesterase (BChE) no grupo dos familiares, em comparação com o grupo controle, foi significativamente menor. Entre os 60 agricultores que doaram sangue nos períodos de exposição (até 5 dias depois de usar OF e/ou CAR) e não exposição (com mais de 15 dias sem usar esses pesticidas), 10 (17%) tiveram diminuição da AChE acima de 30% durante o período de exposição em comparação com o nível basal. Seis familiares que moravam em áreas de alguns desses agricultores também apresentaram essa diminuição.

Aproximadamente 32% dos agricultores (n=19) tiveram a atividade da AChE maior que 30% em relação ao nível basal, indicando o efeito rebote. Exames de sangue de rotina foram feitos em 135 indivíduos trabalhadores, familiares ou do grupo controle para avaliar parâmetros renais e hepáticos. Foram encontradas 48 alterações (3,4% de todos os exames), sendo 65% delas no grupo dos agricultores. Esses resultados indicaram que programas de educação são necessários para promover o uso seguro de pesticidas no campo e proteger os agricultores e seus familiares da exposição aos agrotóxicos.

Palavras-chave: Agrotóxicos; estudo CAP; biomonitoramento; acetilcolinesterase; butirilcolinesterase.

ABSTRACT

Pesticides are used in the field for pest control, to increase food production and quality and reduce human labor. However, the misuse of these products can cause damage to health and environment. In this study, the knowledge, attitudes and practices regarding pesticide use and the levels of exposure of farmers and their families (residents) to cholinesterase inhibitor pesticides were evaluated in two rural settings in the Midwestern region of Brazil, Goianópolis and Núcleo Rural Taquara. A standardized questionnaire with 59 objective and 2 subjective questions was completed by 112 farmers aged ≥ 18 years. Exposure levels of farmers and residents to pesticides were assessed through blood cholinesterase analysis. The average age of the farmers was 37.7 years, 6.3% were illiterate or had never been to school and 29.4% had at least primary school. Farmers worked in small plots, and did not utilize advanced farming technology. Almost all acknowledged that pesticides were potentially harmful to their health (87.5%). However, over half rarely (48.2%) or never (7.2%) used personal protective devices (PPD); 11.2% thought that pesticides impaired the health of those living near the planting area. We found an association ($p=0.001$) between the work regimen and the use of PPD, with more frequent equipment use among hired laborers than those involved in family agriculture. A significant correlation ($p=0.027$) was found between the reporting of adverse symptoms and the use of backpack sprayers. Mean AChE activity of farmers ($n=76$) and residents ($n=18$) were significantly higher than their control groups ($n=41$ and $n=23$, respectively) ($p=0.02$ and $p<0.01$). Mean Butyrylcholinesterase (BChE) activity was significantly lower than the control only in the resident group. Among the 60 farmers that had blood sample collected in both exposure (up to 5 days after using AChE inhibitors) and non-exposure periods (not using AChE inhibitors for at least 15 days), 10 (17%) had AChE depletion of over 30% during the exposure period compared with the baseline level. Six residents living in the same farms also presented this depletion. AChE was higher than 30% the baseline level for 19 farmers (31.7%), indicating a reboot effect. Results from routine blood exams performed in 135 individuals from all groups showed 48 alterations (3.4% of all exams), 65% of them in the farmer group. These results indicate that special education programs are needed to promote

the safe use of pesticides in the field to protect farmers and their families from pesticide exposure.

Key words: pesticides, KAP study, biomonitoring, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase

1 - INTRODUÇÃO

Os produtos químicos tornaram-se uma parte indispensável da vida humana. Há cerca de 100.000 substâncias químicas ou 4.000.000 de misturas, formulações e compostos de uso comercial. Adicionalmente, várias centenas de novos produtos químicos são introduzidos a cada ano no planeta (WHO, 1999). O uso de agrotóxicos na agricultura tem o objetivo de preservar os alimentos da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, aumentar a produção de alimentos, aumentar a qualidade dos produtos e diminuir o trabalho no campo (OPAS/OMS, 1996). Apesar de seus benefícios, esses produtos podem, especialmente quando mal utilizados, causar efeitos adversos à saúde humana e à integridade ambiental (WHO, 1999; Sobreira & Adissi, 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram no mundo cerca de três milhões de intoxicações por agrotóxicos e 220 mil mortes por ano. Destas, cerca de 70% ocorrem em países do terceiro mundo, principalmente África, Ásia e Américas Central e do Sul (OPAS/OMS, 1996; Jaga & Dharmani, 2003; Delgado & Paugartten, 2004). O número de casos de intoxicação humana por agrotóxicos tem aumentado gradativamente no Brasil nos últimos anos (SINITOX, 2009; Rebelo *et al.*, 2010). Em 2010 houve um total de 2.704 intoxicações exógenas por agrotóxico de uso agrícola no país, representando o quinto lugar entre as intoxicações exógenas (MS, 2011).

No Brasil, a zona rural é vista como uma população que recebe pouca atenção do Estado em termos de educação, saúde, saneamento e assistência agrícola (Sobreira & Adissi, 2003). Muitos trabalhadores e indivíduos que apresentam sintomas de intoxicação por agrotóxicos podem nunca procurar um serviço de saúde devido à distância, fatores econômicos, medo de ser despedido e outras razões. Adicionalmente, o serviço de saúde pode ser incapaz de fazer a relação entre os sintomas e a exposição aos pesticidas, devido ao despreparo das equipes de saúde e escassez de laboratórios para monitoramento biológico (Thundiyl *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2005a; Silva *et al.*, 2005). Assim, dados oficiais sobre intoxicações por agrotóxicos no Brasil não retratam a gravidade do problema (Silva *et al.*, 2005). Rebelo *et al.* (2011) detectou alta taxa de subnotificação de

intoxicações por agrotóxicos reportadas pelo Centro de Informação e Assistência Toxicológica do Distrito Federal no período de 2004 a 2007.

Assim, estudos de conhecimentos, atitudes e práticas sobre o uso de agrotóxicos, junto com o monitoramento biológico, que avalia a exposição a esses compostos, são importantes para entender melhor a realidade do homem no campo e direcionar as políticas governamentais para atender os problemas locais.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - AGROTÓXICOS E A AGRICULTURA NO CENTRO-OESTE

Vários nomes expressam um mesmo grupo de substâncias químicas utilizadas no campo para controle de praga, incluindo agrotóxicos, pesticidas, praguicidas, agroquímicos e defensivos agrícolas (Soares *et al.*, 2003; Delgado & Palgatten, 2004; Faria *et al.*, 2004; Levigard & Rozemberg, 2004; Gomide, 2005; Silva *et al.*, 2005).

Segundo a agência americana *Environmental Protection Agency* (EPA, 2011a) pesticidas são qualquer tipo de substâncias ou mistura de substâncias com a intenção de prevenir, destruir, repelir qualquer praga. No Brasil, o termo oficial para designar esses compostos é “agrotóxico”, definido pela lei 7.802 de 1989 como:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores do crescimento das plantas” (Brasil, 1989).

Essa lei, e suas atualizações, dispõem sobre pesquisa, experimentação, produção, embalagem e rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, propaganda comercial, utilização, importação, exportação, destino final dos resíduos e embalagens, registro, classificação, controle, inspeção e fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins.

Mais de 1,5 milhões de toneladas de agrotóxicos são fabricados todo o ano no mundo (Sato, 2006). O uso de agrotóxicos no Brasil tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e o país ocupa hoje um dos primeiros lugares no ranking mundial (PRONAF, 2010; Rebelo *et al.*, 2010; SINDAG, 2011) (Figura 1). A venda de agrotóxicos no Brasil no período de janeiro a julho de 2011 cresceu 18%, em milhões de reais, em comparação com o mesmo período de 2010 (Figura

2), principalmente nas culturas de algodão, trigo, milho e pastagem (SINDAG, 2011). Segundo a Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA, 2011), a projeção de produção agrícola para 2012 é de crescimento em relação a 2011.

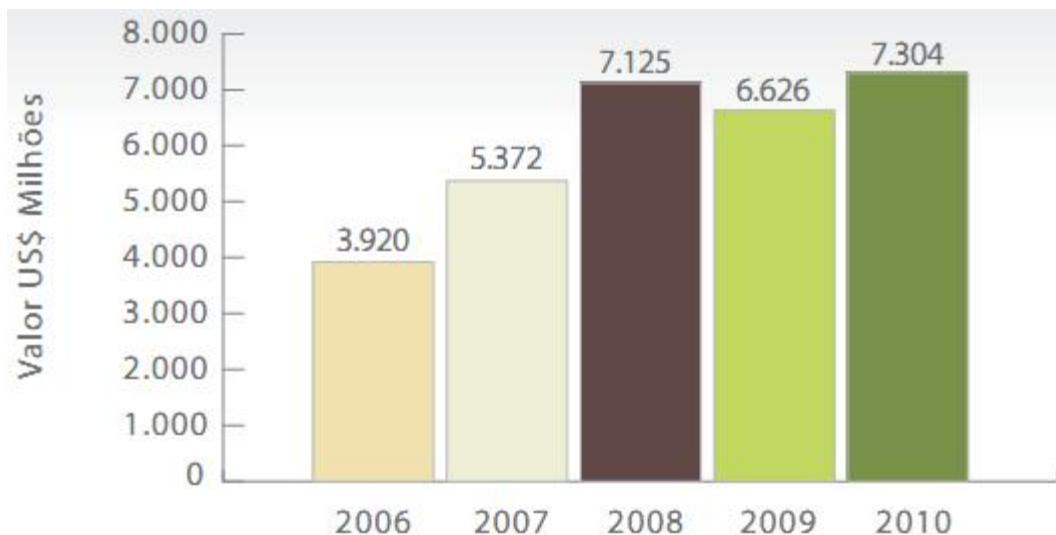


Figura 1: Venda de agrotóxicos de 2006 a 2010 no Brasil, em US\$ milhões (SINDAG, 2011).

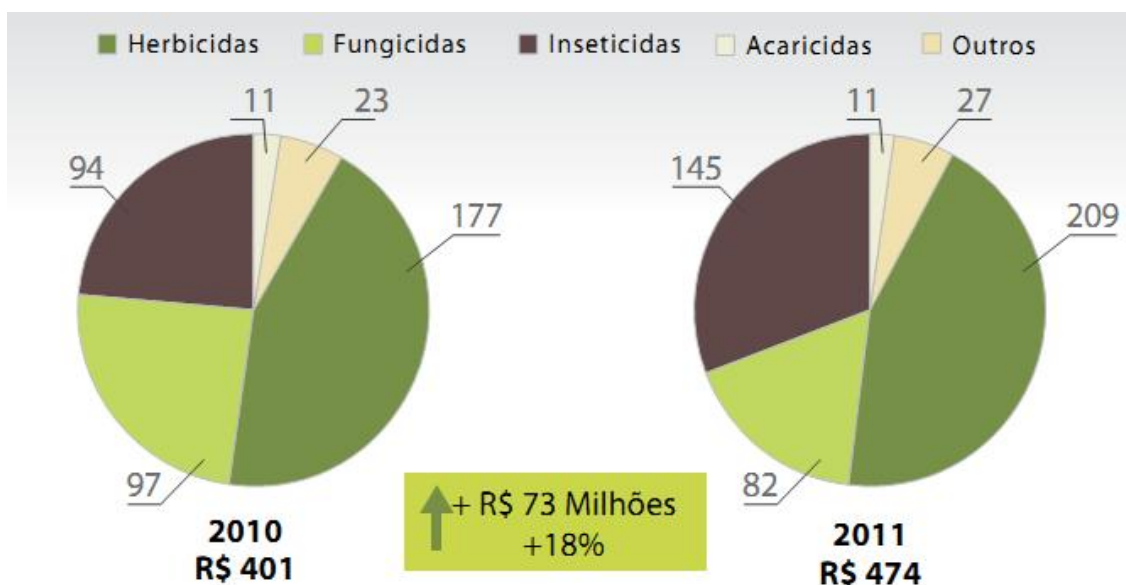


Figura 2: Mercado de agrotóxicos acumuladas no período de janeiro a maio de 2010 e 2011, em R\$ milhões (SINDAG, 2011).

Os agrotóxicos se subdividem em 23 categorias, entre elas os herbicidas, acaricidas, fungicidas e inseticidas (EPA, 2011b). Os produtos agrotóxicos podem ser classificados em 4 classes toxicológicas: classe I, extremamente tóxico; classe II, altamente tóxico; classe III, medianamente tóxico e a classe IV, pouco tóxico, indicadas na embalagem do produto com as faixas vermelha, amarela, azul e verde,

respectivamente (ANVISA, 2011). Herbicidas, fungicidas e inseticidas são os agrotóxicos mais utilizados no Brasil (Figura 2), e representam 33,4%, 26,9% e 26%, respectivamente, de todos os 1.473 produtos formulados disponíveis no país (Agrofit, 2011). Dentre os inseticidas, 49,3% pertencem às classes toxicológicas I e II, ou seja, são extremamente e altamente tóxicos para os indivíduos que utilizam estes produtos (Agrofit, 2011).

Segundo o censo agropecuário de 2006, o Brasil possui 5.175.489 estabelecimentos agropecuários, definidos como “toda unidade de produção dedicada, total ou parcialmente, às atividades agropecuárias, florestais e agrícolas, subordinada a uma única administração: a do produtor ou a do administrador” (SIDRA, 2006; IBGE, 2006a). Cerca de 6% destes estabelecimentos estão localizados na região Centro-Oeste e houve um aumento de 30% em número de estabelecimentos em 2006 em comparação com 1995, quando se iniciou o deslocamento da coticultura brasileira das regiões nordeste, sudeste e sul para o centro-oeste e oeste da Bahia (IBGE, 2006a) (Figura 3).

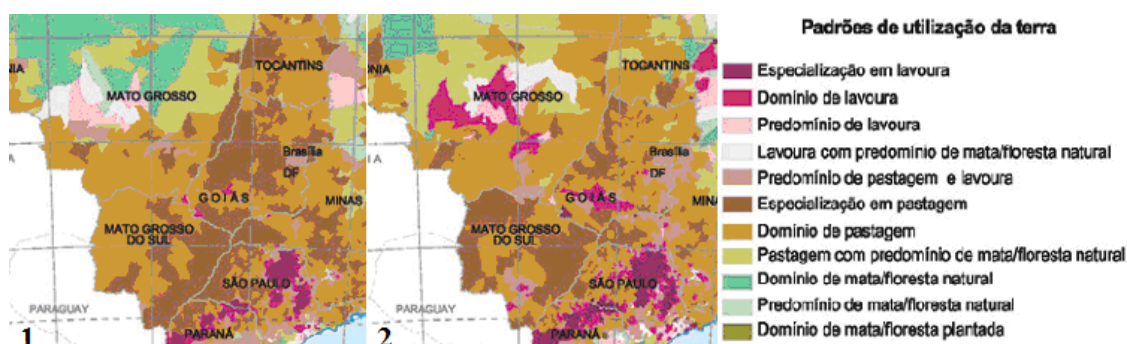


Figura 3: Padrão de ocupação do território pela agropecuária no período 1995-1996 (1) e 2006 (2) na região centro-oeste (modificado - IBGE, 2006b).

No centro-oeste, 68,9% do número dos estabelecimentos de produção vegetal é relacionado à agricultura familiar (SIDRA, 2006), que é caracterizada pela pouca tecnologia nas práticas agrícolas, incluindo o uso de pulverizadores costais para aplicação de agrotóxicos, o que pode favorecer a ocorrência de intoxicações ocorridas na região (Santos & Noronha, 2001; Pires, 2005; Latorraca *et al.*, 2008; CNPH, 2009). Hortaliças e frutas são os principais alimentos cultivados na agricultura familiar, culturas altamente sensíveis às pragas e doenças, exigindo uso intensivo de agrotóxicos, principalmente inseticidas organofosforados e carbamatos (Latorraca *et al.*, 2008; Pinho *et al.*, 2009).

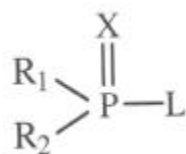
2.2 - INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS (OF) E CARBAMATOS (CAR)

Os OF foram sintetizados pela primeira vez no início do século 19 com a intenção de investigar seus efeitos como inseticidas, sendo utilizados posteriormente como arma de guerra. Em 1941, durante a Segunda Guerra Mundial, eles foram reintroduzidos com o propósito inicial, ou seja, para o uso agrícola (Sato, 2006).

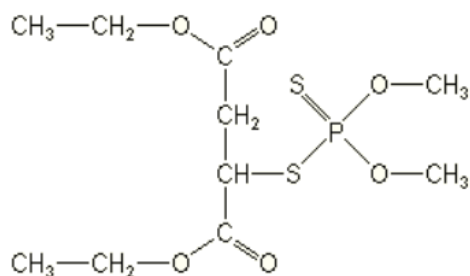
Os OF são ésteres, amidas ou derivados dos ácidos fosfórico (H_3PO_4) ou fosforoso (H_3PO_3), no qual todos os átomos de hidrogênio são substituídos por subunidades orgânicas (Figura 4). Os grupos R_1 e R_2 são os menos reativos e seus substituintes mais comuns são os alcóxidos (grupo alquil ligado a um oxigênio), mas podem ser também alquil, aril e aminoalquil. O substituinte X, com a dupla ligação, pode ser um oxigênio ou enxofre. O substituinte L é um grupo de saída, o mais reativo, o mais susceptível à hidrólise nos processos metabólicos e o substituinte mais variável (Fukuto, 1990; Chambers *et al.*, 2001; Timchalk, 2006).

Esses inseticidas são estáveis quando armazenados em ambientes com baixas temperaturas, escuros e anidros. Entretanto, a exposição ao calor, à luz (especialmente ultravioletas) e/ou à água pode conduzir à alterações químicas, principalmente hidrólise e oxidação. A taxa de hidrólise aumenta com o aumento do pH, devido ao aumento do íon OH^- . Adicionalmente, os compostos contendo $P=O$ hidrolizam mais rápidos que os análogos contendo $P=S$ (Chambers *et al.*, 2001).

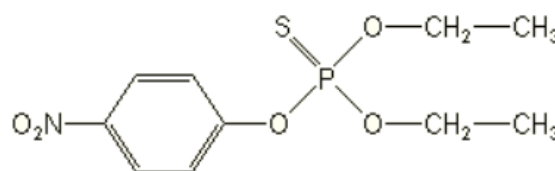
As reações químicas envolvendo os OF podem resultar em um produto mais ou menos tóxico. As reações de hidrólise completa detoxifica o OF, resultando em produtos menos reativos (Chambers *et al.*, 2001). Entretanto, muitos inseticidas são fabricados na forma de ésteres derivados do ácido tiofosfórico, não sendo diretamente tóxicos, devido à estrutura $P=S$, requerendo um metabolismo oxidativo com o envolvimento do citocromo P450 para se tornarem mais reativos, originando a estrutura $P=O$ (WHO, 1986; Fukuto, 1990), como o clorpirifós (Figura 4). A reação de oxidação não enzimática pode ocorrer em produtos estocados em ambientes com altas temperaturas ou em exposição à luz UV (WHO, 1986; Chambers *et al.*, 2001).



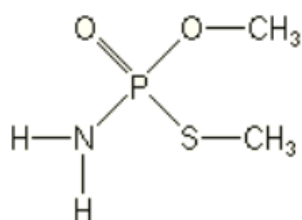
Estrutura geral dos OF



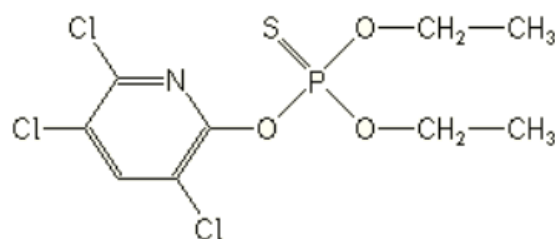
Malation



Paration



Metamidofós



Clorpirifós

Figura 4: Estrutura química geral dos inseticidas organofosforados e alguns compostos dessa classe (Chambers *et al.*, 2001; CPCN, 2012).

Os inseticidas CAR são ésteres de ácido carbâmico sintetizados no início dos anos 30 e mostraram atividades herbicida e fungicida. Só em meados dos anos 50 o interesse por esses compostos foi retomado, quando ocorreu a pesquisa por propriedades inseticidas e menos tóxicas aos mamíferos que os OF (Ecobichon, 2001). O ácido carbâmico pode ser estabilizado pela formação de um sal, como carbamato de amônia, ou pela síntese de ésteres de alquil ou aril. A substituição de um hidrogênio por um grupamento metil no átomo de nitrogênio resulta na formação do ácido N-monometilcabamico, o qual, quando combinado com um substituinte éster aril, resulta em significantes alterações nas propriedades fisicoquímicas e introduz a propriedade inseticida. Outro grupo dos inseticidas carbamatos são os derivados oximas alifáticas, ao invés de ésteres, como os anteriores. Eles são chamados de metilcarbamoiloxi ou metilcarbamatos de oxima e possuem alto grau de toxicidade (Ecobichon, 2001; Agrofit, 2011).

A maioria dos inseticidas CAR são metilcarbamatos, representados na Figura 5. O X representa o grupo de saída, em sua maioria os substituintes alquil ou aril, que podem representar mudanças nas propriedades físicoquímicas e atividade biológica desses pesticidas (Ecobichon, 2001; Timchalk, 2006).

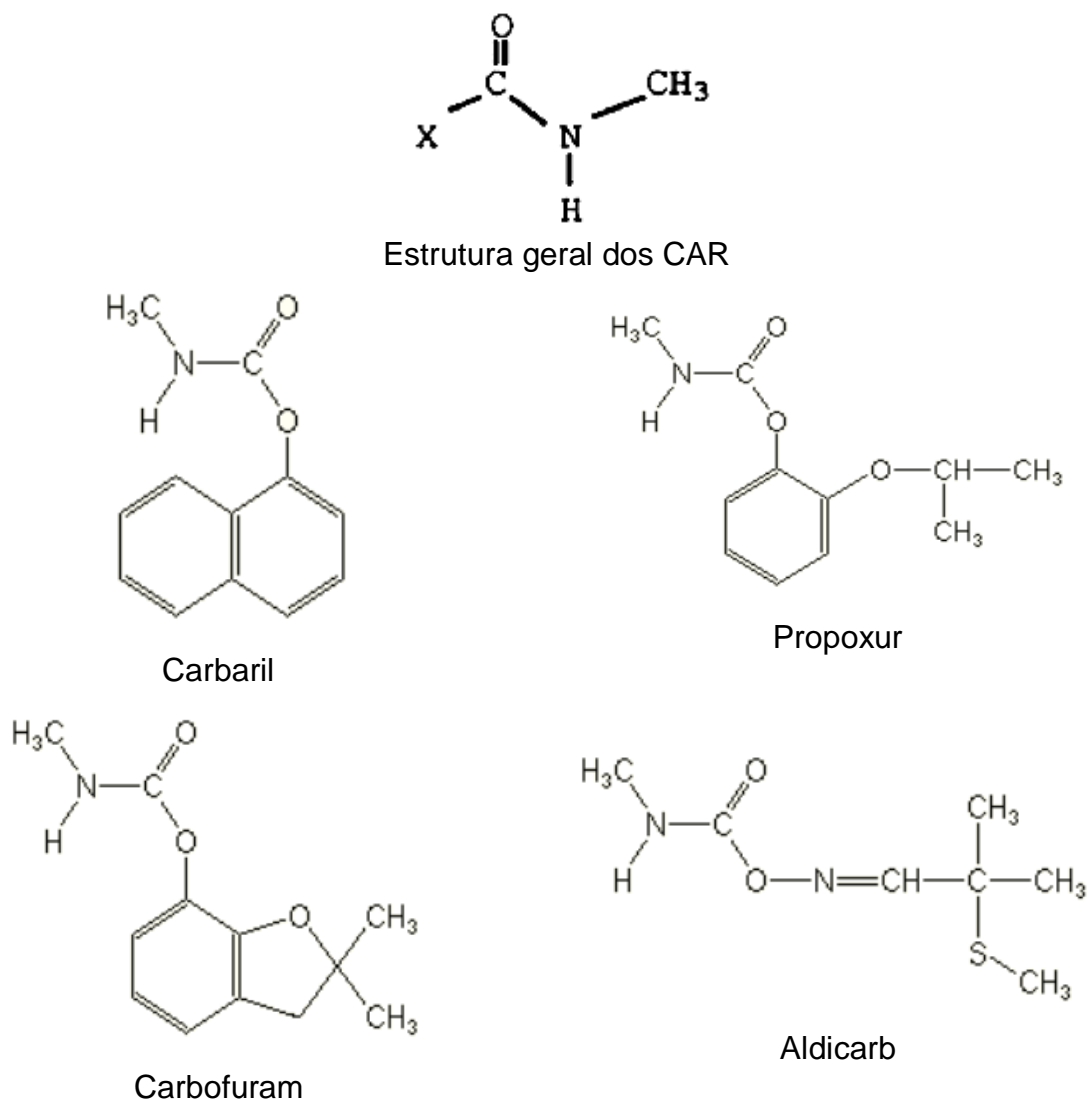


Figura 5: Estrutura geral dos metilcarbamatos e alguns compostos dessa classe (Fukuto, 1990; CPCN, 2012).

A maioria dos CAR se dissolve rapidamente em solvente orgânico e apenas alguns são solúveis em água. O aumento da temperatura e de pH aumenta sua degradação devido ao aumento das reações de hidrólise. A estabilidade ambiental dos CAR é muito afetada por fotodegradação pelo UV e por oxidação em exposição ao ar, gerando a decomposição desses inseticidas. A maioria dos CAR possui baixa temperatura de vapor, resultando em baixa volatilidade em temperaturas usuais.

Entretanto, em compostos metilcarbamoiloxi, o aumento de temperatura pode se aproximar da temperatura de vapor, fator que deve ser considerado em lugares com climas tropicais (Ecobichon, 2001).

A maioria desses inseticidas são líquidos com diferentes pressões de vapor à temperatura ambiente, mas o risco devido à inalação de vapor varia de composto para composto. A pressão de vapor do agente ativo é reduzido em diluição com emulsificante, diminuindo o risco de inalação. Entretanto, este aditivo facilita a absorção do produto em contato com a pele (WHO, 1986; Ecobichon, 2001). A pressão de vapor do produto deve ser avaliada pelos governos antes de permitir o registro para o uso, com o propósito de reduzir a exposição e o risco dos trabalhadores a níveis não prejudiciais para a saúde (EPA, 2011c). Após a absorção, os OF e CAR são rapidamente distribuídos aos tecidos e órgãos do organismo humano (Timchalk, 2006; Barr & Angerer, 2009). Não existe evidência do acúmulo prolongado no organismo, e sua eliminação ocorre principalmente pela urina (WHO, 1986; Ecobichon, 2001).

No Brasil, existem 52 produtos OF e CAR registrados, que podem ser utilizados nas culturas de abacaxi, abóbora, algodão, ameixa, amendoim, banana, batata, berinjela, brócolis, caqui, cebola, café, cevada, citros, couve, couve-flor, crisântemo, feijão, fumo, goiaba, maçã, maracujá, marmelo, melancia, melão, milho, pepino, pêra, pêssego, pastagem, pimentão, repolho, rosa, soja, sorgo, tomate e uva (Agrofit, 2011).

2.3 - COLINESTERASES

Colinesterases são proteínas conhecidas como esterases, elas são poliméricas e ocorrem em múltiplas formas moleculares. As formas das colinesterases são sintetizadas como monômeros globulares catalíticos (G1) que oligomeriza via ponte de disulfeto nas formas G2 e G4. A subunidade G1 é formada dentro das células, glicosilada e excretada. As caldas de colágeno são ligadas a um, dois ou três tetrâmeros catalíticos para a produção das formas assimétricas A4, A8 e A12. As formas globulares compõem a subunidade catalítica e a calda se liga à superfície das células, e o modelo referente a AChE eritrocitária é a G2 (Massoulié &

Bom, 1982; Wilson, 2001). A Figura 6 mostra esquematicamente a organização dessas subunidades.

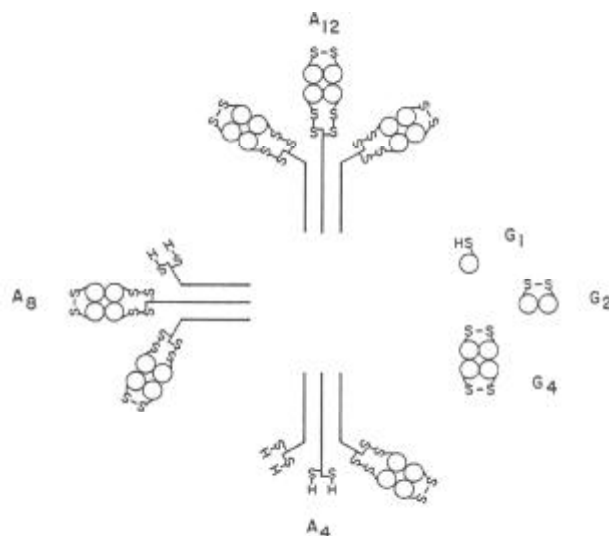


Figura 6: Organização das subunidades das formas moleculares das colinesterases (Wilson, 2001).

A AChE, também conhecida como colinesterase eritrocitária ou verdadeira, é localizada principalmente nos nervos autônomos, nevos motores somáticos e na membrana dos eritrócitos (Fukuto, 1990; Rang *et al.*, 2004). A BChE, também conhecida por colinesterase plasmática ou pseudo-colinesterase, localiza-se, principalmente, no fígado, intestino, cérebro e plasma (Fukuto, 1990; Maroni *et al.*, 2000; Rang *et al.*, 2004). Ela não está associada às sinapses colinérgicas e exibe baixa especificidade por substratos em comparação com a AChE (Thompson, 1999; Rang *et al.*, 2004). Seu papel biológico não é bem definido como o da AChE, mas ambas enzimas são inibidas por OF e CAR (Fukuto, 1990; Thompson, 1999).

2.4 - ACETILCOLINA, ACHE E BCHE

A acetilcolina (ACh) é sintetizada pela colina acetiltransferase (ChAT), com a ajuda da acetilcoenzimaA (AcCoA) + colina (Figura 7). Logo após a sua síntese, ela é transportada para dentro de vesículas por meio do transportador vesicular (VACHT). O lúmen da vesícula é acidificado pela ação de uma bomba de prótons ATP-dependente localizada na membrana das vesículas sinápticas. O gradiente de pH entre o lúmen da vesícula e do citoplasma fornece força motriz para o transporte

da ACh. Após a fusão das vesículas sinápticas e liberação do neurotransmissor, processo dependente de cálcio, a ACh se difunde na fenda sináptica e ativa receptores muscarínicos e nicotínicos, normalmente localizados em células pós-sinápticas. A ação da ACh é finalizada com a hidrólise do neurotransmissor pela AChE em colina e ácido acético. A colina resultante é transportada de volta para o neurônio pré-sináptico por meio da alta afinidade com o transportador de colina (CHT), reiniciando o processo (WHO, 1986; Maroni *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2002; Rand, 2007).

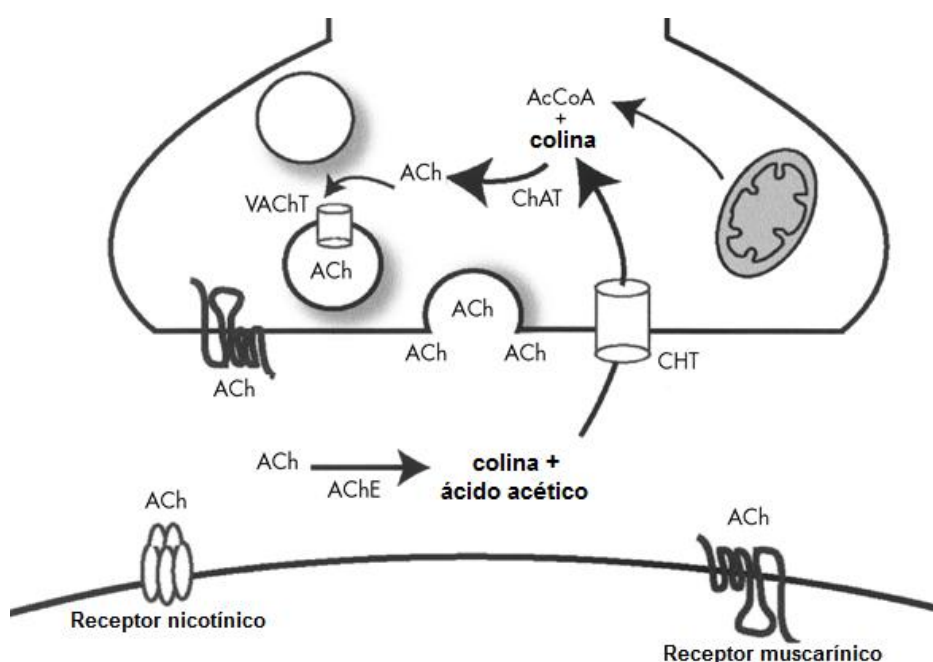


Figura 7: Acetilcolina e acetilcolinesterase na fenda sináptica (modificado - Davis *et al.*, 2009).

A ACh é um transmissor primário nos ganglios do Sistema Nervoso Autônomo, na junção neuromuscular somática e nas terminações nervosas pós-ganglionares parassimpáticas, transmissor excitatório primário para as células musculares lisas e secretoras no Sistema Nervoso Entérico (SNE) e, provavelmente, o principal transmissor neurônio-neurônio (ganglionar) no SNE (Maroni, *et al.*, 2000; Rand, 2007). A AChE é um agente regulador da transmissão nervosa mediada pela ACh (Wilson, 2001).

Existem dois grupos ativos na molécula de acetilcolina: o trimetilamônio, carregado positivamente, e um grupamento éster, altamente polarizado. Na

superfície da AChE, o sítio catalítico é subdividido em aniônico, onde encontra-se o resíduo de glutamato, e o esterásico, formado pelos resíduos de aminoácidos serina e histidina. No sítio esterásico encontra-se uma hidroxila que se ligará ao carbono da molécula de acetilcolina de maneira covalente (Figura 8) (Dvir *et al.*, 2010). O grupo hidroxila da serina é o resíduo chave do lado catalítico da enzima (Reiner & Simeon-Rudolf, 2006).

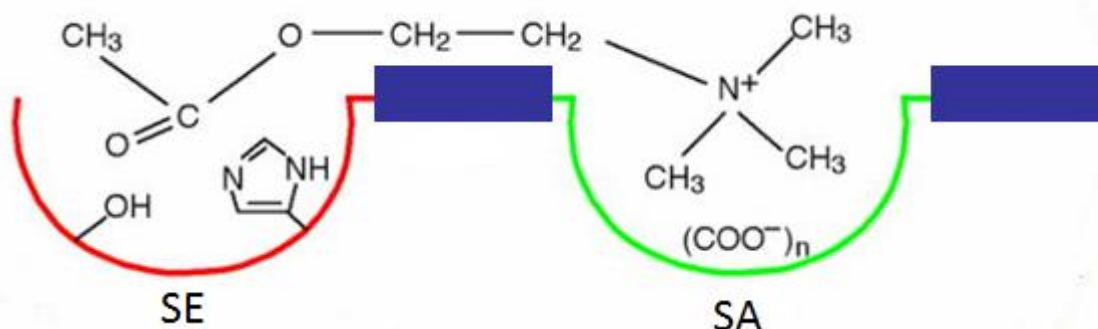
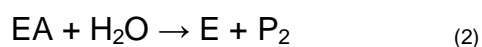


Figura 8: Esquema do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase com a molécula de acetilcolina. SE: sítio esterásico. SA: sítio aniônico. (modificado - Dvir *et al.*, 2010).

A hidrólise espontânea do grupo acetil da serina ocorre rapidamente, e a renovação da AChE é extremamente alta (mais de 10.000 moléculas de acetilcolina hidrolizada por segundo por um único sítio ativo) (Rang *et al.*, 2004). Essa hidrólise acontece de acordo com as equações abaixo, como descrito por Reiner & Simeon-Rudolf (2006).



No qual E é a enzima (AChE), S é o substrato, que pode ser acetilcolina ou acetiltiocolina, ES é um complexo enzima-substrato, EA é a enzima acetilada no sítio catalítico, e P₁ e P₂ são produtos da hidrólise. Quando o substrato é a acetilcolina, P₁ é a colina; quando o substrato for a acetiltiocolina, P₁ será a tiocolina; P₂ é o ácido acético (Reiner & Simeon-Rudolf, 2006).

Quando E é a butirilcolinesterase e S a butirilcolina, P₁ é a colina; quando o substrato for a butiriltiocolina, P₁ será a tiocolina. Com ambas as enzimas (AChE e BChE) a acilação ou deacilação da serina, no sítio esterásico (Figura 8) acontece rapidamente. Entretanto, quando a enzima reage com algum inibidor colinestárico,

como por exemplo OF ou CAR, a reação de formação é rápida, entretanto a de reversão é lenta (Reiner & Simeon-Rudolf, 2006).

2.5 - MECANISMO DE AÇÃO DOS OF E CAR

Quando a AChE é inativada pelo OF ou CAR, a enzima não é mais capaz de hidrolisar a ACh. Assim, sua concentração na fenda sináptica torna-se alta e gera uma estimulação contínua no receptor pós-sináptico. (Thompson, 1999; Ecobichon, 2001).

A inibição da AChE por um OF ocorre através de uma reação química na qual a molécula de hidroxila da serina no sítio ativo da enzima é fosforilada de uma maneira análoga à acetilação da AChE. O primeiro passo do processo de inibição envolve a formação do complexo enzima-inibidor com a subsequente fosforilação da hidroxila da serina e perda do grupo de saída do OF (Satoh, 2006). A enzima fosforilada é altamente estável, e, em alguns casos, dependendo do grupo ligado ao átomo de fósforo, é uma inibição irreversível. O grupo hidroxila da serina, bloqueado pela parte fosforil, não é mais capaz de participar da hidrólise da acetilcolina (WHO, 1986; Fukuto, 1990). Assim, os substituintes R₁, R₂ e L do OF (Figura 04) possuem um papel muito importante na especificidade da enzima (Satoh, 2006).

O mecanismo de ação dos CAR é praticamente idêntico ao descrito anteriormente para os OF. A grande diferença é a substituição da fosforilação pela carbamilação, resultando, também, na inibição da enzima (Maroni *et al.*, 2000). A carbamilação é um resultado da saída do substituinte X (Figura 05) (Satoh, 2006). A inibição é instável, de curta duração, e reversível, comparada à induzida por compostos OF, resultando em uma enzima livre e ativa. Assim, a inibição cumulativa da atividade da colinesterase por exposições repetidas normalmente não ocorre (Maroni *et al.*, 2000). A Figura 9 mostra as estruturas da acetilcolina com o aldicarb, um carbamato.

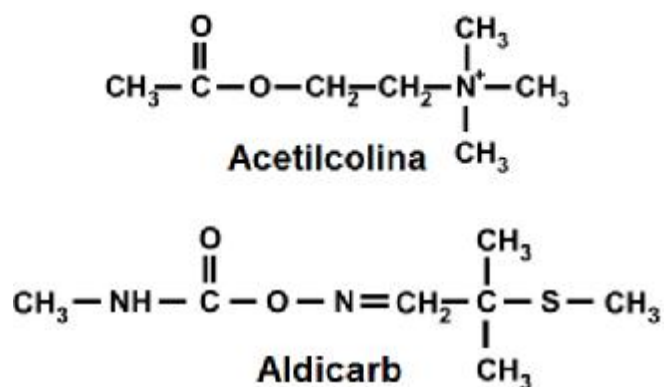


Figura 9: Estrutura da acetilcolina e do aldicarb (Rand, 2007).

A taxa de reativação da colinesterase inibida varia muito, assim, quando a enzima é acetilada é de aproximadamente 150 microssegundos, carbamilada de 15-30 min e fosforilada de minutos a dias. A taxa de reativação da enzima inibida também depende do tipo de tecido assim como do grupo químico ligado à enzima (WHO, 1986). A reativação da AChE inibida pode ser induzida por alguns agentes e este fato fornece oportunidades para a terapia. Compostos com o grupo oxima reativa a enzima fosforilada muito mais rápido do que a água, por ser um potente nucleofílico, e podem ser utilizados na reversão dos sintomas de intoxicação por OF (Reiner & Simeon-Rudolf, 2006).

Devido à grande estabilidade da reação da colinesterase com os OF em comparação com os CAR, a dose de um inseticida OF que gera mortalidade e aquela que produz o mínimo de sintomas de intoxicação é substancialmente menor do que a dose de inseticidas carbamatos (WHO, 1986). Muitos OF e CAR inibem a BChE mais rápido que a AChE, assim, a inibição da BChE é um indicador mais sensível de absorção para esses compostos (Reiner & Simeon-Rudolf, 2006). A fosforilação da serina no sítio ativo da AChE ou BChE por certos OF pode ser seguida de uma dealquilação (Figura 10). Essa reação, conhecida como “envelhecimento”, resulta na perda do grupo alquil do substituinte do fósforo, gerando uma carga negativa na porção ligada ao sítio ativo. Assim, a enzima torna-se permanentemente inativada (Moretto & Lotti, 2006; Sultatos, 2006).

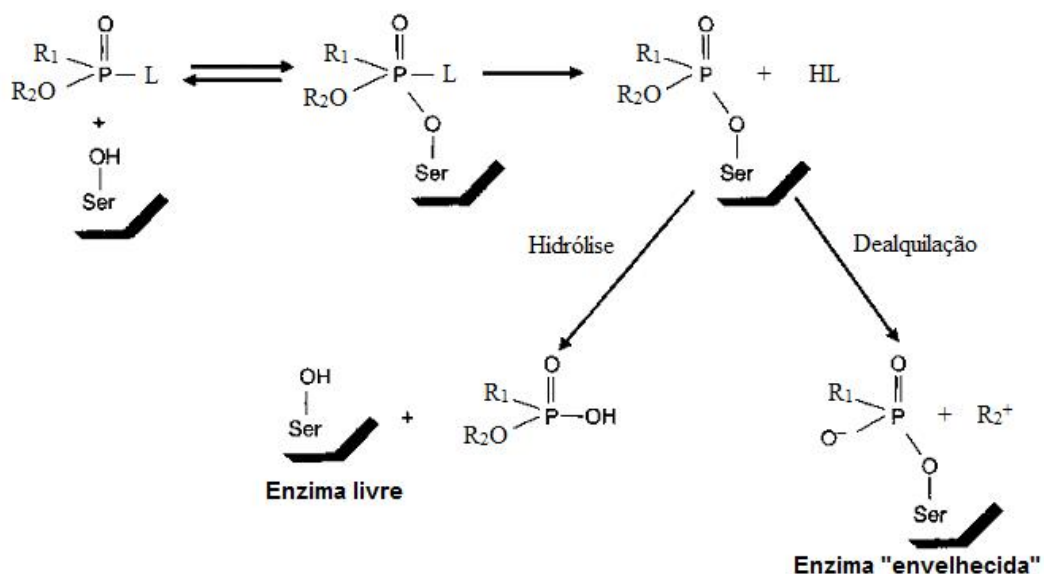


Figura 10: Reação da enzima, mostrando apenas o sítio catalítico com o resíduo serina e uma molécula de organofosforado, resultando na enzima livre ou “envelhecida” (modificado - Garcia *et al.*, 2006).

Ao contrário das colinesterases, as carboxilases e fosfolipases, tipos de esterases, não “envelhecem” (Masson *et al.*, 2010). Essa reação tem grande significância na toxicologia devido à resistência à reativação por oximas. Assim, um paciente com a enzima “envelhecida” precisa esperar pela síntese de uma nova enzima, por um tempo maior para a AChE do que para a BChE (Sultatos, 2006). A nova produção da AChE é aproximadamente entre 60 e 120 dias e a da BChE é aproximadamente entre 7 e 60 dias (Fukuto, 1990; Jintana *et al.*, 2009; Stefanidou *et al.*, 2009).

Há evidências que o resíduo de histidina esteja envolvido no envelhecimento, resultando em uma ponte de sal, impedindo a reativação da enzima (Sanson *et al.*, 2009). O envelhecimento por pesticidas, tais como paraoxon ou etilciclofos pode levar dias para se completar, mas compostos como soman (organofosforado usado como arma de guerra) gera uma reação de “envelhecimento” em poucos minutos. A taxa de envelhecimento é modulada, também, pela temperatura e pH (Sanson *et al.*, 2009; Masson *et al.*, 2010).

As colinesterases podem estar alteradas por outros fatores, que não a exposição aos OF e CAR. O Quadro 1 mostra esses outros fatores e como eles alteram as atividades das enzimas, aumentando ou diminuindo-a.

Quadro 1: Fatores que podem estar envolvidos na alteração das enzimas AChE e BChE (Maroni *et al.*, 2000; Satoh, 2006).

	AChE	BChE
Redução da atividade	leucemia e neoplasma	disfunção hepática (cirrose); baixa concentração da enzima (malnutrição); neoplasia; insuficiência cardíaca; reações de hipersensibilidade, infecções agudas e anemias
	recém-nascidos	gravidez, menstruação, negros e deficiência genética da BChE
	-	o uso de drogas como codeína e morfina.
Aumento da atividade	leucocitose, talassemia, policitemia e qualquer alteração congênita no sangue	hipertireoidismo, condições de alta taxa metabólica
	-	homem (10-15%)

2.6 - SINAIS E SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO

A exposição humana aos OF e CAR gera inibição tanto da AChE como da BChE. Entretanto, devido a localização de cada enzima, os sinais e sintomas de intoxicação são associados apenas a inibição da AChE (Maroni *et al.*, 2000). A exposição humana à esses inseticidas afeta as transmissões colinérgicas, onde estão localizadas as AChE, podendo gerar sintomas que podem desenvolver-se rapidamente, ou após algumas horas, principalmente no caso de compostos mais lipofílicos, que necessitam de ativação metabólica. Os sintomas podem aumentar em gravidade por mais de um dia e durar por vários dias (Fukuto, 1990). Os sintomas de intoxicação aguda podem ser resumidos em três grupos, relacionados com a ligação dos receptores colinérgicos (WHO, 1986; Lotti, 2001; Satoh, 2006):

- *Manifestações muscarínicas:* aumento da secreção brônquica, sudorese excessiva, salivação, lacrimejamento, broncoconstrição, cólica abdominal, vômito, diarreia, bradicardia e etc.
- *Manifestações nicotínicas:* midríase, taquicardia, hipertensão, ataxia, fraqueza, tremor, palidez e etc.

- *Manifestações do sistema nervoso central (SNC):* dor de cabeça, tontura, agitação, ansiedade, confusão mental, convulsão, coma, depressão do centro respiratório e etc.

Todos os sintomas podem ocorrer em diferentes combinações e podem variar em tempo de início, seqüência e duração, dependendo da dose e da rota de exposição. Em intoxicações graves, insuficiência respiratória é o efeito dominante, envolvendo o SNC, podendo gerar até um edema pulmonar (WHO, 1986; Satoh, 2006). Já nas intoxicações leves, ou onde o composto é eliminado rapidamente, os sintomas podem regredir rapidamente, embora os níveis de AChE deprimida pode levar várias semanas para retornar aos níveis normais.

A exposição à alguns OF pode levar também a efeitos neurológicos tardios e persistir por vários meses, conhecido por neurotoxicidade periférica tardia ou síndrome intermediária, que ocorre depois da recuperação dos efeitos colinérgicos agudos (Lotti, 2001). O começo é caracterizado por dores musculares devido à câibras, seguido de parestesia (formigamento, queimação) e fraqueza nas pernas, com redução no reflexo. Em intoxicações severas, os membros superiores podem ser afetados e podendo desenvolver uma quadriplegia. Diclorvós, metamidofós, clorpirifós são alguns dos compostos já descritos na literatura que podem causar essa síndrome (Ballantyne & Salem, 2006), cujo mecanismo está relacionado ao envelhecimento de uma esterase de função ainda desconhecida, a esterase neurotóxica (Lotti, 2001; Grupta, 2006).

Adicionalmente, após sintomas agudos pela inibição da AChE, podem ocorrer efeitos neurocomportamentais, psicológicos e psiquiátricos, e comprometer algumas funções como cognição, vigilância, fala, memória, percepção e estado psíquico, aumentando a tendência à depressão, ansiedade e irritabilidade. Esses sintomas também podem estar associados à exposição crônica à baixas concentrações de OF e não estarem correlacionados à sintomas de exposição aguda. Isso pode ser devido ao tamanho das doses e aos intervalos entre elas superarem a ressíntese da AChE nos tecidos nervosos (Lotti, 2001, Ballantyne & Salem, 2006).

2.7 - CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICAS

A exposição ocupacional aos agrotóxicos pode ocorrer durante sua produção, transporte, distribuição, armazenamento e nos locais de uso. Durante o processo de fabricação a exposição pode ocorrer desde o composto inicial (matéria-prima) até o produto final, aquele que será colocado à venda. Essa exposição pode ser limitada por um bom controle de qualidade e por práticas de higiene industriais. O transporte não resulta em exposição direta, entretanto, podem ocorrer acidentes durante o carregamento e descarregamento do produto. A exposição no local de uso dependerá de uma variedade de fatores, incluindo propriedades físicas e químicas do pesticida (sólido, líquido, vapor de pressão e viscosidade), sua formulação e os constituintes da formulação, o modo de uso (líquido, pó, emulsão, aerossol) e modo de aplicação (aplicador manual, estático, puxado por trator ou de modo aéreo) (Ballantyne & Salem, 2006). Além disso, as pessoas também podem estar expostas aos pesticidas durante o controle de vetores de doenças, como chagas, febre amarela, esquistossomose e dengue, e no ambiente doméstico e rural (Jaga & Dharmani, 2003).

2.7.1 Características gerais do ambiente rural

É importante enfatizar que a aplicação de agrotóxicos no campo é uma atividade em que a contaminação do ambiente de trabalho é intencional, ou seja, provocada pelos agricultores (Pignati *et al.*, 2007). O uso de misturas de produtos agrotóxicos é uma prática comum. Delgado & Paugartten (2004) observaram que em todas as propriedades do estudo, diferentes produtos agrotóxicos eram diluídos e misturados em tanques para serem aplicados na lavoura. A maioria dos estudos, porém, não leva em consideração a interação dessas substâncias, que pode modificar o comportamento tóxico de um produto (Soares *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005; Faria *et al.*, 2009). Em alguns casos, o próprio produto comercial já possui em sua formulação uma mistura de pesticidas (Agrofit, 2011).

Segundo o Censo Agropecuário de 2006 (IBGE, 2006a), 87,4% dos proprietários dos estabelecimentos agropecuários no país são do sexo masculino. Faria *et al.* (2004) encontraram que os homens estão mais expostos aos pesticidas que as mulheres, provavelmente pelas atividades exercidas pelo homem estarem mais diretamente relacionadas com o uso dos pesticidas, sendo eles os que mais se intoxicam (Jaga & Dharmani, 2003; Levigard & Rozemberg, 2004). Do total de 2.061 intoxicações exógenas por agrotóxico de uso agrícola que ocorreram no país em 2011, 73,4% ocorreram no sexo masculino (MS, 2012), resultado semelhante ao encontrado por Pires *et al.* (2005) na análise de dados do Centro Integrado de Vigilância Toxicológica da Secretaria de Saúde do estado de Mato Grosso Sul no período de 1992 a 2002.

No Brasil, a maioria das pessoas que dirige os estabelecimentos agrícolas não sabe ler e/ou escrever, possui alfabetização de adulto ou ensino fundamental incompleto (IBGE, 2006a). Considerando os que não sabem ler ou possuem alfabetização de adultos, a maior parcela é do sexo feminino. Essa baixa escolaridade potencializa o risco de intoxicação. Existe no país um baixo número de pessoas que declararam possuir qualificação profissional, apenas 170 mil pessoas na agricultura familiar e 116 mil pessoas na não familiar. (IBGE, 2006a). A maioria dos agricultores de dois municípios do Piauí não sabe ou não domina a leitura, resolvendo dúvidas de seus trabalhos por meio de sua própria produção cultural de conhecimento (Gomide, 2005). Em uma população agrícola de Camocim de São Felix, Pernambuco, 41% dos agricultores são analfabetos (Soares *et al.*, 2003). Faria *et al.* (1999) encontraram em um trabalho realizado na Serra Gaúcha com 1.282 trabalhadores rurais, que quanto maior a escolaridade menor o risco de intoxicação. Num estudo posterior, Faria *et al.* (2009) encontraram que as chances de intoxicação dos que tem pelo menos 2º grau são 57% menores em relação àqueles que sequer acumularam esse grau de escolaridade.

A principal faixa etária dos agricultores no Brasil é entre 21 e 40 anos (Faria *et al.*, 1999; Araújo *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003; Delgado & Paugartten, 2004; Faria *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2005; Faria *et al.*, 2009). Porém, o trabalho infantil e de idosos muitas vezes está presente no campo (Moreira *et al.*, 2002; Sobreira & Adissi, 2003; Levigard & Rozemberg, 2004). Segundo a Norma Regulamentadora 31, emitida pelo Ministério do Trabalho e Emprego (Brasil, 2005), “é vedada a manipulação de quaisquer agrotóxicos, adjuvantes e produtos afins por

menores de dezoito anos, maiores de sessenta anos e por gestantes”. De acordo com o Censo Agropecuário 2006, existem 909 mil ocupados nos estabelecimentos de agricultura familiar com menos de 14 anos de idade (IBGE, 2006b). Moreira *et al.* (2003) encontraram que 52% das 76 crianças de uma região agrícola receberam algum tipo de treinamento para manipular agrotóxicos.

Faria *et al.* (2009) observaram considerável ingestão de álcool entre os trabalhadores rurais, sendo encontrada associação entre álcool e intoxicação. Eles encontraram, também, relação inversa entre escolaridade e alcoolismo. Fonseca *et al.* (2007) observaram que existe a crença no efeito protetor de bebidas alcoólicas influenciando no comportamento concreto dos trabalhadores, desprezando o uso de equipamentos de proteção individual (EPI). Os autores também relataram a crença entre os agricultores de que o leite corta o efeito do agrotóxico, o que não tem suporte científico.

2.7.2 Uso de equipamentos de proteção individual e aplicadores

A principal via de exposição ocupacional de trabalhadores no campo é por meio da absorção pela pele, sendo que em certas situações, como em altas temperaturas, a inalação pode, também, ser importante (WHO, 1986; Litchfield, 1988; Ecobichon, 2001; Timchalk, 2006). Existe uma alta probabilidade da pele não protegida ser contaminada acidentalmente durante a preparação das misturas, aplicação dos pesticidas e transferência de formulações (WHO, 1986). Em algumas regiões do Brasil foi observado que a maioria dos trabalhadores utilizam EPIs (Soares *et al.*, 2003). Entretanto, Fonseca *et al.* (2007), Gomide (2005) e Recena *et al.* (2006) observaram que apesar dos agricultores terem conhecimento e possuírem a percepção que os pesticidas podem trazer danos à saúde, o uso de EPI é negligenciado ou usados de maneira incorreta, principalmente devido ao incômodo em climas quentes, por dificultarem o trabalho, por custarem caro ou até por “desleixo” (Wattersom, 1988; Delgado & Paugartten, 2004; Ballantyne & Salem, 2006; Recena & Caldas, 2008; Alves *et al.*, 2009). Faria *et al.* (2004) demonstraram que o uso de EPI pode estar diretamente relacionado com o grau de escolaridade.

A exposição dérmica pode ocorrer também quando os trabalhadores que entram desprotegidos na plantação após a aplicação dos pesticidas (reentrada), durante a colheita e “raleio” (retirada de parte dos frutos em crescimento) (WHO, 1986; Watterson, 1988; Ballantyne & Salem, 2006). De acordo com a NR-31, é vedado o trabalho em áreas recém-tratadas, antes do término do intervalo de reentrada estabelecido nos rótulos dos produtos, salvo com o uso de equipamentos de proteção recomendado (Brasil, 2005). Faria *et al.* (2009) relataram que cuidado no uso de EPI quase nunca ocorreu nessas situações na região de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. No Piauí, Gomide (2005) reportou que os agricultores acham que o perigo à saúde está no procedimento de aplicação do agrotóxico, não sendo perigoso depois que estiver no cultivo e disperso no ambiente. Fonseca *et al.* (2007) relataram que os agricultores entrevistados na região de Barbacena, Minas gerais, disseram que se o serviço é “rapidinho” é natural não usar EPI e quem não se expõem frequentemente também não precisa usar proteção, percepção que subestima os riscos da exposição a estes produtos.

Alguns agricultores podem desenvolver medidas alternativas de proteção incluindo panos em baixo do chapéu ou lenços molhados sobre o nariz e boca, que não garantem sua proteção (Recena & Caldas, 2008). Segundo Soares *et al.* (2003, 2005) um trabalhador rural desprotegido tem a chance de se intoxicar aumentada em 72 a 93%. Faria *et al.* (2004) observaram o uso reduzido de EPI pelos idosos, resultado também encontrado num estudo realizado na Grécia (Damalas & Hashemi, 2010). No Mato Grosso do Sul, alguns trabalhadores acreditam que em dias muito quentes ou com muito vento não adianta determinados cuidados, como o uso de luvas e botas (Recena & Caldas, 2008).

De acordo com o Censo Agropecuário 2006, há um predomínio no uso de pulverizador costal para aplicação de pesticidas no Brasil, seguido do equipamento com tração mecânica e/ou animal (IBGE, 2006a). O uso freqüente de aplicador costal foi observado também por Soares *et al.* (2005) e Alves *et al.* (2009). A tecnologia utilizada na aplicação de agrotóxico pode afetar os níveis de exposição nos trabalhadores (Ramos *et al.*, 2002). Faria *et al.* (1999) encontraram que os trabalhadores com maior mecanização possuem risco reduzido de intoxicação e quanto maior a propriedade, maior a mecanização. Segundo Soares *et al.* (2005), o uso de pulverizador costal manual aumenta a probabilidade de intoxicação. Adicionalmente, o tamanho das gotas pulverizadas afeta a exposição dos

agricultores (Ballantyne & Salem, 2006; Cunha, 2008) e uma alternativa encontrada por Cunha *et al.* (2003) foi a adição de óleo vegetal à calda de pulverização, o que aumenta o tamanho das gotas e diminui a exposição aos pesticidas. A conservação, manutenção, limpeza e utilização dos aplicadores só deverão ser realizadas por pessoas previamente treinadas e protegidas (Wattersom, 1988; Brasil, 2005). A inspeção nos EPI e aplicadores e os reparos devem ser feitos periodicamente e os EPI devem ser substituídos de acordo com as instruções de uso ou sempre que houver necessidade (Wattersom, 1988; Ballantyne & Salem, 2006).

2.7.3 Higiene e embalagens vazias

A ingestão de agrotóxicos não é um problema de grande magnitude na lavoura, desde que a pessoa tenha higiene pessoal e mantenha os alimentos de consumo próprio longe dos pesticidas. Ela ocorre principalmente com a ingestão de saliva contaminada da respiração. O contato com os olhos pode ocorrer acidentalmente durante o manuseio do agrotóxico, podendo resultar em toxicidade local e sistêmica (Ballantyne & Salem, 2006). Delgado & Paugartten (2004), observaram boas práticas de higiene (não comer, beber ou fumar) após a aplicação de pesticidas no município de Paty Alfredo, Rio de Janeiro. Recena *et al.* (2006) observaram correlação significativa entre lavar as mãos e sintomas de intoxicações relatados pelos trabalhadores de Culturama, Mato Grosso do Sul.

De acordo com a legislação brasileira, os usuários dos agrotóxicos deverão devolver as embalagens vazias aos estabelecimentos comerciais onde foram compradas no prazo de até um ano, contado da data de compra, ou prazo superior, se autorizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, podendo a devolução ser intermediada por postos de coleta, desde que autorizados e fiscalizados pelo órgão competente. As embalagens que contiverem formulações miscíveis ou dispersíveis em águas deverão ser submetidas à tríplice lavagem, ou tecnologia equivalente. Fica a cargo da empresa produtora o destino final das embalagens devolvidas pelos usuários (Brasil, 1989). Apesar de um número considerável de estabelecimentos deixar as embalagens vazias espalhadas no campo, jogar no rio, queimar ou enterrar (Araújo *et al.*, 2000; Delgado & Paugartten ,

2004; Castro & Confalonieri, 2005; Soares *et al.*, 2005), a coleta seletiva gerenciada pelo Instituto nacional de Processamento de Embalagens Vazias (INPEV), criado em 2002, está crescendo (IBGE, 2006b; Faria *et al.*, 2009). De acordo com Soares *et al.* (2005) a destinação das embalagens vazias ao sistema de coleta de lixo diminui as intoxicações em 14%.

2.7.4 Receituário agrônômico

A legislação brasileira prevê que os agrotóxicos só podem ser adquiridos com a apresentação de um receituário agrônômico (Brasil, 1989). Porém, vários estudos mostram que a maioria dos agricultores adquire esses produtos sem o receituário (Araújo *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2003; Gomide, 2005; Soares *et al.*, 2005) ou ignoram sua existência (Araújo *et al.*, 2000). Castro & Confalonieri (2005), encontraram que 85% dos 40 entrevistados não precisaram de receituário agrônômico para comprar agrotóxicos no município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro. O cálculo da dose do produto a ser aplicado deve ser feito de acordo com as recomendações do produto, mas muitas vezes, o agricultor segue a indicação do vendedor ou utiliza uma dosagem aleatória, baseada na própria experiência (Soares *et al.*, 2005).

Num estudo realizado por Alves *et al.* (2009), mesmo agricultores que receberam orientação quanto ao uso dos pesticidas, não seguiram essas orientações. Recena *et al.* (2006) observaram no Mato Grosso do Sul, que 74,1% dos 250 agricultores entrevistados recebiam informações sobre o uso de agrotóxicos diretamente dos revendedores do produto e que 90% deles gostariam de receber mais informações sobre o uso dos produtos, preferencialmente dos revendedores. Araújo *et al.* (2000) observaram que a quantidade de pesticidas utilizados pelos agricultores de Pernambuco variou de forma considerável, indicando falta de orientação especializada, contribuindo para a resistência às pragas.

Segundo o Censo Agropecuário de 2006, apenas 21,1% dos estabelecimentos que utilizaram agrotóxicos no país receberam orientação técnica regularmente, principalmente de cooperativas (76,7%) (IBGE, 2006b). Em Nova Friburgo, Rio de Janeiro, 47,8% dos 101 agricultores entrevistados relataram receber

treinamento para manipular agrotóxicos (Moreira *et al.*, 2002), um requerimento previsto na legislação brasileira (Brasil, 1989).

2.8 - EXPOSIÇÃO E INTOXICAÇÃO POR AGROTÓXICOS

Na maioria dos estudos conduzidos no Brasil, as taxas intoxicação ou efeitos adversos relatados pelos trabalhadores variaram entre 10 e 20% (Araújo *et al.*, 2000; Faria *et al.*, 2000; Faria *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2009), entretanto esses números podem ser maiores. Alves *et al.* (2009) observaram que 27% dos trabalhadores entrevistados já sofreram algum tipo de intoxicação por pesticidas em algum momento de suas vidas. No trabalho conduzido por Faria *et al.* (1999) esse número subiu para 61,6% de 1.283 trabalhadores rurais e houve uma forte associação entre intoxicação por agrotóxicos e transtornos psiquiátricos menores e intoxicação aguda e uso de remédios psiquiátricos. Delgado & Paugartten (2004) encontraram que 62% dos 55 trabalhadores entrevistados relataram ter passado mal ao preparar/aplicar pesticidas. Pires (2005) observou que 11,5% dos 126 agricultores da região de Culturama (MS) confirmaram transtornos psiquiátricos menores. Na serra gaúcha, esse percentual foi de 36% dos 1.479 participantes (Faria *et al.*, 2000).

Os sintomas relatados pelos agricultores nos vários estudos conduzidos no Brasil incluem dor de cabeça, enjôo, tonteira, irritação, vômito, alergia, diminuição da visão, febre, prurido na pele, olhos e nariz; dor nas articulações, formigamento nos membros superiores, alterações de sono, lacrimejamento e suor excessivo (Araújo *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2002; Delgado & Paugartten 2004; Faria *et al.*, 2004). Num estudo com 1.379 agricultores de dois municípios da serra gaúcha, Faria *et al.* (2005) identificaram associações entre exposição aos agrotóxicos e aumento de sintomas respiratórios, principalmente asma.

É difícil definir os limites geográficos e temporais da exposição a agrotóxicos, principalmente na agricultura familiar, onde os trabalhadores vivem no local de trabalho (Faria *et al.*, 2007). A exposição indireta de familiares dos agricultores, não diretamente envolvidos com agrotóxicos, também chamada de secundária ou paraocupacional, pode ocorrer devido à poeira contendo estes produtos levados para casa por meio das roupas, pele e vento (Jaga & Dharmani, 2003). Peres e

Moreira (2007) citam o fato de muitos agricultores e suas famílias desconsiderarem os riscos relacionados ao auxílio nas atividades do campo que não lidam diretamente com os agrotóxicos, incluindo “puxada de mangueira” e lavagem de roupas e equipamentos utilizados na pulverização. Faria *et al.* (2004) observaram que o único trabalho no qual as mulheres estavam mais expostas aos pesticidas que os homens era por meio da lavagem das roupas.

Uma população crítica à exposição secundária aos agrotóxicos é a de crianças. Estes produtos são frequentemente armazenados em lugares acessíveis às crianças, a zona de respiração é perto do chão, aumentando, assim, a exposição por essa via. Faz parte dessa fase da vida engatinhar e brincar no chão, expondo a pele e seus brinquedos, que posteriormente serão usados por elas. As crianças também têm a tendência de lavar menos as mãos antes de comer e a usar menos os talheres (Moffett, 2006). Lu *et al.* (2004) encontram resíduos dos OF clorpirifós e azinfos metil nas mãos e brinquedos de crianças de uma região agrícola, mas não naquelas de uma região metropolitana. De 1.574 casos de intoxicação entre crianças de até cinco anos de idade registrados em boletins de emergência hospitalar na região metropolitana do Rio de Janeiro, 15% estavam relacionados a algum tipo de pesticida (Werneck & Hasselmann, 2009).

Aqueles que moram próximos ou em cidades/vilas próximos a um local de plantio também podem estar expostos aos pesticidas (Ballantyne & Salem, 2006). Um estudo conduzido em uma área de produção frutífera de Washington, Estados Unidos, a poeira que se depositava na casa foi considerada a maneira de avaliar a acumulação de pesticidas nas residências. A média de poeira encontrada nas casas das famílias da região agrícola foi sete vezes maior que a das famílias de referência, que não faziam uso de pesticida e que moravam à 400 metros, ou mais, de uma plantação. A média da concentração dos metabólitos de OF na urina em crianças da região agrícola foi cinco vezes maior que nas crianças de referência (Lu *et al.*, 2000). Resultados parecidos também foram encontrados por Fenske *et al.* (2002). Metabólitos de OF na urina também foram encontrados por Griffith *et al.* (2011) em 44 crianças de 2 a 5 anos de idade, sendo a maior quantidade encontrada nos períodos de aplicação dos pesticidas nos pomares. Um estudo realizado na Califórnia (USA) encontrou metabólitos de OF na urina de mulheres grávidas da região que não eram agricultoras (Castorina *et al.*, 2003).

Oliveira & Gomes (1990) avaliaram que houve exposição aos inseticidas OF de 17 pessoas em Petrópolis, Rio de Janeiro, que moravam perto de estufas. Os sintomas apresentados após a data da aplicação dos agrotóxicos incluíram tosse, cefaléia, dor abdominal, lesões na pele, tonteira, diarreia, lacrimejamento e sialorréia. Em 2006 no estado do Mato Grosso, uma “chuva” de agrotóxico durante a aplicação desses produtos no campo extrapolou a unidade produtiva, com provável contaminação do ar, mananciais de água, solo e das plantas, animais e população da cidade (Pignati *et al.*, 2007).

Abortos espontâneos e má formação ao nascer podem estar relacionados à exposição aos agrotóxicos (Restrepo *et al.*, 1990). Araújo *et al.* (2000) encontraram que 70,6% das mulheres entrevistadas em Pernambuco relataram perda de feto e 39,4% revelaram ter perdido um filho com menos de um ano de vida. Apesar da alta porcentagem, não foi informado o número de mulheres nesse trabalho e as condições de exposição, necessitando mais investigações sobre o assunto. O OF endossulfan pode atravessar a barreira placentar de ratas expostas e ser eliminado pelo leite materno (Autrup, 1993; Assis *et al.*, 2011). Gibson & Koifmam (2008) encontraram evidências de que a exposição ambiental aos agrotóxicos gera um declínio significativo nos nascimentos masculinos, sendo utilizados dados do IBGE de 1985 e do período de 1994 a 2004 em 399 municípios paraenses.

2.9 - COMUNICAÇÃO E PERCEPÇÃO DE RISCO

Oliveira-Silva *et al.* (2001) reportaram que 64% dos 300 trabalhadores rurais entrevistados em Majé (RJ) não faziam leitura dos rótulos. Recena & Caldas (2008) observaram que os agricultores de Culturama (MS) não estavam familiarizados com os pictogramas desenhados no rótulo dos produtos e apesar de saberem que a tarja vermelha indica um produto mais tóxico, eles não souberam hierarquizar as todas as cores com o grau de toxicidade. Moreira *et al.* (2002) observaram a importância do entendimento dos rótulos das embalagens de pesticidas para a prevenção de acidentes e sobre o que fazer em caso de contaminação. Sobreira & Adissi (2003) fazem referência à omissão dos fabricantes, que pouco discutem com os agricultores sobre as consequências da má utilização dos agrotóxicos.

Não só a linguagem dos rótulos deve ser observada, mas também como as informações são passadas aos agricultores por profissionais da saúde e técnicos (Recena & Caldas, 2008), visto que diferentes classes sociais podem ter compreensão diferente do que foi dito (Peres *et al.*, 2005b). Peres & Moreira (2007) observaram que a maneira como ocorre a comunicação pode levar à interpretação oposta ao real sentido da mensagem, e esse fracasso na comunicação pode levar o trabalhador à adoção de práticas perigosas. Adicionalmente, as informações não devem alcançar apenas os agricultores, mas também crianças e familiares (Moreira *et al.*, 2002). Segundo esses autores, a comunicação sobre os agrotóxicos é fundamental na determinação da intoxicação humana.

Nos ambientes rurais, deve haver uma ou mais pessoas que possuam conhecimento e suficiente treinamento em medidas de proteção e precaução contra os riscos dos agrotóxicos. Eles devem ser responsáveis pela supervisão diária dos trabalhadores rurais (Ballantyne & Salem, 2006). A educação e treinamento devem ser feitos periodicamente abrangendo pontos que inclui conhecimento sobre as rotas de exposição, sinais e sintomas de intoxicação, medidas de proteção e precaução, primeiros socorros que podem ser feitas no localmente, alertas relacionados aos perigos para a saúde e o meio ambiente (Ballantyne & Salem, 2006).

De acordo com Fonseca *et al.* (2007), o mais importante não seria o risco relacionado aos agrotóxicos, mas a percepção da situação de risco, envolvendo interpretações, avaliações e julgamentos (Fonseca *et al.*, 2007), ou seja, entender como uma população pensa e responde ao risco real (Slovic, 1987). Portanto, a percepção do risco é defendida como uma estimativa da quantificação do risco real apresentado por uma certa população (Slovic, 1987). Castro & Confalonieri (2005) observaram que nenhum dos 40 agricultores entrevistados incluiu os agrotóxicos como um dos problemas vivenciados por eles na região do município de Cachoeira e Macacu (RJ). Recena *et al.* (2006) reportaram que apenas 20,8% dos 250 de Culturama acham que os agrotóxicos são prejudiciais aos moradores de cidades/vilarejos perto das áreas de plantio.

Kauabenan (1988) mostrou que as crenças e práticas sociais influenciam na percepção que se pode ter do risco e que as pessoas possuem um conhecimento limitado sobre os reais riscos, podendo levar à subestimação dos possíveis danos. Adicionalmente, quando a percepção do risco de uma população difere da avaliação de profissionais (técnicos, agrônomos, etc.) pode ocorrer o insucesso das

estratégias de intervenção rural (Peres *et al.*, 2005b). A percepção do risco pode ter diferentes amplitudes, pois quando é o próprio agricultor que se expõe ao agrotóxico, o risco é tido por eles como controlável. Entretanto, se seus filhos se expõem o risco já é desconhecido e incontrolável (Fonseca *et al.*, 2007). Há também o conceito de que os agricultores são fortes, não lhes causando problemas sérios, mas podem causar problemas à saúde para as outras pessoas (Peres *et al.*, 2005b). O conhecimento e familiaridade com os agrotóxicos são associados à experiência, e assim, a existência de baixo risco. Portanto, a tentativa de implantação de novas tecnologias às vezes é rejeitada por eles por acharem desnecessários e por aumentarem o risco (Fonseca *et al.*, 2007).

2.10 - REGULAMENTAÇÃO

Visando controlar o uso de pesticidas e proteger a saúde humana e o ambiente, os governos devem regulamentar o seu uso. Sri Lanka tem uma política de restrição do uso de pesticidas mais tóxicos desde os anos 1970. Roberts *et al.* (2003) analisaram os registros dos hospitais da região de 1986 a 2000 e concluíram que apesar de ter aumentado o número de casos de intoxicações por pesticidas, a taxa de letalidade diminuiu. Os autores sugerem que futuros programas de regulação de uso de pesticidas devam incluir o uso mínimo de pesticidas, o controle por meio de agentes menos danosos, reduzir o armazenamento de pesticidas dentro das casas e estimular o uso de equipamentos de proteção individual. No Brasil, o programa de reavaliação de agrotóxicos da ANVISA tem concluído pela retirada de pesticidas considerados muito tóxicos, como o OF metamidofós (RDC 1/2011; ANVISA, 2011), o mais utilizado no país (Rebelo *et al.*, 2010).

Garcia *et al.* (2005) não identificaram melhoria expressiva na classificação toxicológica dos agrotóxicos no país após 10 anos de promulgação da Lei de agrotóxicos no Brasil (1989), recomendando a reavaliação periódica obrigatória de todos os produtos registrados. Segundo os autores, nenhuma regulamentação, por melhor que seja, protegerá a saúde dos agricultores, se as circunstâncias desses indivíduos e de suas vidas não forem levadas em consideração. A lei dos agrotóxicos também é prejudicada pela falta de recursos para fiscalizar e pela

ausência de autoridades para aplicar penalidades e sanções. Nas pequenas e médias propriedades, onde se localizam trabalhadores não capacitados tecnicamente e precários em assistência técnica, a fiscalização costuma ser sensível à precariedade social não aplicando a lei com rigor (Sobreira & Adissi, 2003).

2.11 - BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS

O monitoramento biológico é a medição de biomarcadores em tecidos e fluidos corporais a fim de avaliar a exposição e risco para a saúde de um grupo de substâncias ou uma em particular, em comparação com uma apropriada referência (WHO, 1986). Existem três tipos de biomarcadores: exposição, efeito e susceptibilidade. O biomarcador de exposição é uma substância exógena, seu metabólito ou produto da interação entre o agente xenobiótico e alguma molécula alvo ou célula que é medido no organismo. O biomarcador de efeito é um parâmetro biológico que reflete a interação com uma substância exógena, podendo ser associada a um comprometimento da saúde ou doença. O de susceptibilidade é um indicador de uma habilidade inerente ou adquirida de um organismo para responder a exposição à uma substância específica (WHO, 1993; Amorin, 2003). Biomarcadores são utilizados para diagnóstico clínico para confirmar uma intoxicação (aguda ou crônica), avaliar a efetividade de um tratamento e avaliar um prognóstico de um caso individual. (WHO, 1993). Em um contexto ocupacional, biomarcadores fornecem um meio complementar para rever a adequação das medidas de proteção, incluindo as práticas e condições de trabalho (WHO, 1993).

A atividade de AChE e BChE são biomarcadores de efeito da exposição à inseticidas OF e CAR e fornecem uma avaliação global das diferentes rotas de exposição as quais o indivíduo foi submetido (Maroni *et al.*, 2000). No Brasil, o Ministério do Trabalho editou uma Norma Regulamentadora (NR-7) que estabelece biomarcadores da exposição ocupacional a 26 agentes químicos, incluindo inseticidas OF e CAR (Brasil, 1978). Para esses compostos, uma inibição maior que 30% para a AChE indica uma exposição excessiva e isso pode ser associado à efeitos adversos. Adicionalmente, quando a BChE esta deprimida em 50% ou mais indica uma exposição excessiva (Quadro 2). A porcentagem de inibição pode variar

de acordo com os diferentes órgãos regulamentadores ou de acordo com diferentes autores (Quadro 2).

Quadro 2: Relações sugeridas de níveis de inibição da AChE e BChE com significados e/ou ações a serem tomadas.

% inibição BChE	% inibição AChE	Significado e/ou ações a serem tomadas	Referência
> 50%	> 30%	O trabalhador deverá ser afastado do local de trabalho até que seja normalizado o indicador biológico, mesmo sem qualquer sintoma ou sinal clínico.	Brasil, 1978
20-25%	20-25%	Diagnóstico de exposição, mas não necessariamente um sinal de perigo	WHO, 1986
30-50%	30-50%	Indicação para remover o trabalhador do local de contato com o inibidor da colinesterase	
20%	20%	Inibição em comparação à um período de não exposição. Avaliar as práticas do trabalhador no local de trabalho para identificar e corrigir possíveis fontes de exposição a pesticidas	Brown <i>et al.</i> , 2006; DOSH, 2010
> 40%	> 30%	Inibição em comparação à um período de não exposição. Remover a pessoa do local de trabalho onde ocorre a exposição aos CAR ou OF, avaliar as práticas de trabalho para identificar o a potencial fonte de exposição	
-	≤ 30%	Inibição em comparação com o período de não exposição. Requer o monitoramento do local de trabalho e da saúde	Maroni <i>et al.</i> , 2000
-	≤ 50%	Inibição em comparação com a população em geral. Requer o monitoramento do local de trabalho e da saúde	Maroni <i>et al.</i> , 2000
-	> que os indicadores anteriores	Requer remoção temporária do trabalhador do local de exposição	

Para se avaliar o nível de exposição à OF e CAR, alguns autores comparam as atividades enzimáticas médias de um grupo em estudo no período de exposição e não exposição e/ou grupo de referência ou fazem cálculos do ponto de corte de acordo com os resultados encontrados nas análises das enzimas de população não exposta ou de referência (Oliveira-Silva *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002; Peres *et al.*, 2005b; Pires, 2005).

Como a variação inter-individual do biomarcador é grande em comparação com a variação intra-individual, a análise de amostras pareadas (antes e após a exposição) pode aumentar consideravelmente o poder dos biomarcadores para

detectar a exposição (WHO, 1993). A variação inter-individual da atividade da AChE BChE é de 10-18% e 15-25%, respectivamente, e a variação intra-individual de 3-7% e cerca 6%, respectivamente (WHO, 1986; Maroni *et al.*, 2000). Alguns estudos sugerem que a os níveis basais da atividade enzimática acontece de 30-60 dias depois da exposição aos inibidores da colinesterase (Midtling *et al.*, 1985; Cocker *et al.*, 2002, DOSH, 2010). Entretanto, em algumas situações, devido ao uso constante de agrotóxicos, pode ser difícil coletar amostras de pré-exposição. Como alternativa, Faria *et al.* (2007, 2009) utilizaram um período de pouco uso de pesticidas como período de não exposição à estes compostos.

Em um trabalho conduzido em Minas Gerais, Soares *et al.* (2003) utilizaram o kit Lovi-Bond[®] um para avaliar a atividade da BChE, que é expressa em porcentagem da atividade de 0 a 100%. A atividade enzimática inferior a 75% indica uma provável intoxicação por organofosforados e carbamatos. A variável “último contato” foi dicotomizada como “0” (15 dias ou mais de contato) e “1” (menos de 15 dias). Segundo os autores, aproximadamente 50% dos indivíduos (n=1.064) estavam provavelmente intoxicados, ou seja, 75% ou menos de atividade da BChE. Os números podem ser divididos em 388 (36,5%), 132 (12,4%) e 14 (1,3%) para indivíduos com nível de atividade de 75%, 62,5% e 50%, respectivamente.

Faria *et al.* (2009) dividiram os trabalhadores entre período com pouca exposição (junho-junho de 2006) e em período de exposição intensa (novembro-dezembro de 2006) aos agrotóxicos. Os autores avaliaram somente a BChE, porém o método de análise não foi informado. Apenas um trabalhador, de um total de 241, apresentou inibição acima de 50%, entretanto ele não preencheu o critério para estar intoxicado, pois não relatou sintomas ocasionados por inibidores da colinesterase, exposição anterior à OF, possuía hepatite B e alto consumo de álcool. Três trabalhadores apresentaram uma redução de pelo menos 20% da enzima.

No estudo conduzido por Moreira *et al.* (2002), o monitoramento biológico foi realizado por meio da análise da AChE e BChE (método de Ellman, 1961, modificado). O parâmetro de ponto de corte para adultos (n=101) foi calculado de acordo com uma população de referência e para crianças e adolescentes (n=76), valores de referência foram considerados equivalentes à $\geq 75\%$ inibição em relação aos valores obtidos em uma população de referência utilizando o kit EQM[®]. Foram encontrados 11 trabalhadores com baixa atividade da AChE e 12 com baixa atividade da BChE. Adicionalmente, foram encontradas 17 crianças com baixa

atividade da BChE. Os autores inferiram que as crianças do sexo feminino teriam 4,2 vezes maior probabilidade de apresentar níveis reduzidos de colinesterase.

No estudo conduzido por Pires (2005) no Mato Grosso do Sul com 126 indivíduos, as amostras de sangue foram coletadas em um período considerado de exposição, durante a safra de algodão e soja, e em um período de não exposição, 90 dias após o último contato com agrotóxicos. AChE e BChE foram analisadas pelo método de Ellman modificado por Oliveira-Silva *et al.* (2000) e o parâmetro de ponto de corte foi calculado de acordo com um grupo controle. Do total de participantes, 28 foram considerados como grupo controle por não terem contato com agrotóxicos, não terem plantado durante o período de safra e não terem apresentado redução nas atividades das enzimas. Quinze agricultores foram considerados extremamente expostos apenas pela redução da AChE, 7 pela redução da BChE e 2 por ambas as enzimas. Dos 24 agricultores que estavam extremamente expostos, 5 confirmaram distúrbios psiquiátricos menores e a indicação do “efeito rebote”, que é descrito como o aumento da atividade da enzima no período de exposição em comparação como período de não exposição. Utilizando a mesma metodologia de análise enzimática e o grupo controle como parâmetro de ponto de corte, Oliveira-Silva *et al.* (2000) encontraram que 2 dos 55 indivíduos avaliados em Magé (RJ) foram considerados intoxicados, levando em consideração a BChE, e 23 em relação à AChE.

Nos estudos descritos, o número de pessoas consideradas intoxicadas variou bastantes, sendo de 0,4% a 50,2% do total de participantes que doaram sangue em cada trabalho (Oliveira-Silva *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003; Pires, 2005; Faria *et al.*, 2009). Existe, também, uma grande variedade de métodos de análise das colinesterases e pontos de corte. O método de análise pode ser selecionado de acordo com a viabilidade econômica do projeto e por meio da sensibilidade e procedimentos inerentes ao método, visto que em trabalhos nos quais existam grandes distâncias a ser percorrida, o método Oliveira-Silva (2000) pode ser uma boa escolha, visto que é possível congelar as amostras e analisá-las posteriormente. O *kit Lovi-Bond*, utilizado por Soares *et al.* (2003) foi descrito como de menor especificidade quando comparado com outros, mas seu uso é bastante difundido por ser barato. Adicionalmente, com as várias possibilidades de ponto de corte, uns sendo mais conservadores que outros, o uso de mais de um método na análise dos dados pode enriquecer o trabalho.

3 - OBJETIVOS

3.1 - GERAL

Avaliar o perfil da exposição aos agrotóxicos na população de Goianópolis e do Núcleo Rural Taquara e relacionar esse perfil com a alteração observada na atividade das enzimas colinesterásicas.

3.2 - ESPECÍFICOS

- Caracterizar as populações de estudo;
- Analisar o conhecimento, as atitudes e as práticas em relação ao uso de pesticidas de agricultores dessas duas comunidades;
- Avaliar a exposição aos agrotóxicos desses agricultores e seus familiares por meio da análise sanguínea da AChE e da BChE;
- Identificar fatores de riscos para a saúde e meio ambiente decorrentes da utilização de agrotóxicos entre os agricultores dessas regiões.

4 - MÉTODOS

4.1 - POPULAÇÃO DE ESTUDO

A maior área cultivada com tomate no Brasil é na região do Centro-Oeste, sendo o estado de Goiás um dos principais produtores (CNPH; Latorraca *et al.*, 2008). O município de Goianápolis, com 162.38 Km², tem cerca de 11.000 habitantes, sendo que cerca de 40% dessa população tem como atividade principal o cultivo dessa hortaliça em 28 áreas de plantio (Santos & Noronha, 2001). Nessa região, a área de plantio tem aproximadamente 1-2 hectares e é composta de 9-10 trabalhadores. Adicionalmente, em 2006, dados do IBGE indicaram um total de 1.824 estabelecimentos no DF com agricultura familiar envolvendo um total de 6.473 agricultores. Essas famílias estão distribuídas principalmente nas cidades satélites do DF e possuem o apoio da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Distrito Federal – EMATER/DF. Taquara é uma dessas áreas apoiadas pela EMATER, com 318 áreas registradas e 1.100 agricultores. Cada área de plantio tinham de 5-13 agricultores. Os trabalhadores de ambas as áreas, Goianápolis e Taquara, estão expostos aos agrotóxicos o ano todo, visto que quando uma plantação terminava eles começavam a trabalhar em outra área ou reiniciava o ciclo, normalmente com outro cultivo. A Figura 11 mostra a localidade de Brasília em relação à Goianápolis e Planaltina, cidade satélite onde se localiza Núcleo Rural Taquara.

O processo de recrutamento dos participantes do estudo não obedeceu a um cálculo estatístico e a amostragem foi por conveniência, caracterizada por uma busca exaustiva por participantes no período do estudo (maio 2009 a junho 2011). O estudo foi iniciado em Goianápolis por meio de conversas com profissionais da Secretaria de Saúde da região e de uma empresa da região, da qual os agricultores compravam as mudas para o plantio. No total, 21 áreas de plantio foram contatadas por telefone, por meio de seus gerentes, cujos contatos foram fornecidos pela empresa de mudas. Desse total, apenas 2 gerentes concordaram em participar da nossa pesquisa, totalizando 18 agricultores. O critério para inclusão do agricultor na

pesquisa foi o de fazer uso direto de agrotóxicos, incluindo durante o preparo da “calda” e sua aplicação.



Figura 11: Localização de Goianópolis e Planaltina (Google Maps, 2012).

Devido ao pequeno número de pessoas que aderiram ao projeto em Goianópolis, resolvemos expandir o trabalho para o Núcleo Rural Taquara. Essa área foi escolhida pelo fato de ser atendida pela EMATER, parceira em outros trabalhos do Laboratório, e também ser uma produtora importante de tomate. Nosso primeiro contato com os agricultores dessa região foi por meio de um evento organizado pela EMATER, no qual 30 agricultores concordaram em participar da pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, responderam o questionário e nos deram o contato para a continuação da pesquisa mais adiante. Posteriormente, conseguimos o contato de mais 112 agricultores por meio da EMATER, dos quais 30 não conseguimos contatar, 10 não estavam mais envolvidos em atividades agrícolas, 6 não quiseram participar da pesquisa e 2 não moravam mais em Taquara. No total, 98 agricultores Núcleo Rural Taquara aderiram ao projeto. Estes agricultores ocupavam 38 áreas de plantio, das quais 23 de agricultura familiar. Adicionalmente, 17 familiares que não estavam em contato direto com os agrotóxicos concordaram em participar do estudo (residentes).

O grupo controle totalizou 64 indivíduos, também numa amostragem por conveniência. Estes indivíduos foram recrutados entre moradores ou trabalhadores da região de Taquara e que não tinham contato direto ou indireto com pesticidas

inibidores da colinesterase, incluindo funcionários da EMATER, da escola local, cooperativa e no posto de saúde. Adicionalmente, trabalhadores de duas plantações de grama foram incluídos por obedecem ao critério de seleção para este grupo.

4.2 - ESTUDO CAP (CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICAS)

Os conhecimentos, atitudes e práticas dessas regiões foram acessadas por meio da aplicação de um questionário (Anexo A). Ele foi obtido de outro estudo conduzido pelo laboratório (Recena *et al.*, 2006) e modificado de acordo com as características locais, observadas em visitas prévias às regiões. O questionário contém 59 questões objetivas (sim/não e múltipla escolha) e duas subjetivas (relacionado ao uso de medicamentos e sintomas adversos/intoxicações depois do uso de agrotóxicos).

Os questionários foram aplicados por pesquisadores previamente treinados. Antes de sua aplicação, foram explicados ao trabalhador rural os objetivos do projeto, e com a concordância de participação, o trabalhador assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos B e C para Goianópolis e Taquara, respectivamente). Durante a aplicação do questionário, foi possível obter informações adicionais com o objetivo de conhecer melhor a realidade local. A linguagem usada era sempre a mais parecida com a que eles usavam e gírias locais eram incorporadas à medida que o trabalho era feito, com intenção de se aproximar o máximo possível da comunidade.

Os dados obtidos dos questionários foram transferidos para o programa Epiinfo Software, 2000 (*Epidemiological Program Office*, CDC, Atlanta, Geórgia) e o teste Qui-quadrado ou de Fisher foram usados para as análises estatísticas desses dados, feitos no programa IBM SPSS *Statitics* versão 19 para Windows.

4.3 - COLETAS DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Todos os agricultores, familiares e os participantes do grupo controle foram convidados a doar amostras de sangue para avaliar a atividade das colinesterases. Duas amostras de sangue foram coletadas dos agricultores, uma durante o período de exposição (até cinco dias depois de ter usado um inseticida OF e/ou CAR) e outra durante o período de não exposição (mais de 15 dias sem usar nenhum desses inseticidas). As amostras de sangue dos familiares foram coletadas no mesmo momento da coleta dos agricultores. Uma terceira amostra foi coletada de ambos os grupos em uma dessas vezes para avaliar disfunções renais e hepáticas, analisadas pelo Hospital Universitário de Brasília (HUB). Duas amostras de sangue foram coletadas dos participantes do grupo controle, uma para análise das colinesterases e outra para análise dos parâmetros hepáticos e renais pelo HUB.

Todas as amostras de sangue para análise das colinesterases foram coletadas em tubos à vácuo da marca Vacuette[®] com EDTA, anticoagulante. Já as amostras destinadas ao HUB foram coletadas em tubos contendo gel separador da marca Vacuette[®]. Na região de Goianópolis essas amostras foram coletadas por profissionais da Secretaria de Saúde da região. Já em Taquara, elas foram coletadas pela farmacêutica envolvida na pesquisa. Elas foram armazenadas e transportadas em isopor com refrigeração até a chegada ao Laboratório de Toxicologia, localizado na Universidade de Brasília.

Assim que as amostras com EDTA chegavam ao laboratório elas eram centrifugadas e processadas para posterior análise, como descrito no item 4.5.2 adiante. Já as amostras destinadas ao HUB, eram centrifugadas para a separação do plasma e dos eritrócitos pelo gel e armazenadas à $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. No dia seguinte eram levadas ao HUB até às 8 da manhã para serem analisadas.

4.4 - PADRÕES E REAGENTES

Foram utilizados uma balança analítica da Bel Mark[®] modelo 210 A e semi-analítica da Bel Mark[®] modelo 2200; agitador de tubos PHOENIX[®] AD56; agitador

magnético modelo TE-085 da marca TECNAL[®]; pipetas automáticas de volumes variados das marcas Lab Mate[®] e Gilson[®]; pHmetro digital modelo PG1800 da marca GEHAKA[®]; centrífuga modelo 80-2B da marca CENTRIBIO[®]; centrífuga refrigerada modelo 380R da marca ROTINA[®]; espectrofotômetro UV-Visível UV-1650PC da SHIMADZU[®]; tubos cônicos de 15 mL da marca TPP[®]; microtubos de 2mL da marca Axygen[®]. Todo o material volumétrico utilizado, como balões e béqueres, eram de vidro e foram descontaminados com Extran[®] e caso tenha ocorrido contato com material biológico a descontaminação ocorreu com hipoclorito a 2% (MS, 1997). Ambas as descontaminações ocorreram por 12 horas seguidas, seguidas por enxague com água da torneira e, posteriormente, por água destilada.

Os padrões de iodeto de acetiltiocolina, iodeto de S-butiriltiocolina, albumina sérica bovina, ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DNTB) e cloridrato de L-cisteína monohidratada foram obtidos da Sigma-Aldrich[®]. Ácido clorídrico P.A., fosfato de sódio tribásico P. A. dodecahidratado e hidróxido de Sódio P.A. foram obtidos da Vetec[®] Quimica Fina e Folin-Ciocateau da Merck KGaA[®]. A água destilada foi obtida pelo sistema de purificação Millipore[®].

A solução de iodeto de acetiltiocolina (6,6mM), iodeto de S-butiriltiocolina (9,9mM), tampão fosfato 120mM em pH 7,6 (tampão de análise), tampão fosfato 20mM em pH 7,6 (tampão de lise), albumina sérica bovina (1mg/mL), cloridrato de L-cisteína monohidratada (1mM), ácido clorídrico 20% v/v, NaOH 25% m/v, foram preparadas com água destilada. As quatro primeiras foram armazenadas à 10 °C ± 3 °C, a albumina à -10 °C ± 3 °C, o restante à temperatura ambiente. A solução de DNTB (2mM) foi preparada com tampão de análise e estocado à 10 °C ± 3 °C.

4.5 - METODOLOGIA

4.5.1 Princípio das análises

AChE e BChE foram analisadas pelo método de Ellman modificado por Oliveira-Silva et al. (2000). A análise da atividade das colinesterases baseia-se na quantificação de ácido nitrobenzóico formado em solução de tampão de análise

(Figura 12). Após a formação de um grupo tiol pelas colinesterases (tiocolina) a partir da clivagem da acetiltiocolina ou butiriltiocolina, estes grupos se ligarão às moléculas de DTNB, formando moléculas de ácido nitrobenzóico livre e resíduos. A solução de tampão de análise tem por função manter o pH estável para um melhor desempenho das enzimas.

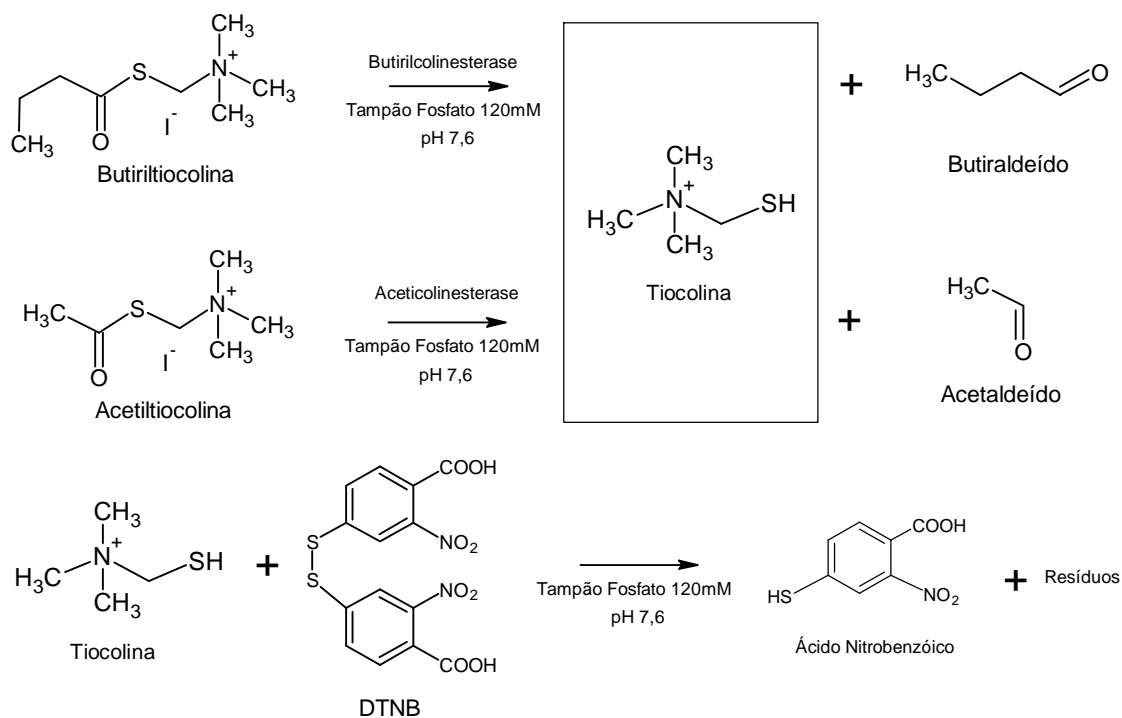


Figura 12: Esquema das reações de formação do ácido nitrobenzóico.

O ácido nitrobenzóico liberado forma uma solução de cor amarela e é quantificado através de uma curva de calibração atualizada. A vantagem deste método em relação às outras metodologias está na possibilidade de estocar as amostras de sangue congeladas sem perda da atividade enzimática ou da reversão da inibição provocada por agentes organofosforados ou carbamatos possibilitando, assim, o deslocamento das amostras para o laboratório de referência ou melhor equipados, bem como agrupar um grande número de amostras facilitando o trabalho laboratorial.

4.5.2 Preparo das amostras

As amostras de sangue coletadas foram homogeneizadas suavemente por inversão contínua do tubo. Quando chegavam ao laboratório elas foram centrifugadas no próprio tubo de coleta do material durante 15 minutos a 4.000rpm, ± 20 rpm, em centrífuga comum. Após a centrifugação, foram separadas duas alíquotas: uma de 500 μ L de plasma em microtubos e outra de 500 μ L de eritrócitos em tubos cônicos (com volume mínimo de 6mL) que continham 4,5mL de tampão de lise. Ambas as alíquotas foram identificadas e armazenadas à -10 oC ± 3 oC para posterior análise. O restante da amostra biológica foi desprezado em hipoclorito.

4.5.3 Quantificação protéica da porção eritrocitária

Após a preparação da parte eritrocitária das amostras, há o processo de lise, visto que a enzima se localiza na membrana dos eritrócitos, e lavagem das células, pois moléculas como a hemoglobina podem interferir na análise. No dia da análise as soluções de eritrócitos mais tampão de lise foram descongelados e homogeneizados por inversão. Em seguida, elas foram centrifugadas à 5.760rpm ± 100 rpm por cerca de 15 minutos em centrífuga refrigerada à 8 °C ± 1 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 4,5mL de tampão de lise, homogeneizado e centrifugado novamente. Esse processo foi repetido por mais 3 vezes. No final, depois do sobrenadante ter sido desprezado, foi adicionado 0,5mL de tampão de análise e homogeneizado no agitador. Essa solução final foi denominada de *ghost* (Oliveira-Silva et al., 2001).

A quantificação protéica das amostras foi realizada com base em uma curva padrão de albumina sérica bovina (Tabela 1).

Tabela 1: Concentrações de cada reagente utilizado no preparo da curva padrão de albumina

Reagentes	Branco	50	100	300
Água destilada (mL)	4500	4450	4400	4200
Sol. 1mg/mL de albumina (ml)	-	50	100	300
NaOH a 25% (mL)	200	200	200	200
Reativo de Folin (mL)	300	300	300	300

Um tubo de ensaio foi preparado com água destilada, solução de albumina e NaOH (utilizado para desenovelar a enzima), nas quantidades descritas acima. O branco foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. No momento da leitura, adicionou-se 300 μ L de Folin puro, agitou o tubo por 30 segundos no agitador e após 5 minutos a amostra foi transferida para uma cubeta de plástico e colocada no espectrofotômetro para a leitura a 660 nm no método fotométrico. A curva de albumina foi feita a cada dia de análise da AChE. Os resultados foram expressos em mg/mL de *ghost*.

4.5.4 Determinação das atividades específicas de cada enzima

Após descongelar o plasma ou preparar o *ghost*, tubos de ensaio foram preparados com 4mL de tampão de análise e 1mL de solução de DTNB. Posteriormente, o espectrofotômetro foi programado para leitura no modo cinético; λ de 412nm e leitura nos tempos 0, 60 e 120 segundos. No momento da leitura foram adicionados 50 μ L da amostra (plasma ou *ghost*) e 1mL de solução de substrato (acetilticolina para AChE e butirilticolina para BChE) no tubo de ensaio previamente identificado. O tubo foi agitado por aproximadamente 3 segundos e imediatamente após a agitação a amostra foi transferida para uma cubeta de plástico e colocada no espectrofotômetro para a leitura, o qual havia sido zerado anteriormente utilizando a solução da cubeta (DO referência) e o resultado foi expresso em DO/minuto, de foi multiplicado por 1000 (sendo a média de 2 minutos)

4.5.5 Preparo da curva padrão de L-cisteína

Os cálculos para a determinação da atividade específica de cada enzima são baseados em uma curva padrão de L-cisteína. A L-cisteína tem um grupo tiol, que reage com a molécula de DNTB, liberando o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, responsável pela mesma coloração amarela formada com a reação enzimática, que ao degradar a acetiltiocolina e a butiriltiocolina liberam a tiocolina. A partir de uma solução mãe de L-cisteína (1mM), preparou-se uma curva padrão, segue a tabela que auxiliou na preparação dessa curva (Tabela 2).

Tabela 2: Concentrações de cada reagente utilizado no preparo da curva padrão de L-cisteína.

Reagentes	Branco	10	25	50	100	150	250	500
Tampão (mL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
L-cisteína (mL)	-	10	25	50	100	150	250	500
Água destilada (mL)	1000	990	975	950	900	850	750	500
DTNB (mL)	500	500	500	500	500	500	500	500

Primeiro, o tampão, a solução de L-cisteína e a água destilada foram aliqüotados em um tudo de ensaio e separado para posterior análise. No momento da análise, o DTNB foi adicionado e o tubo e agitado por 3 segundos no agitador. O aparelho foi zerado com o branco e a leitura fotométrica foi realizada a 412 nm. A mesma curva foi utilizado até que outro tampão de análise fosse feito e os resultados foram obtidos em DO x 1.000.

4.5.6 Cálculos

Após a obtenção dos DO's/ minuto x 1.000 na determinação das atividades específicas de cada enzima, esses valores foram inseridos na curva padrão de L-cisteína. Os valores obtidos corresponderam à nmols de tiocolina/min/50µL de plasma ou *ghost*. A atividade da BChE foi expressa em µmol de tiocolina/min/mL de

plasma, dividindo-se o valor por 50. A atividade da AChE foi expressa em μmol de tiocolina/min/mg de proteína, dividindo-se o valor em μmol de tiocolina/min/mL de *ghost* pelo valor mg/mL de proteína.

4.6 - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

4.6.1 Linearidade

De acordo com o Guia Para Validação de Métodos Analíticos (Brasil, 2003), linearidade é “a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo”. Assim, para avaliar esse parâmetro, foram feitas 3 curvas padrão de L-cisteína no mesmo dia, cada uma feita a partir de uma solução mãe de acordo com a Tabela 2 e cada ponto feito em triplicata. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9992, como mostrado na Figura 13. Adicionalmente, três curvas padrão de L-cisteína feitas em diferentes dias, todas feitas em triplicata, mostraram um R^2 médio de 0,9995 (dados não mostrados).

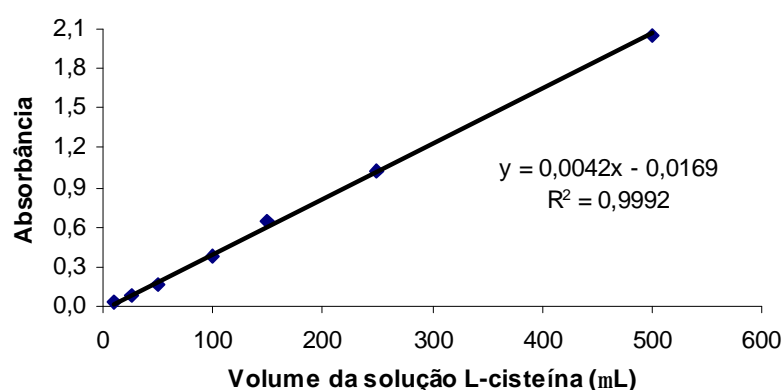


Figura 13: Curva padrão de L-cisteína construída na validação da metodologia analítica para avaliar a linearidade do método.

Os resultados mostraram que a curva mostrou-se favorável a ser utilizada, visto que o R^2 foi maior que o recomendado pela norma analítica vigente (0,99; Brasil, 2003) e que ela é reproduzível em dias diferentes.

4.6.2 Otimização do tempo de análise de AChE e BchE após coleta da amostra de sangue

O objetivo deste experimento foi escolher um período de dias após a coleta da amostra de sangue quando o resultado das análises não fossem estatisticamente diferentes entre si, permitindo uma flexibilidade na análise sem comprometimento dos resultados (robustez do método com relação ao dia de análise após a coleta da amostra).

Para este estudo, utilizou-se uma amostra de sangue doada de um pesquisador do laboratório. Logo após a coleta (cerca de 10mL), a amostra foi alíquotada o suficiente para 5 dias de análise, com n=5 em cada dia para cada enzima, num total de 25 alíquotas para cada enzima. O procedimento de preparo das amostras foi igual ao descrito no item 4.5.2. As alíquotas foram congeladas a $-10^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e analisadas após 1, 2, 3, 4 e 5 dias de congelamento. A Tabela 3 e 4 mostram as médias das atividades enzimática encontrada em cada dia, o desvio padrão e o coeficiente de variação em cada caso. As Figuras 14 e 15 mostram graficamente os resultados obtidos nesse experimento.

Tabela 3: Média, desvio padrão (DesPad) e o coeficiente de variação (CV, %) da atividade enzimática da AChE

	mmol de tiocolina/min/mg de proteína					Média	DesPad	CV, %
Dia 1	0,517	0,462	0,460	0,476	0,470	0,477	0,023	4,877
Dia 2	0,450	0,453	0,410	0,418	0,406	0,428	0,022	5,244
Dia 3	0,523	0,521	0,527	0,618	0,489	0,536	0,049	9,059
Dia 4	0,528	0,487	0,563	0,538	0,380	0,499	0,072	14,445
Dia 5	0,537	0,551	0,554	0,511	0,557	0,542	0,019	3,518

CV= média *100/desPad

Tabela 4: Média, desvio padrão (DesPad) e o coeficiente de variação (CV, %) da atividade enzimática da BChE.

	mmol de tiocolina/min/mL de plasma					Média	DesPad	CV%
Dia 1	2,026	2,019	2,038	2,088	2,110	2,056	0,040	1,956
Dia 2	1,971	1,966	2,117	1,902	1,941	1,979	0,082	4,120
Dia 3	2,058	2,054	1,974	2,043	2,020	2,030	0,034	1,692
Dia 4	2,446	2,355	2,449	2,299	2,395	2,389	0,064	2,660
Dia 5	1,477	1,525	1,540	1,487	1,501	1,506	0,026	1,743

CV= média *100/desPad

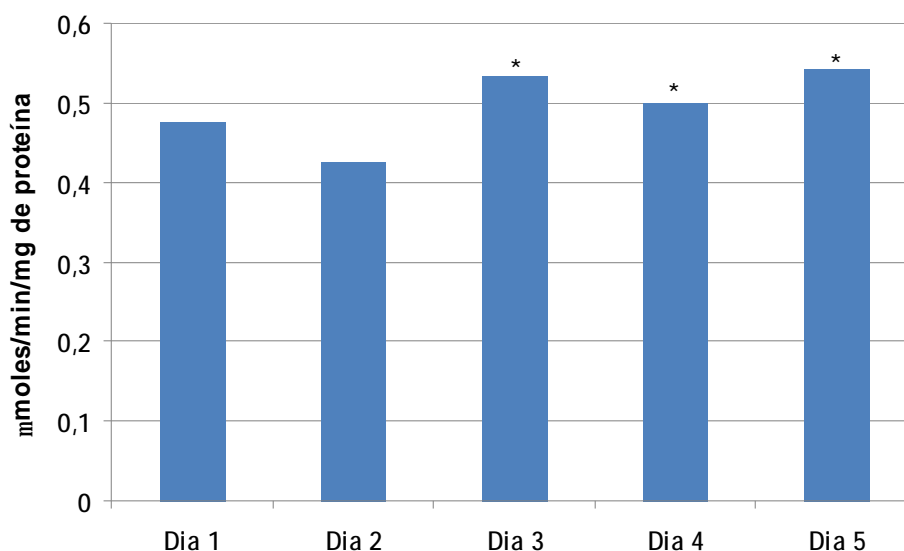


Figura 14: Análise da enzima AChE após diferentes dias de congelamento após a coleta da amostra de sangue; n= 5 em cada dia. Resultados marcados com asteriscos são estatisticamente iguais ($p > 0,05$)

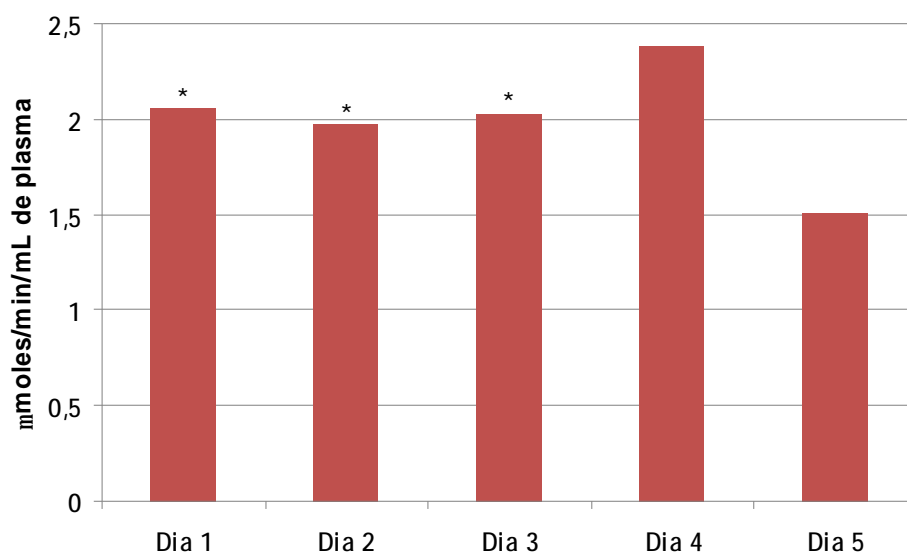


Figura 15: Análise da enzima BChE após diferentes dias de congelamento após a coleta da amostra de sangue; n= 5 em cada dia. Resultados marcados com asteriscos são estatisticamente iguais ($p>0.05$)

O teste Kolmogorov-Smirnov indicou que os dados obtidos para cada enzima nos 5 dias de análise não obedecem a uma distribuição normal ($p= 0,850$ e $0,323$ para as análises da AChE e da BChE, respectivamente). Para avaliar se existe diferenças significativas entre os resultados obtidos em diferentes dias de análise, utilizamos então o teste de Anova (Kruskal-Wallis) que indicou p-valor de $0,001$, para a AChE, e de $0,006$, para a BChE, ou seja, pelo menos um dos valores se difere do resto. Para investigar melhor a relação dos dados, fizemos um teste de média, teste de Mann-Witney, com os dados de dois dias de análise e combinamos esses dias para ocorrer a combinação total entre eles. A Tabela 5 mostra as combinações e os resultados dos p-valores para as duas enzimas. Adicionalmente, mostra, também, que não há diferença significativa entre os resultados de AChE obtidos quando as amostras foram analisadas nos dias 3, 4 e 5 após a coleta da amostra (Figura 14). Para a BChE, o resultado obtido entre os dias 1 e 3 após a coleta da amostra não apresentaram diferença significativa (Figura 15).

Tabela 5: Resultados dos p-valores para a combinação total dos 5 dias de análise de amostras de plasma e eritrócitos congeladas.

AChE		BChE	
Combinação	p-valor	Combinação	p-valor
Dia1-Dia2	p=0,009	Dia1-Dia2	p=0,117
Dia1-Dia3	p=0,016	Dia1-Dia3	p=0,602
Dia1-Dia4	p=0,175	Dia1-Dia4	p=0,117
Dia1-Dia5	p=0,016	Dia1-Dia5	p=0,009
Dia2-Dia3	p=0,009	Dia2-Dia3	p=0,117
Dia2-Dia4	p=0,117	Dia2-Dia4	p=0,009
Dia2-Dia5	p=0,009	Dia2-Dia5	p=0,009
Dia3-Dia4	p=0,917	Dia3-Dia4	p=0,009
Dia3-Dia5	p=0,347	Dia3-Dia5	p=0,009
Dia4-dia5	p=0,347	Dia4-dia5	p=0,009

Adicionalmente, repetimos o mesmo teste de Anova para os dias selecionados e obtivemos p-valores de 0,543 e 0,174 para a AChE e BChE, respectivamente, confirmando que não existem diferenças significativas entre os valores de cada dia e para cada enzima.

Para a AChE, o CV dos resultados obtidos em cada dia variou de 3,5 a 14,5% e para BChE, de 1,5 a 4,1% (Table 3 e 4). O maior CV encontrado na análise AChE pode ser explicado pela etapa adicional na análise desta enzima em comparação com a BChE, adicionando uma maior margem de variação nos resultados. Na análises das amostras dos trabalhadores (n=3), foram admitidas o CV máximo de 15% para a AChE e de 5% para a BChE, do contrário a análise foi repetida.

4.7 - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Os Anexos D e E são referentes à aprovação do trabalho e da inclusão da área do Núcleo Rurais Taquara ao trabalho, respectivamente.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - KNOWLEDGE, ATTITUDES, PRACTICES AND BIOMONITORING OF FARMERS AND RESIDENTS EXPOSED TO PESTICIDES IN BRAZIL

(submetido ao *Environmental Research* em 29/12/2011)

1. Introduction

The use of pesticides is currently the main pest management strategy to guarantee the world's food supply. Most pesticides, however, are toxic to non-target species, including humans, and the extensive use of these products in the field can lead to occupational diseases and poisonings (Karlsson, 2004; Sam et al., 2008; Faria et al., 2009).

Brazil is one of the largest pesticide users in the world (Rebelo et al., 2010), and over 90% of farmers rely on pesticides for pest management (SIDRA, 2006). About 60% of tomato growers and 76.5% of sweet pepper growers used pesticides in 2006 (SIDRA, 2006). As of October 2011, 1,456 pesticide products were registered in the country, of which 33.6% were herbicides, and 26.6% chemical insecticides. About half of the registered products are classified as extremely or highly toxic to humans (classes I and II) (MAPA, 2011). The number of poisonings due to pesticides has continually increased in the country over the last two decades (SINITOX, 2009), and the number of occupational accidents related to pesticides has increased by about 40% between 2003 and 2009 (Rebelo et al., 2010).

Pesticide exposure in the field occurs mainly through dermal contact and inhalation (WHO, 2006a) and the use of personal protective devices (PPD), associated with government educational programs, can help reduce exposure and exposure-dose pathways or identify early effects before irreparable disease develops (Anwar, 1997; Thorne, 2008). Studies to assess the knowledge, attitudes and practices (KAP) help understand the occupational settings and work conditions during pesticide application by farm workers. As occupational exposure is a reality in

Brazil and other countries, KAP studies may provide information regarding local aspects that should be focused by educational programs (Hurtig et al, 2003; Karlsson, 2004; Sam et al, 2008).

Organophosphate (OP) and carbamate (CAR) insecticides are inhibitors of acetylcholinesterase (AChE – EC 3.1.1.7), an enzyme responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (Cocker et al, 2002; Stefanidou et al, 2009). These are among the most acute toxic pesticides on the market worldwide, and their registration is being phased out or has been canceled in many countries, including Brazil (Konradson et al., 2003; USEPA, 2010; ANVISA, 2011). A single or repeated exposure to AChE inhibitors leads to accumulation of acetylcholine in the synaptic cleft, and may cause excessive stimulation of cholinergic receptors throughout the body (Lotti, 2001; Cocker et al, 2002; Galloway & Handy, 2003). This stimulation can cause toxic effects on muscarinic (nausea, bronchoconstriction, sialorrhea) and nicotinic (hypertension, tachycardia, tremor) receptors and on the central nervous system (coma, convulsion, confusion) (Anwar, 1997; Ecobichon, 2001). These insecticides also inhibit plasma butyrylcholinesterase (BChE – EC 3.1.1.8), an enzyme whose physiological function is unknown, that hydrolyzes amide and ester-containing compounds (Thorne, 2008). The inhibition of BChE does not reflect the inhibition of AChE in the nervous system, but might give some indication of the extent of the nervous cholinesterase inhibition (Stefanidou et al., 2009). The measurements of erythrocyte AChE and plasma BChE represent a reliable way of determining exposure to OPs and CAR or to monitor occupationally-exposed workers (Lotti, 1995; Worek et al, 2005; Thorne, 2008).

The aims of this study were to assess the knowledge, attitudes and practices regarding pesticide use of farmers in two rural settings of the Midwestern region of Brazil, and to determine the levels of exposure of farmers and residents to these compounds through AChE and BChE analysis.

2. Materials and methods

This study was conducted according to international guidelines for the protection of human subjects and was approved by the ethics committee of the University of

Brasilia. All participants read and signed the free and informed Consent Term, which included the research objectives, procedures and privacy in data handling.

2.1. Population studied

This is a cross-sectional epidemiologic study conducted between 2009 and 2011 with farmers from two locations in the Midwestern region of Brazil: Goianópolis (162.38 km²), 170 km from Brasília (capital of Brazil) and Taquara Rural Nucleus, in the city of Planaltina (351 km²), 90 km from Brasília. All participants were 18 years of age or older. All farmers were directly involved with pesticides, either in the preparation of the pesticide solution and/or its application in the field. The study used a convenience sampling (non-probability sampling).

In Goianópolis, 40% of its approximately 11,000 inhabitants are involved directly or indirectly in tomato-growing activities (Santos & Noronha, 2001). At this location, the crop is cultivated year-round in about 30 planting areas of 1-2 ha, where about 9-10 farmers work in a sharecropper regime under the management of the owner or some other person. After harvesting, the workers migrate to another planting area, re-establishing the cycle. The managers of 21 planting areas were contacted by telephone (provided by the local seed supplier) to obtain permission to visit the areas, and to recruit farmers to participate in the study. Only two managers agreed, and we were able to recruit 18 farmers from two planting areas in the region.

According to EMATER-DF, a local government agency that provides technical support to the farmers, Taquara has 318 registered planting areas and 1,100 farmers, mainly vegetable and fruit growers. In each planting area of about 4-5 ha, 5-13 individuals work in a family setting or a share-cropper regime of multiple crops. After harvesting, a new planting cycle starts, usually with a different crop. Our first contact with the farmers occurred during two community events organized by EMATER, at which 30 farmers agreed to participate in the study, answered the questionnaire and gave us their contact information. We obtained the telephone contact information of an additional 112 farmers from EMATER, 30 of whom were unreachable, 10 were no longer involved in agricultural activities, 6 did not want to participate in the project, and 2 were no longer living in the area. A total of 94 farmers

from 38 Taquara planting areas (23 family farming settings) participated in the study. In addition, 17 family members not directly involved with pesticides (residents) agreed to participate in the study. For the control group, individuals were recruited from the local hospital, school and EMATER offices, in addition to rural workers with no contact with pesticides.

2.2. The knowledge, attitudes and practices (KAP) study

The farmers participating in the study answered a questionnaire which was applied by a trained professional. The questionnaire, adapted from a previous one developed and validated by our group (Recena et al., 2006), was comprised of 59 objective questions (yes/no or multiple choice) and two subjective questions (concerning the use of medication and adverse symptoms after pesticide exposure). The aim was to obtain information on the workers and the farms, the attitudes and practices of farmers regarding pesticide use, and symptoms following pesticide application, to determine the impact of pesticide use on human health and the environment.

2.3. Blood Sampling

The participating farmers, residents and control group were asked to donate blood samples to measure cholinesterase activity and to evaluate renal and hepatic parameters. All samples were collected in 4 mL vacuum tubes. In Goianópolis, blood samples were collected by health professionals from the local Secretary of Health. In Taquara, they were collected by a trained pharmacist involved in the project. Samples were sent to the Laboratory of Toxicology (LabTox) within a maximum of 4 hours after collection.

In this study, a farmer was considered to be in the exposure period up to 5 days after using ChE inhibitor pesticides and in the non-exposure period after 15 days not using ChE inhibitor pesticides. Blood samples from the residents were collected at

the same time as those of the farmers. A third sample was collected from both groups at either period for renal and hepatic parameters. Two blood samples were collected from the control group, one for cholinesterase analysis, and other for renal and hepatic parameters.

2.4. AChE and BChE activity

Upon arrival at the laboratory, blood samples were centrifuged, the erythrocyte portion hemolysated in a buffer solution (0.02M, pH 7.6), and the fractions kept frozen (-20°C) until analyzed. The modified Ellman method was used (Ellman et al., 1961), as reported by Oliveira-Silva et al. (2000), which is based on the hydrolysis of the substrate (acetylthiocholine or butyrylthiocholine) by each enzyme and reaction of the formed thiol group with ditionitrobenzoic acid (DTNB), yielding nitrobenzoic acid, which was quantified at 420 nm (Spectrophotometer Shimadzu UV/VIS 1650 PC). Enzyme activity was determined against a standard curve of L-cysteine ($R^2=0,9992$), which undergoes the same colorimetric reaction. AChE ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$) and BChE ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ protein) were determined within 3-5 and 1-3 days after blood collection, respectively, periods in which the enzyme activities did not vary significantly ($n=5$; $p=0.543$ and $0,174$, respectively). Precision ranged from 3.5 to 14.5% for AChE and from 1.7 to 4.1% for BChE. Acetylthiocholine, butyrylthiocholine, L-cystein, albumin and DTNB were purchased from Sigma Aldrich®. Folin reagent (for protein determination) was obtained from Merck KGaA® and sodium phosphate tribasic dodecahydrate (for the buffer solution) was obtained from Vetec Quimica Fina.

2.5. Hepatic and Renal Parameter

Blood samples were sent to the University of Brasilia Hospital (HUB) within 24 hours of collection for analysis of bilirubin, albumin, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltranspeptidase (γ -GT), total protein, aspartate transaminase (AST), alanine

amino transaminase (ALT), urea, creatinine, and hepatitis A, B and C. The analyses were conducted using standard methods, and the results were considered altered when out of the normal value or range recommended by the HUB laboratory.

2.6. Data Treatment

The data collected from questionnaires and the results of the blood analyses were transferred to EpiInfo Software 2000 (Epidemiological Program Office, CDC, Atlanta, Georgia). The statistical analysis was made with the IBM SPSS Statistics Version 19 software for Windows. The Fisher test and χ^2 were used to verify possible association among the nominal variables of the study. The T-test or Mann-Whitney test was used for the comparison of the means. The level of significance was set at 95% ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. KAP study

A total of 112 farmers answered the questionnaire; 94 (83.9%) from Taquara and 18 from Goianópolis. All Goianópolis farmers were tomato growers and 92% of Taquara farmers were either tomato and/or sweet pepper growers. Almost all farmers were male (99.1%). There were no statistical differences in the parameters shown in Tables 1 and 2 for the individuals from both communities, and thus they were grouped for discussion.

Table 1 shows the social and demographic characteristics of the studied populations. The average age of the farmers was 37.7 years (± 12.5), most of whom (54.6%) between 21 and 40 years of age. About 45% of respondents had completed at least 8 years of schooling (complete primary level) and 6.3% were illiterate or had never attended school. The preferred word to designate pesticide products (65.4%) was poison, followed by *agrotóxico* (26.1%), the legal term for pesticides in Brazil

(Brazil, 1989). There was no significant correlation between those who preferred the term “poison” and level of education. Most of the farmers worked as sharecroppers or employees, and 38.4% in a family agricultural setting (all from Taquara). Most of the respondents (76.8%) had been using pesticides for at least 5 years, and 21.4% for over 20 years. Most of the farmers consumed alcohol with some frequency (Table 1).

Table 1: Social and demographic characteristics of the Taquara and Goianópolis farmers (N=112)

Characteristics	n (%)
Age	
18-20	8 (7.1)
21-30	27 (24.1)
31-40	34 (30.5)
41-50	25 (22.3)
51-60	9 (8.0)
> 60	9 (8.0)
Education	
Illiterate/no schooling	7 (6.3)
Incomplete primary	55 (49.1)
Complete primary/incomplete high school	33 (29.4)
Complete high school/incomplete college	17 (15.2)
Name used to designate pesticides ^b	
Poison	78 (65.4)
<i>Agrotóxico</i>	31 (26.1)
Remedy	4 (3.4)
Pesticide	2 (1.7)
Other	4 (3.4)
Years of pesticide use	
Up to 5	26 (23.2)
5-10	31 (27.7)
10-20	31 (27.7)
20-30	16 (14.3)
>30	8 (7.1)
Work Regimen	
Sharecropper or employee	69 (61.6)
Family agriculture	43 (38.4)
Ingestion of alcohol	63 (56.2)

Table 2 shows the knowledge, attitudes and practices regarding pesticides among the farmers. Most of the respondents (53.6%) work more than 8 hours a day.

For almost 80%, there was a special room for pesticide storage, and only five individuals (4.5%) reported storing these products inside their homes. At least 40% used a manual backpack sprayer, and 36.6% used an automated static sprayer. The great majority (82.1%) reported returning the empty pesticide containers to the government container disposal program, and 16.1% buried and/or burned the containers. No significant correlation was found between storage of pesticide products in a reserved/special deposit outside the house and level of education.

Table 2: Knowledge, attitudes and practices of the Taquara and Goianópolis farmers regarding the use of pesticides (N=112)

	n (%)
Hours working in the field	
More than 8	60 (53.6)
5-8	48 (42.8)
Up to 5	4 (3.6)
Storage of pesticide products	
In a special storage location (outside the house)	87 (77.6)
With other farm products	19 (17.0)
In the house	5 (4.5)
Other	1 (0.9)
Type of pesticide applicator	
Manual backpack sprayer	45 (40.2)
Automated static sprayer	41 (36.6)
Automated backpack sprayer	12 (10.7)
Open tractor	10 (8.9)
Other	4 (3.6)
Empty pesticide containers are	
Turned to government collection posts	92 (82.1)
Buried / burned	18 (16.1)
Did not know	2 (1.8)
Pesticides are necessary in the field	108 (96.4)
Work in the field can impair his/her health	87 (77.7)
Pesticides are harmful to the health of	
Those who apply the pesticides	91 (81.3)
Those who work on the farm	79 (70.5)
Those who consume the crop	68 (60.7)
Those who live near the planting area	30 (26.8)

Over 95% of farmers considered pesticides necessary in the field (Table 2) and 77.7% stated that work in the field could impair his/her own health. Almost 90%

of the farmers considered pesticides harmful to the health, mainly among those who apply the pesticides or work on the farm (81.3 and 70.5%, respectively); only one-third considered that the health of those living near the plantation area could be impaired by pesticides. A significant correlation ($p < 0.01$) was found among those who thought that his or her work was harmful to the health, and among those who thought that pesticides were harmful to health (Table 2).

Most farmers (67%) agreed that pesticides residues remained in the food after treatment, and about 40% of these acknowledged that the amount remaining in the food for consumption depended on the withholding period. For 25.3%, residues remained for a week or less after the last application, 16% for a day or less, 9.3% for a month or less and 5.3% for over a month. About 60% of farmers considered pesticides harmful to the health of those who eat the treated crop (Table 2).

Most of the farmers bought the pesticide products at the local cooperative (56.4%), and washed the pesticide application equipment in the field (57.1%). Almost half (42.9%) reapplied the leftover pesticide solution on the same crop and on the same day, 25% disposed it in the soil or in the rivers/brooks, and 23.2% kept it for subsequent application. Only 8.9% of the farmers prepared the exact volume to be used on the crop.

Almost all farmers (99.1%) considered the use of PPD necessary during pesticide application, but almost half (48.2%) did not use them properly (Table 3), and 7.2% never used them at all. Gloves were never used by about 18% of the farmers, and impermeable clothes were used by only 18.8% of the farmers. Sharecroppers were more likely to use PPD than farmers in a family agriculture setting ($p = 0.001$). Considering those who used impermeable clothes (always/sometimes), 39.3% had them washed at home (mainly by the wives), 32.6% in the field, 14.6% let them dry, washed only on weekends, 7.9% washed them either in the field or at home, and 3.4% never washed them.

Table 3: Use of personal protective devices (PPD) by the Taquara and Goianópolis farmers (N=112)

PPD use	n (%)		
	Complete	Incomplete	No use
	Always	Sometimes	Never
	50 (44.6)	54 (48.2)	8 (7.2)
Boots	88 (78.6)	15 (13.4)	9 (8.0)
Hat	78 (69.6)	19 (17.0)	15 (13.4)
Gloves	64 (57.1)	28 (25.0)	20 (17.9)
Mask	81 (72.3)	18 (16.1)	13 (11.6)
Impermeable clothes	66 (58.9)	25 (22.3)	21 (18.8)
Other	2 (1.8)	-	-

Most of the respondents (55.3%) declared receiving information about pesticides from government extension agents, technicians and/or pesticide sellers, and 19.6% from the cooperatives. The majority of the individuals (65.7%) always followed the orientation received, and 87.5% observed the withholding period. Over half of the farmers (54.5% of 88 respondents) followed the agronomic prescription, but 28.5% did not know what an agronomic prescription was. Most of the farmers (68.8%) read the product labels with instructions on use, and 58% read the warnings and precautions. Almost all (92.9%) selected the best time for pesticide application (early in the morning and/or at the end of the day), and observed the direction of the wind at the time of application (87.5%). The majority of farmers (62.5%) considered that the information about pesticides they were provided was sufficient to prevent harming their health, 50% to prevent harming other people's health, and 48.2% to prevent harming the environment. Over 63% found that pesticides were harmful to animals, and 75.9% to the environment.

Almost one fourth of the farmers (23.2%) reported having adverse symptoms after the use of pesticides sometime during their lives. The main symptoms reported were cephalgia, dizziness and vomiting. No significant correlation was found between the reporting of adverse symptoms and age, level of education, years of pesticide use, living on the farm, use of PPD, disposal of empty pesticide containers, or hours of work. However, a significant correlation ($p=0.027$) was found between the

reporting of adverse symptoms and the use of backpack sprayers. Among those farmers who had reported adverse symptoms, seven (26.9%) reported having been intoxicated by pesticides, three were diagnosed by a physician and two were hospitalized and needed to stop their usual activities. Although not significant, the consumption of alcohol with some frequency had the second highest correlation with the reporting of some adverse symptom ($p=0.052$). Ten farmers (9.1%) were taking some type of medication at the time of the interview.

3.2. AChE and BChE activities

Among the 112 farmers who participated in the study, 60 agreed to donate blood samples for cholinesterase analysis according to the defined protocol (exposure and non-exposure period); 48 from Taquara and 12 from Goianópolis. Sixteen farmers donated blood only during the non-exposure period, and 12 only during the exposure period. Cholinesterase results from the Goianópolis farmers who only donated samples during one of the periods were not included in the study. Twenty-one farmers did not consent to donating blood samples. All blood donor farmers were men. Blood samples were taken from 17 residents from Taquara (all women) ($41 \text{ years} \pm 14.5$, on average) during the farmers' non-exposure and exposure periods. One resident had a blood sample taken only during the non-exposure period. The control group was comprised of 64 individuals, being 41 men (mean age: 35.4 ± 9.2 years) and 23 women (mean age: 32.7 ± 10.6 years). The men in this group were considered to be the control for the Taquara farmer group and the women the control for the resident group.

Figure 1 shows the mean enzyme activities of the Taquara farmer and resident groups for the non-exposure and exposure periods compared with their respective controls. No significant difference was found between the mean AChE activities of the farmer group during the non-exposure ($0.445 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$, $n=64$) and exposure periods ($0.443 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$, $n=54$); they were however statistically lower than the activity found in the men control group ($0.519 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$, $n=41$; $p<0.02$). Mean AChE activity of the women control group ($0.586 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) was significantly higher than that of the resident group for both

periods ($p < 0.01$). Additionally, AChE activity in this group was significantly higher during the non-exposure period when compared with the exposure period (0.352 and 0.314 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot, respectively) ($p = 0.011$). Mean BChE activity of the farmers during the non-exposure period (1.12 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ plasma) was similar to the control, but higher than that of the exposure period (1.03 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$, $p = 0.02$). The resident group had lower BChE activity (0.964 and 0.910 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ for the non-exposure and exposure periods, respectively) than the control group (1.11 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) ($p < 0.05$).

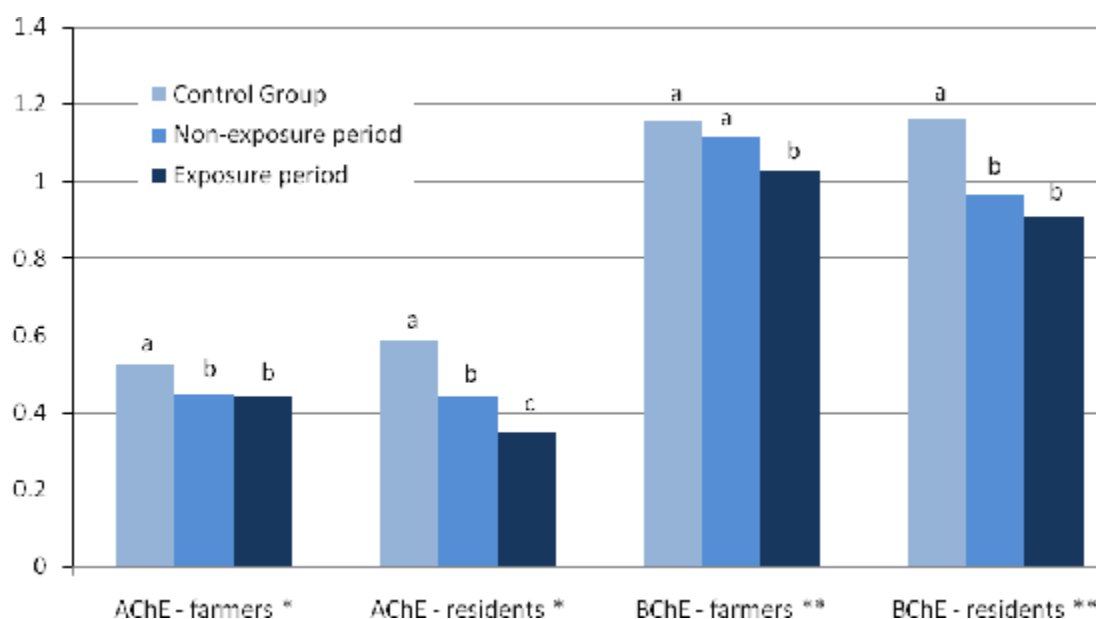


Figure 1: Mean enzyme activities of the Taquara farmers and resident groups during the non-exposure ($n = 64$ and 18 , respectively) and exposure periods ($n = 54$ and 17 , respectively) compared with their respective controls ($n = 41$ and 23 , respectively). * $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein; ** $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ of plasma. For each enzyme/group, bars with different letters have means statistically different ($p < 0.05$).

Figure 2 shows the variation (%) in AChE and BChE activity for each of the 60 farmers who had provided blood samples during both the non-exposure (baseline) and exposure periods. No correlation was found between the AChE and BChE activities ($R^2 = 0.25$; $p = 0.06$). The majority of farmers (53.3%) had $\pm 30\%$ AChE activity variation, 31.7% had an increase of AChE activity greater than 30%, and 16.7% had AChE depletion greater than 30%. One farmer had a 60% BChE depletion during the exposure period (and a 29.2% AChE depletion), and two farmers had a BChE activity increase of over 50%, one with a 23% AChE depletion and the other with about the same level of AChE increase (Figure 2). For 48.3% of the

farmers, the depletion of one enzyme was followed by an increase in the other, but in most cases (51.7%) this variation was within $\pm 25\%$ for each enzyme. No significant correlation was found between enzyme alteration (depletion or overproduction) and work regimen, alcohol intake, hours of work, years of pesticide use, backpack application, reporting adverse symptoms, and the use of PPDs.

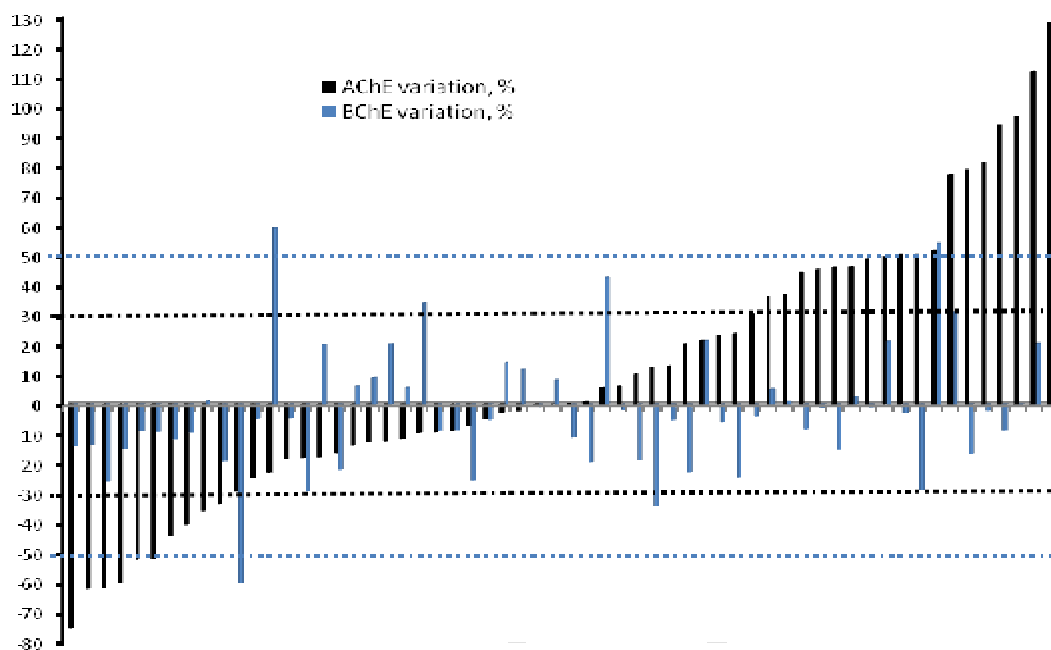


Figure 2: Variation (%) of AChE or BChE activity of each Taquara and Goianópolis farmer (n=60) between the non-exposure and exposure periods

Of the 17 residents who provided blood samples during both the non-exposure and the exposure periods, six (32.3%) had a depletion of AChE greater than 30% during the exposure period. BChE inhibition was within the normal range (up to 50%) in all cases (data not shown). All the six residents with AChE depletion lived with the farmer who also had AChE inhibition.

3.3. Hepatic and renal function

Table 4 summarizes the results of the laboratory blood exams performed for the farmers (n=64), residents (n= 17,) and the control group (n=54). A total of 1412 exams were performed, but not all the blood samples had all the parameters

analyzed. A total of 48 alterations were observed in the samples, mainly related to hepatic functions (γ -GT, AST and bilirubin). Individuals in the farmers' group presented most of the alterations (64.6%): three farmers with two alterations, three farmers with three alterations, and one farmer with four alterations. No significant differences were found in the mean levels of all parameters for the Taquara farmer group and its control, but indirect bilirubin and total bilirubin levels of the resident group (0.5 ± 0.22 and 0.68 ± 0.27 mg/dL) were higher than those of its control group (0.32 ± 0.15 and 0.50 ± 0.22 mg/dL). No correlation was found between depletion of ChE and laboratory exam alterations; only 3 of the 11 farmers with ChE depletion higher than the cut-off value (30 and 50 % for AChE and BChE, respectively) presented an alteration in their exams. In addition to the exams shown in Table 4, hepatitis A, B and C were investigated in all but 8 farmers. One male from the control group tested positive for hepatitis B, with no other alterations observed in the blood exams for this individual.

Table 4: Results of blood exams for renal and hepatic functions for Taquara and Goianópolis (farmers, residents and controls)

Parameter	Altered result	Male control		Farmers		Female control		Residents		Reference value*
		Range	N	Range	N	Range	N	Range	N	
Albumin. g/dL	0	4.0 - 4.9	0	3.9 - 4.9	0	4.1 - 4.8	0	3.8-4.7	0	3.5 - 5.0
Total protein. mg/dL	0	6.4 - 8	0	6.4 - 8.2	0	6.4-8.2	0	6.1-7.6	0	6.0 - 8.3
Alkaline phosphatase, U/L	2	50 - 156	1	37 - 133	1	46-98	0	43-117	0	40 - 150
γ-GT, U/L	8	14 - 110	2	6 - 133	5	13-62	1	7-36	0	M: 12-64; F: 9-36
AST, U/L	8	16 - 35	1	11 - 57	7	12-27	0	12-31	0	5 - 34
ALT, U/L	4	9 - 61	1	7 - 88	3	7-45	0	5-41	0	Up to 55
Indirect bilirubin, mg/dL	9	0.1 - 1.5	2	0.1 - 2.3	6	0.1-0.7	1	0.2-0.9	0	0.2 - 0.9
Direct bilirubin, mg/dL	2	0.1 - 0.5	0	0.1 - 0.7	2	0.1-0.4	0	0.1-0.3	0	Up to 0.5
Total bilirubin, mg/dL	7	0.2 - 2	2	0.3 - 2.8	5	0.2-1.1	0	0.3-1.2	0	0.2-1.2
Creatinine, U/L	4	0.8 - 1.8	3	0.7 - 1.2	0	0.5-0.9	1	0.7-1	0	M: 0.7-1.3; F: 0.6-1.1
Urea, mg/dL	4	22 - 43	0	17 - 54	2	17-36	0	11-36	2	M: 18- 55; F: 10-36
Total	48		12		31		3		2	

* according to the University of Brasilia Hospital; N= number of individuals with altered result, M= male; F= female

4. Discussion

In general, the level of education of the farmers participating in this study was similar to that reported in studies conducted in other Brazilian regions (Moreira et al., 2002; Racena et al., 2006; Faria et al., 2009), but lower than those found in the United States, where 86.6% of respondents had more than 12 years of schooling and/or held college degrees (Stokes et al., 1995).

Most of the farmers reported storing the pesticide products in a reserved place outside the house and returning the empty containers to the National Empty Container Processing Institute. This program began in 2001, and the number of empty pesticide containers received has been increasing constantly ever since, reaching about 17 thousand tons in 2010 (INPEV, 2011). High participation in the program was also reported by Faria et al. (2009) in the state of Rio Grande do Sul (RS). In the state of São Paulo, half of the flower greenhouse workers interviewed declared returning the containers to specific waste collection posts (Ribeiro et al., 2011). In Mato Grosso do Sul (MS), Bigatão (2009) reported that 34.8% of the farmers burned or buried the pesticide containers, and Recena et al. (2006) found that 54.4 % of farmers stored the empty containers in their homes. Empty containers, however, were found spread around the planting area of those who answered having returned the empty pesticide containers to the government program in the present study, indicating that the best practices are not fully carried out by these farmers.

Over 80% of the farmers considered that working with pesticides could impair their health, a similar perception found in MS (Recena et al., 2006). In our study, the great majority of the farmers observed the direction of wind and chose the time of application. These practices are important to minimize human exposure since higher atmospheric temperatures increase the vapor pressure and volatility of the chemicals, and thus their availability for inhalation and dermal absorption (Silva et al., 2005).

Recena et al. (2006) observed that the majority of the farmers in MS wore hats, but less than half wore boots, masks, gloves or impermeable clothing. The farmers participating in our study seemed to be more aware of the importance of using PPDs, and only 7.1% had never used them, similar to what was found in RS, where over 90% of farmers always used at least one PPD item (Faria et al., 2009). In

a province in Thailand (Jintana et al., 2009), 64.4% of farmers did not use any PPD during their work, similar to what was found in Ethiopia (76.3%) (Karunamoorthi et al., 2011). In Spain, 65% of the workers used no personal protection or used it defectively (García et al., 2002). Soares et al. (2003) estimated that an unprotected Brazilian worker has a 72% greater chance of being poisoned when compared to those who use all PPD. In our study, many farmers complained that certain PPD were uncomfortable when used in warm weather; similar to what was found in other studies conducted in other tropical areas (Waichman et al., 2007; Jintana et al., 2009, Recena & Caldas, 2008)

In this study, about 20% of farmers reported adverse symptoms after using pesticides, similar to the findings of Faria et al. (2009) in RS (19.4%; the majority using tractor applicators). This percentage is much lower than that found by Recena et al. (2006) in MS (60%; mostly backpack sprayer use). We did find a correlation between the reporting of adverse symptoms and the application of pesticides with backpack sprayers, used by 40% of the farmers. This technology, generally used on small farms, may increase the risk of developing adverse effects, as the farmer is greatly exposed to the pesticide spray (Blanco et al., 2005). We did not find a significant correlation between alcohol intake and the reporting of any adverse symptom, a correlation also found by Faria et al. (2009).

According to Brazilian legislation, a depletion of AChE of at least 30% indicates excessive exposure, which may be associated with an adverse effect (Brazil, 1978). In this situation, the recommendation is the removal of the exposed individual from further contact with pesticides until levels return to normal (WHO, 1986; DOSH, 2010). In the present study, 10 farmers had AChE depletion of over 30% during the exposure period, mostly over 50%, indicating potential poisoning (Lotti, 1995; Maroni et al., 2000). Although the mean farmer AChE activity was significantly lower than the control group (about 15% lower), no differences between the mean farmer AChE activities during the non-exposure and exposure periods were found. This lack of sensitivity when a population baseline is used to detect inhibition is partially due to the normal interindividual enzyme activity variation, which is about 15–25% for BChE and 10–18% for AChE, and the intraindividual variation over time, which ranges between 6 and 3–7%, respectively (Maroni et al., 2000). Hence, an individual ChE activity baseline is necessary (Midttinget al., 1985; Cocker et al., 2002; Reiner & Simeon-Rudolf, 2006; Stefanidou et al., 2009).

Only one of the farmers had a depletion of BChE activity higher than 50%, which is the level of health concern according to Brazilian legislation. The second highest inhibition level was 34.4 %, lower than the depletion level recommended in the USA that indicates the need to remove the farmer from the work setting (40% or higher) (DOSH, 2010). The lower sensitivity of BChE inhibition as a biomarker of exposure to OPs and CAR can be explained by the higher turnover of this enzyme compared to AChE, with recovery of the activity being limited by the production of new erythrocytes, which takes over 120 days (Jintana et al., 2009). Thus AChE remains depressed for a longer period (Midtling et al., 1985; Reiner & Simeon-Rudolf, 2006). All 11 the farmers with enzyme depletion rates higher the cut off levels were from Taquara.

Peres (2005) observed higher BChE activities during the exposure period when compared with the baseline activity (up to 42% higher), calling this phenomenon a reboot effect. The authors did not observe the same effect for AChE. In our study, we found the reboot effect for both AChE and BChE. An increase in ChE levels measured in the blood samples collected a few days or weeks after exposure may reflect the ability of the body to adapt to increased concentrations of acetylcholine at the nervous terminal after exposure to AChE inhibitors. This phenomenon may partially explain the reason why the severity of illness after repeated exposures is not always proportionally related to the degree of AChE inhibition (Gallo & Lawryk, 1991). Furthermore, the reboot effect may also hide unsafe exposure when the individual baseline level is measured following a period of high exposure.

Statistical analysis could not detect the effect of using PPD on enzyme depletion, nor a correlation between this depletion and the reporting of adverse symptoms. A close investigation of the questionnaires showed that 7 of the 11 farmers who had ChE depletion activities higher than the cut-off levels reported having never used or occasionally used impermeable clothing, gloves and/or masks. Only 4 of them reported having any adverse symptoms.

The OPs and CAR have substantial differences in their ability to inhibit either AChE or BChE (Cocker et al., 2002). In our study, we were not able to correlate enzyme activity with specific compound use. During our visits to the farms, it was clear that most farmers used multiple compounds on the same crop, mainly chlorpyrifos, methamidophos, profenophos and/or fentoate. Methamidophos was the

most used OP in Brazil in 2009 (Rebelo et al., 2010), and was recently prohibited in the country (ANVISA, 2011).

Family agriculture settings are characterized by small properties, labor provided by family members, and the use of low technology equipment for pesticide application, such as backpack sprayers and open tractors. Under this system, houses are generally located just a few meters from the field, increasing exposure to pesticides of residents not directly involved in agricultural activities. Indeed, this study indicated that the resident group could be at risk from secondary exposure to pesticides, which can occur due to pesticide drift from the field, dust brought in from the farms (on clothing, skin or hair) and/or during the washing of farmers' impermeable clothing. Women of child-bearing age are especially vulnerable to adverse effects of pesticides. According to the WHO (2006b), some pesticides may affect puberty hormones and gene expression, which can influence the susceptibility to OPs. Eskenazi et al. (2004) showed that shortened gestational periods were related to increased exposure levels to OPs in the latter part of pregnancy in a Californian agricultural population. OPs have been shown to cross the placental barrier of laboratory rats and are eliminated through milk, exposing pups at an early developmental stage (Silva de Assis et al., 2011).

Enzyme activity values may vary for reasons not associated with OP and OC exposure, including liver function in the case of BChE, and erythropoiesis for AChE. Patients with hepatitis, cirrhosis, malnutrition, chronic alcoholism and dermatomyositis show low BChE activity. Individuals with leukemia, neoplasm and haemolytic anaemia have lower AChE activity (Marone et al., 2000; Stefanidou et al., 2009). In this study, the evaluation of erythropoiesis to detect anemia was not performed due to logistic problems, but increased bilirubin levels may indicate certain types of anemia (Pincus & Abraham, 2008). Although the mean levels were not significantly different, 11 farmers had at least one bilirubin parameter higher than the reference level, a condition found in only three individuals from their control group. While the bilirubin levels (indirect and total) in the resident group were within the normal range, the means were significantly higher than those in the control group. These higher levels may indicate a nutritional deficiency that could contribute to the decreased levels of BChE found in the residents in comparison with their control group, a result not found in the farmer group. Individuals with altered hepatic enzymes (mostly farmers) may have liver injury. However, this condition could not be confirmed in this

study. All the individuals who presented alterations in their blood parameters and ChE levels were referred to a physician for further investigation of their health conditions.

One main limitation to this work was related to the convenience sampling technique, which may lead to bias and may not reflect the entire population of the study area (Hedt and Pagano, 2011). One source of bias could be that only farmers who are comfortable with their agricultural practices agreed to participate in the study. On the other hand, the concern about their agriculture practices and health might also have led some farms to join the study. The relatively small number of participants may have limited our extrapolation to the total rural population of each community. If we were to statistically define the number of participants, 285 farms from Taquara would need to be included in the study (5% sampling error at 95% confidence level). Our recruitment process, however, showed us that this number would be impossible to reach, mainly due to the difficulty in having access to a large number of farmers during a single visit, to the fact that the farmers are constantly changing activities and moving to other areas in the region, and that some were not using OPs and CAR for pest management. We faced a major difficulty in convincing the farmers from the Goianópolis area to participate in the study. This population has no technical support from the government and the managers of the planting areas probably did not feel at ease to participate in a study that could reveal agricultural practices that are not recommended. Although it was explained that the study had no legal intention, they were probably afraid to be held responsible for any problem we could have found among the farmers under their responsibility. Farmers from Taquara receive technical support from EMATER, and the institution's outreach to farmers proved crucial to the recruitment process. We did not find, however, significant differences in the KAP study between the farmers from the two locations. All the farmers with enzyme depletion rates higher the cut-off levels were from Taquara, but it is possible that the number of farmers from Goianópolis was too small to detect relevant enzyme depletion.

Some studies have suggested that a true unexposed baseline measurement is reached around 30-60 days after exposure (Midtling et al, 1985; Cocker et al., 2002, DOSH, 2010). However, this period is difficult to be reached in an ongoing workplace, such as the areas investigated in this study, where the farmers apply pesticides during the entire year. We were able to establish a 15-day non-exposure

period, during which the baseline could not have been reached, mainly for AChE, an enzyme with a lower turnover when compared with BChE (Midtling et al, 1985). Hence, it is possible that in some cases our sampling protocol did not allow the detection of enzyme depletion after exposure.

5. Conclusion

This study has shown that although most farmers are aware that pesticides can harm his/her health, many still use the PPDs in an incomplete manner, or not at all, during pesticide handling, indicating that continuing local government education programs focused on the rational and safe use of pesticides by the farmers are still needed in the region. Furthermore, it is necessary to increase awareness among government authorities and the rural population that the residents in family farming settings may also be at risk from secondary exposure to pesticides. In this case, special education programs and risk communication strategies should be implemented in these areas to protect this population.

6. Acknowledgments

We would like to thank the Goianópolis Health Department, the Planaltina Health Department, and EMATER – DF for all the support provided during the conduction of this work. We also would like to thank the University Hospital of Brasília for performing the routine blood analysis. This work was financially supported by the Federal District Research Foundation (FAP-DF) and by the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education (CAPES) through a Master's scholarship granted to Juliana Pasiani.

6 - CONCLUSÕES

A produção agrícola em qualquer escala atualmente depende do uso de agrotóxicos, e o abandono desses produtos pode resultar em sérios prejuízos econômicos e diminuição da disponibilidade de alimentos. Porém, o uso inadequado dos agrotóxicos tem impacto importante na saúde daqueles que os utilizam, o que no Brasil é refletido pelo aumento dos casos de intoxicação no campo. Atualmente, produtos agrotóxicos contendo inseticidas organofosforados e os carbamatos são os mais tóxicos comercializados no país, e os responsáveis pela maioria das intoxicações relatadas.

Os agricultores de Goianápolis e Taquara utilizam largamente estes inseticidas, que são aplicados principalmente com pulverizadores costais, o que aumenta o potencial de exposição dos trabalhadores aos produtos e a ocorrência de efeitos adversos. Embora estes agricultores reconheçam que os agrotóxicos possam fazer mal à saúde, o uso de EPI durante seu manejo é incompleto na maioria das vezes, ou até mesmo inexistente, principalmente entre os trabalhadores de agricultura familiar. Uma menor atividade das enzimas colinesterásicas encontrada em vários trabalhadores e o maior número de alterações nos exames de sangue de rotina encontrado neste grupo indica que esta população pode estar numa situação de risco que pode levar ao desenvolvimento de efeitos adversos e doenças crônicas. O presente estudo mostrou também que familiares de agricultores estão expostos a níveis inseguros de agrotóxicos, identificado pela baixa atividade de AChE no período onde havia maior aplicação dos inseticidas na área de plantio.

Os principais resultados encontrados neste estudo foram apresentados à população rural de Taquara em um evento da cooperativa local. Os agricultores se mostraram bastante interessados em ouvir nosso relato e foram participativos nas discussões. A maioria desconhecia que a exposição prolongada aos agrotóxicos poderia ocasionar algum dano à saúde e ficou evidente o pouco conhecimento relacionado à exposição de pessoas que moram perto da área de plantio e como esta exposição poderia ocorrer.

O não aceite da grande maioria dos gerentes das áreas agrícolas de Goianápolis em participar do projeto pode ter sido devido ao receio de que fossemos ter algum papel de fiscalização do trabalho no campo, o que nos fez acreditar que

talvez possuíssem práticas que não eram compatíveis com as normas. Porém, os resultados do estudo não indicaram diferenças importantes no conhecimento, atitudes e práticas no uso de agrotóxicos entre as duas comunidades, apesar dos agricultores de Goianópolis não terem uma presença sistemática da EMATER na região. O apoio da EMATER-DF foi sem dúvida essencial no nosso trabalho em Taquara.

Vimos que a realidade brasileira no campo vai além da falta de informação, e é preciso conhecer a realidade na qual estão inseridos. Analisando o grau de exposição de duas comunidades agrícolas do Centro Oeste aos agrotóxicos e relacionando-o com os conhecimentos, atitudes e práticas foi possível pontuar as fragilidades no conhecimento e percepção em relação a estes produtos. Programas educacionais e políticas governamentais direcionados a essas populações deve ser contínua e pode resultar em mudanças concretas no conhecimento e atitudes relacionadas aos agrotóxicos e melhora na qualidade de vida dessas pessoas e de suas famílias.

REFERÊNCIAS

1. AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Produtos formulados. Disponível em http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons, acessado em 17.12.2011.
2. ALVES, S.M.F., FERNANDES, P.M., REIS, E.F. Análise de correspondência como instrumento para descrição do perfil do trabalhador da cultura de tomate de mesa em Goiás. **Ciênc Rural**. 39 (7), 2042-2049, 2009.
3. AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev Bras Epidemiol**. 6(2), 158-170, 2003.
4. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos e Toxicologia. Disponível em www.anvisa.gov.br, acessado em 27.12.2011.
5. ANWAR, W.A. Biomarkers of human exposure to pesticides. **Environ Health Perspect**. 105 (4), 801-806, 1997.
6. ARAÚJO, A.C.P., NOGUEIRA, D.P., AUGUSTO, L.G.S. Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate. **Rev Saúde Pública**. 34 (3), 309-313, 2000.
7. ASSIS, H.C.S.; NICARETTA, L.; MARQUES, M.C.A.M.; CRESTANI, S.; SOARES, K.C.; OLMEDO, A.; DALSENTER, P.R. Anticholinesterasic activity of endosulfan in wistar rats. **Bull Environ Contam Toxicol**, vol. 86, p. 368–372, 2011.
8. AUTRUP, H. Transplacental transfer of genotoxins and transplacental carcinogenesis. **Environ Health Perspect**. 101 (2), 33-38, 1993.
9. BALLANTYNE, B., SALEM, H. Occupational toxicology and occupational hygiene aspects of organophosphate and carbamate anticholinesterases with particular reference to pesticides. In: Grupta, R. C. Toxicology of Organophosphate and Carbamates. 1st edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006. p. 567-595.
10. BARR, D.B., ANGERER, J. Potential uses of biomonitoring data: a case study using the organophosphorus pesticides chlorpyrifos and malation. **Environ Health Perspect**. 114 (11), 1763-1769, 2009.

11. BIGATÃO, D.A.R. Cuidados e destinação final de embalagens, na utilização de agrotóxicos por produtores rurais no município de Itaporã – MS. [Dissertação]. Distrito Federal, Brasília; 2009.
12. BLANCO, L.E., ARAGÓN, A., LUNDBERG, I., LIDÉN, C., WESSELING, C., NISE, G. Determinants of dermal exposure among Nicaraguan subsistence farmers during pesticide applications with backpack sprayers. **Ann Occup Hyg.** 49(1), 17-24, 2005.
13. BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Norma Regulamentadora 07 Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional, 1978. Disponível em <http://portal.mte.gov.br/legislacao/normas-regulamentadoras-1.htm>, acessado em 27.12.2011.
14. BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm, acessado em 27.12.2011.
15. BRASIL. Resolução nº. 899 de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em www.anvisa.gov.br, acessado em 05.05.2009.
16. BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Norma Regulamentadora 31. Segurança e Saúde no Trabalho na Agricultura, Pecuária Silvicultura, Exploração Florestal e Aqüicultura, 2005. Disponível em <http://portal.mte.gov.br/legislacao/normas-regulamentadoras-1.htm>, acessado em 27.12.2011.
17. BROWN, A.E., MILLER, M., KEIFER, M. Cholinesterase monitoring – A guide for the health professional. Pesticide Information Leaflet number 30. University of Maryland, 2006. Disponível em www.entmclasses.umd.edu/peap/leaflets/pil30.pdf, acessado em 02.01.2012.
18. CASTORINA, R., BRADMAN, A., MCKONE, T.E., BARR, D.B., HARNLY, M. E., ESKENAZI, B. Cumulative organophosphate pesticide exposure and risk assessment among pregnant women living in an agricultural community: a case study from the CHAMACOS cohort. **Environ Health Perspect.** 111 (13), 1640-1648, 2003.
19. CASTRO, J.S.M., CONFALONIERI, U. Uso de agrotóxicos no município de Cachoeiras de Macacu (RJ). **Ciênc Saúde Coletiva.** 10 (2), 472-482, 2005.
20. CHAMBERS, H.W., BOONE, J.S., CARR, R.L., CHAMBERS, J.E. Chemistry of Organophosphorus Insecticides. In: Krieger R. Handbook of Pesticide Toxicology: Agents. 2nd edition. California: Academic press; 2001. p. 913-917.

21. CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Perspectivas da agricultura para 2012, balanço de 2011. Disponível em <http://www.cna.org.br/>, acessado em 24.12.2011.
22. CNPH. Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças do Ministério da Agricultura. Disponível em <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/tomate/#txtabela>, acessado em 12.04.2009.
23. COCKER, J., MASON, H.J., GARFITT, S.J., JONES, K. Biological Monitoring of Exposure to Organophosphate Pesticides. **Toxicol Lett.** 134, 97-103, 2002.
24. CPCN. Compendium of Pesticide Common Names. Disponível em http://www.alanwood.net/pesticides/index_cn_frame.html, acessado em 06.01.2012.
25. CUNHA, J.P.A.R. Simulação da deriva de agrotóxicos em diferentes condições de pulverização. **Ciênc Agrotec.** 32 (5), 1616-1621, 2008.
26. CUNHA, J.P.A.R., TEIXEIRA, M.M., COURY, J.R., FERREIRA, L.R. Avaliação de estratégias para redução de deriva de agrotóxicos em pulverizações hidráulicas. **Planta Daninha.** 21 (2), 325-332, 2003.
27. DAMALAS, C.A., HASHEMI, S.M. Pesticide risk perception and use of personal protective equipment among young and old cotton growers in northern Greece. **Agrociência.** 44 (3), 363-371, 2010.
28. DAVIS, A.A., JAMES, LAH, J.J., LEVEY, A.I. Neurobiology of Alzheimer's disease. In: Schatzberg, A.F., Nemeroff, C.B. The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology. 4th edition. Arlington: American Psychiatric Publishing. 2009. p. 987-1006.
29. DELGADO, I.F., PAUGARTTEN, F.J.R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saúde Pública.** 20 (1), 180-186, 2004.
30. DVIR, H., SILMAN, I., HAREL, M., ROSENBERRY, T.L., SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. **Chem Bio Interact.** 187, 10-22, 2010.
31. DOSH. Division of Occupational Safety & Health. Cholinesterase Monitoring for Agricultural Pesticides Handlers. Department of Labor & Industries, 2010. Disponível em <http://www.lni.wa.gov/Safety/Topics/AtoZ/Cholinesterase/files/ProvidersGuidelines1.pdf>, acessado em 10.11.2011.

32. ECOBICHON, D.J. Carbamate Inseticidas. In: Krieger R. Handbook of Pesticide Toxicology: Agents. 2nd edition. California: Academic press; 2001. p. 1087-1106.
33. ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V.J.R., FEATHER-STONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.** 7, 88-95, 1961.
34. EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. Disponível em <http://www.emater.df.gov.br/>, acessado em 10.11.2011
35. EPA. Environmental Protection Agency. About pesticides. Disponível em <http://www.epa.gov/pesticides/about/>, acessado em 15.12.2011a.
36. EPA. Environmental Protection Agency. Types of Pesticides. Disponível em <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>, acessado em 17.12.2011b.
37. EPA. Environmental Protection Agency. Types of Pesticides. Disponível em <http://www.epa.gov/pesticides/about/intheworks/volatilization.htm>, acessado em 17.12.2011c.
38. ESKENAZI B., HARLEY K., BRADMAN A., WELTZIEN E., JEWELL N.P., BARR D.B., FURLONG C.E., HOLLAND N.T. Association of in utero organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population. **Environ Health Perspect.** 112(10), 1116-24, 2004.
39. FARIA, N.M.X., FACCHINI, L.A., FASSA, A.G., TOMASI, E. Estudo transversal sobre saúde mental; de agricultores da Serra Gaúcha (Brasil). **Rev Saúde Pública.** 33 (4), 391-400, 1999.
40. FARIA, N.M.X., FACCHINI, L.A., FASSA, A.G., TOMASI, E. Processo de produção rural e saúde da serra gaúcha: um estudo descritivo. **Cad Saúde Pública.** 16 (1), 115-128, 2000.
41. FARIA, N.M.X., FACCHINI, L.A., FASSA, A.G., TOMASI, E. Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. **Cad Saúde Pública.** 20 (5), 1298-1308, 2004.
42. FARIA, N.M.X., FACCHINI, L.A., FASSA, A.G., TOMASI, E. Agrotóxicos e sintomas respiratórios entre agricultores. **Cad Saúde Pública.** 39 (6), 973-981, 2005.
43. FARIA, N.M.X., FASSA, A.G., FACCHINI, L.A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciênc Saúde Coletiva.** 12 (1), 25-38, 2007.

44. FARIA, N.M.X., ROSA, J.A.R., FACCHINI, L.A. Intoxicações por agrotóxicos entre trabalhadores rurais de fruticultura, Bento Gonçalves, RS. **Cad Saúde Pública**. 43 (2), 335-344, 2009.
45. FENSKE, R.A., LU, C., BARR, D., NEEDHAM, L. Children's exposure to chlorpyrifos and parathion in an agricultural community in Central Washington State. **Environ Health Perspect**. 10 (5), 549-553, 2002.
46. FONSECA M.G.U., PERES, F., FIRMO, J.O.A., UCHOA, E. Percepção de risco: maneiras de pensar e agir no manejo de agrotóxicos. **Ciênc Saúde Coletiva**. 12 (1), 39-50, 2007.
47. FUKUTO, T.R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environ Health Perspect**. 87, 245-254, 1990.
48. GALLO, M.A., LAWRYK, N.J., 1991. Organic phosphorous pesticides. In: Hayes, W.J., Laws, E.R. Handbook of Pesticide Toxicology (2). 3rd edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 1991. p. 917–1123.
49. GALLOWAY, T., HANDY, R. Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides. **Ecotoxicology**. 12, 345-363, 2003.
50. GARCIA, A.M., RAMIREZ, A., LACASAÑA, M. Prácticas de utilización de plaguicidas en agricultores. **Gac Sanit**. 16, 236-40, 2002.
51. GARCIA, E.G., BUSSACOS, M.A., FISCHER, F.M. Impacto da legislação no registro de agrotóxicos de maior toxicidade no Brasil. **Cad Saúde Pública**. 39 (5), 832-39, 2005.
52. GARCIA, S.J., ASCHNER, M., SYVERSEN, T. Interspecies variation in toxicity of cholinesterase inhibitors. In: Gupta, R.C. Toxicology of Organophosphate and Carbamates. 1st edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006. p. 145-160.
53. GIBSON, G., KOIFMAM, S. Consumo de agrotóxicos e distribuição temporal da proporção de nascimentos masculinos no estado do Paraná, Brasil. **Cad Panam Salud Publica**. 24 (4), 240-247, 2008.
54. GOMIDE, M. Agrotóxico: que nome dar? **Ciênc. Saúde Coletiva**. 10 (4), 1047-1054, 2005.
55. GOOGLE MAPS. Disponível em <http://maps.google.com.br/>, acessado em 11.01.2012
56. GRIFFITH, W., CURL, C.L., FENSKE, R.A., LU, C.A., VIGOREN, E.M., FAUSTMAN, E.M. Organophosphate pesticide metabolite levels in pre-school

- children in an agricultural community: within and between-child variability in a longitudinal study. **Environ Res.** 111, 751-756, 2011.
57. GRUPTA, R.C. Classification and Uses of Organophosphates and Carbamates. In: Gupta, R.C. Toxicology of Organophosphate and Carbamates. 1st edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006. p. 5-24.
58. HEADT, B.L., PAGANO, M. Health indicators: eliminating bias from convenience sampling estimators. **Stat Med.** 30 (5), 560-568, 2011.
59. HURTIG, A.K., SAM SEBASTIAN, M., SOTO, A., SHINGRE, A., ZAMBRANO, D., GUERRERO, W. Pesticide use among farmers in the Amazon basin of Ecuador. **Arch Environ Health.** 58, 223-228, 2003.
60. INPEV. Instituto Nacional de Processamento de Embalagens vazias. Disponível em <http://www.inpev.org.br>, acessado em 10.08.2011.
61. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário de 2006a. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm>, acessado em 22.12.2012.
62. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário de 2006b. Publicação Completa. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuario.pdf>, acessado em 22.12.2012.
63. JAGA, K., DHARMANI, C. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. **Pan Am J Public Health.** 14 (3), 171-185, 2003.
64. JINTANA, S., SMING, K., KRONGTONG, Y., THANYACHAI, S. Cholinesterase activity, pesticide exposure and health impact in a population exposed to organophosphate. **Int Arch Occup Environ Health.** 82, 833-842, 2009.
65. KARLSSON, S.I., Agricultural pesticides in developing countries – a multilevel governance challenge. **Environment.** 46, 22-41, 2004.
66. KARUNAMOORTHY, K., MOHAMMED, A., JEMAL, Z. Peasant association member's knowledge, attitudes, and practices towards safe use of pesticide management. **Am J Ind Med.** 54(12), 965-70, 2011.
67. KONRADSEN, F., VAN DER HOEK, W., COLE, D.C., HUTCHINSON, G., DAISLEY, H., SINGH, S., EDDLESTON, M. Reducing acute poisoning in developing countries – options for restricting the availability of pesticides. **Toxicology.** 192, 249-261, 2003.

- 68.KOUABENAN, D.R. Beliefs and the perception of risk and accidents. **Risk Analysis**. 18 (3), p. 243-252. 1998.
- 69.LATORRACA, A., MARQUER, G.J.G., SOUSA, K.V., FORNES, N.S. Agrotóxicos utilizados na produção do tomate em Goiânia e Goianópolis e efeitos na saúde humana. **Comun Ciênc Saúde**. 19 (4), 365-374, 2008.
- 70.LEVIGARD, Y.E., ROZEMBERG, B. A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas de “nervos” no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos. **Cad Saúde Pública**. 20 (6), 1515-1524, 2004.
- 71.LITCHFIELD, M.H. A review of the requirements for protective clothing for agricultural workers in hot climates. In: Mansdorf, S. Z., Sager, R., Nielson, A. P. Performance of Protective Clothing. Proc. 2nd Symposium, ASTM STP 989. Philadelphia: American Society for Testing and Materials; 1988. p. 796-801.
- 72.LOTTI, M. Cholinesterase Inhibition: Complexities in Interpretation. **Clin Chem**. 41 (12), 1814-1818, 1995.
- 73.LOTTI, M. Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In: Krieger R. Handbook of Pesticide Toxicology: Agents. 2nd edition. California: Academic press; 2001. p. 1043-1085
- 74.LU, C., FENSKE, R.A., SIMCOX, N.J., KALMAN, D. Pesticide exposure of children in an agricultural community: evidence of household proximity to farmland and take home exposure pathways. **Environ Res**. 84 (A), 290-302, 2000.
- 75.LU, C., KEDAN, G., FISHER-ANDERSEM, J., KISSEL, J. C., FENSKE, R. A. Multipathway organophosphorus pesticide exposure of preschool children living in agricultural and monogricultural communities. **Environ Res**. 96, 283-289, 2004.
- 76.MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário. Disponível em http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons, acessado em 15.09.2011.
- 77.MARONI, M., COLOSI, C., FERIOLI, A., FAIT, A. Organophosphorus pesticides. **Toxicology**. 143, 5-46, 2000.
- 78.MASSON, P., NACHON, F., LOCKRIDGE, O. Structural approach to the aging of phosphorylated cholinesterases. **Chem Biol Interact**. 187, 157-162, 2010.
- 79.MASSOULIÉ, J., BOM, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Ann Rev Neurosci**. 5, 57-107, 1982.

80. MIDTLING, J.E., BARNETT, P.G., COYE, M.J., VELASCO, A.R., ROMERO, P., CLEMENTS, C.L., O'MALLEY, M.A., TOBIN, M.W., ROSE, T.G., MONOSSON, I.H. Clinical management of field worker organophosphate poisoning. **Clin Med.** 142, 514-518, 1985.
81. MOFFETT, D.B. Public Health Impacts of Organophosphorus and carbamates. In: Gupta, R.C. Toxicology of Organophosphate and Carbamates. 1st edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006. p. 599-606.
82. MOREIRA, J.C., JACOB, S.C., PERES, F., LIMA, J.S., MEYER, A., OLIVEIRA-SILVA, J.J., SARCINELLI, P.N., BATISTA, D.F., EGLER, M., FARIA, M.V.C., ARAÚJO, A.J.A., KUBOTA, A.H., SOARES, M.O., ALVES, S.R., MOURA, C.M., CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciênc Saúde Coletiva.** 7 (2), 299-311, 2002.
83. MORETTO, A., LOTTI, M. Peripheral nervous system effects and delayed neuropathy. In: Gupta, R.C. Toxicology of Organophosphate and Carbamates. 1st edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006. p. 361-370.
84. MS. Ministério da Saúde. Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>, acessado em 22.12.2012
85. OLIVEIRA, S.M., GOMES, T.C.C. Contaminação por agrotóxicos em população de área urbana – Petrópolis, RJ. **Cad Saúde Pública.** 6 (1), 18-26, 1990.
86. OLIVEIRA-SILVA J.J., ALVES S.R., INÁCIO A.F., MEYER A., SARCINELLI P.N., MATTOS R.C., FERREIRA M.F.A., CUNHA J.C., MOREIRA, J.C. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. **Hum Exp Toxicol.** 19, 173-177, 2000.
87. OLIVEIRA-SILVA, J.J., ALVES, S.R., MEYER, A., PEREZZ, F., SARCINELLI, P.N., MATTOS, R.C.O.C., MOREIRA, J.C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Rev Saúde Pública.** 35 (2), 130-135, 2001.
88. OPAS/OMS. Manual de Vigilância Sanitária da Saúde de Populações Expostas a Pesticidas. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial de Saúde. Brasília, 1996 Disponível em www.opas.org.br/sistema/arquivos/livro2.pdf, acessado em 27.12.2011.

89. PERES, F., MOREIRA, J.C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saúde Pública**. 23 (4), 5612-5621, 2007.
90. PERES, F., OLIVEIRA-SILVA, J.J., DELLA-ROSA, H.V., LUCCA, S.R. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciênc Saúde Coletiva**. 10 (sup), 27-37, 2005a.
91. PERES, F., ROZEMBERG, B., LUCCA, S.R. Percepção de risco no trabalho rural em uma região agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: agrotóxicos, saúde e ambiente. **Cad Saúde Pública**. 21 (6), 1836-1844. 2005b.
92. PIGNATI, W.A., MACHADI, J.M.H., CABRAL, J.F. Acidente rural ampliado: o caso das "chuvas" de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde - MT. **Ciênc Saúde Coletiva**. 12 (1), 105-114, 2007.
93. PINCUS, M., ABRAHAM, N.Z. Interpretação de resultados laboratoriais. In: John Bernard Henry. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. Segunda Edição. São Paulo: Manolo Press; 2008. p.106-121.
94. PINHO G.P., NEVES A.A., QUEIROZ M.E.L.R. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. **Quim Nova**. 32 (1), 92-98, 2009.
95. PIRES, D.C. Agrotóxicos no Estado do Mato Grosso do Sul – Avaliação das Intoxicações e dos Suicídios no Município de Fátima do Sul [Tese]. Distrito Federal, Brasília; 2005.
96. PIRES, D.X., CALDAS, E.D., RECENA, M.C.P. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Cad Saúde Pública**. 21 (3), 804-814, 2005.
97. PRADO, M.A.M., REIS, R.A.M., PRADO, V.F., MELLO, M.C., GÓMEZ, M.V., MELLO, F.G. Regulations of acetylcholinesterase and storage. **Neurochem Int**. 41, 291-199, 2002.
98. PRONAF. Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar Disponível em http://www.pronaf.gov.br/dater/arquivos/livre_comercio_agrotoxicos.pdf, acessado em 23.04.2010.
99. RAMOS, H.H., MAZIERO, J.V.G., YANAI, K., CORRÊA, I.M., SEVERINO, F.J., KANNO, O.Y., MARTINS, P.S., MURA, C. MORGANO, M.A. Exposição dérmica

- do aplicador de agrotóxicos na cultura da uva, com diferentes pulverizadores. **Rev Bras Eng Agríc Ambient.** 6 (1), 175-179, 2002.
100. RAND, B.J. Acetylcholine. In: The *C. elegans* Research Community. WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology. Oklahoma City: Online; 2007. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19736/>, acessado em 16.12.2011.
101. RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K. Transmissão Colinérgica. Farmacologia. 5ª. Edição. São Paulo: Editora Elsevier.; 2004. p. 153-180.
102. REBELO, R.M., VASCONCELOS, R.A., BUYS, B.D.M.C., REZENDE, J.A., MORAES, K.O.C., OLIVEIRA, R.P. Pesticides and related products commercialized in Brazil in 2009. An environmental approach. Brasília; **IBAMA.** 30-84, 2010.
103. REBELO, R.M., CALDAS, E.D., HELIODORO, V.O., REBELO, R.M. Intoxicações por agrotóxicos no Distrito Federal, Brasil, de 2004 a 2007 – análise da notificação ao Centro de Informação e Assistência Toxicológica. **Ciênc Saúde Coletiva.** 16 (8), 3493-3502, 2011.
104. RECENA, M.C.P., CALDAS, E.D., PIRES, D.X., PONTES, E.R.J.C. Pesticides exposure in Culturama, Brasil – Knowledge, attitudes, and practices. **Environ Res.** 102, 230-236, 2006.
105. RECENA, M.C.P., CALDAS, E.D. Percepção de risco, atitudes e práticas no uso de agrotóxicos entre agricultores de Culturama, MS. **Rev Saúde Pública.** 42 (2), 294-301, 2008.
106. REINER, E., SIMEON-RUDOLF, V. Methods for measuring Cholinesterase Activities in Human Blood. Toxicology of Organophosphate and Carbamates. In: Gupta, R. C. Toxicology of Organophosphate and Carbamates. 1st edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006. p. 199-207.
107. RESTREPO, M., MUNOZ, N., DAY, N., PARRA, J.E., HERNANDEZ, C., BLETTNER, M., GIRALDO, A. Birth defects among children born to a population occupationally exposed to pesticides in Colombia. **Scad J Work Environ Health.** 16 (4), 239-246, 1990.
108. RIBEIRO, M.G., COLASSO, C.G., MONTEIRO, P., FILHO, W.R., YONAMINE, M. Occupational safety and health practices among flower greenhouses workers

- from Alto Tietê region (Brazil). **Sci Total Environ.** *In press, Correct Proof.* Disponível em 30.11.2011.
109. ROBERTS, D.M., KARUNARATHNA, A., BUCKLEY, N. A., MANUWEERA, G., SHERIFF, M.H.R., EDDLESTON, M. Influence of pesticide regulation on acute poisoning deaths in Sri Lanka. **Bulletin of the World Health Organization.** 81 (11), 789-798, 2003.
110. SAM, K.G., ANDRADE, H.H., PRADHAN, L., PRADHAN, A., SONES, S.J., RAO, P.G.M., SUDHAKAR, C. Effectiveness of an education program to promote pesticides safety among pesticides handlers of South India. **Int Arch Occup Environ Health.** 81, 787–795, 2008.
111. SANSON, B., NACHON, F., COLLETIER, J.P., FROMENT, M.T., TOKER, L., GREENBLATT, H.M., SUSSMAN, J.L., ASHANI, Y., MASSON, P., SILMAN, I., WEIK, M. Crystallographic snapshots of non aged and aged conjugates of soman with acetylcholinesterase, and of a ternary complex of the aged conjugate with pralidoxim. **J Med Chem.** 52, 7593-7603, 2009.
112. SANTOS, M.M., NORONHA J.F. Diagnóstico da cultura do tomate de mesa no município de Goianópolis, estado de Goiás, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical.** 31 (1), 29-34, 2001.
113. SATOH, T., 2006. Global Epidemiology of Organophosphate and Carbamate Poisonings. In: Gupta, R.C. Toxicology of Organophosphate and Carbamates. 1st edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006. p. 89-100.
114. SIDRA. Sistema IBGE de Recuperação Automática. Censo 2006. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br>, acessado em 22.12.2012.
115. SILVA, J.M., NOVATO-SILVA, E., FARIA, H.P., PINHEIRO, T.M.M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciênc Saúde Coletiva.** 10 (4), 891-903, 2005.
116. SILVA DE ASSIS, H.C., NICARETTA, L., MARQUES, M.C.A.M., CRESTANI, S., SOARES, K.C., OLMEDO, A., DALSENTER, P.R. Anticholinesterasic Activity of Endosulfan in Wistar Rats. **Bull Environ Contam Toxicol.** 86, 368–372, 2011.
117. SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em <http://www.sindag.com.br/conexao/31/>, acessado em 20.12.2011.

118. SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Disponível em www.fiocruz.br/sinitox/agrotoxicos/tabelas_casos/serie_historicas.htm, acessado em 19.03.2009.
119. SLOVIC, P. Perception of risk. **Science**. 236, p. 280-285. 1987.
120. SOARES, W.L., ALMEIDA, R.M.V.R., MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Cad Saúde Pública**. 19 (4), 1117-1127, 2003.
121. SOARES, W.L., FREITAS, E.A.V., COUTINHO, J.A.G. Trabalho rural e saúde: intoxicações por agrotóxicos no município de Teresópolis – RJ. **Rev Econ Sociol Rural**. 43 (4), 685-701, 2005.
122. SOBREIRA, A.E.G., ADISSI, P.J. Agrotóxicos: falsas premissas e debates. **Ciênc Saúde Coletiva**. 8 (4), 985-990, 2003.
123. STEFANIDOU M., ATHANASELIS S., SPILIOPOULOU H. Butyrylcholinesterase: biomarker for exposure to organophosphorus insecticides. **J Intern Med**. 39, 57-60, 2009.
124. STOKES, L., STARK, A., MARSHALL, E., NARANG, A. Neurotoxicity among pesticide applicators exposed to organophosphates. **Occup Environ Med**. 52, 648-653, 1995.
125. SULTATOS, L.G. Interactions of Organophosphorus and Carbamate Compounds with Cholinesterase. In: Gupta, R.C. Toxicology of Organophosphate and Carbamates. 1st edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006. p. 209-218.
126. THORNE, P.S. Occupational Toxicology. In: Mc Graw Hill. Casarett & Doull's. Toxicology: The Basic Science of Poisons. 5th edition. Estados Unidos: McGrawHill Press; 2008. p. 1123-1140.
127. THUNDIYIL, J.G., STOEGER, J., BESBELLI, N., PRONCZUK, J. Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool. **Bulletin of the World Health Organization**. 86 (3), 205-209, 2004.
128. TIMCHALK, C. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. In: Gupta, R.C. Toxicology of Organophosphate and Carbamates. 1st edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006. p. 103-123.
129. THOMPSON, H.M. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. **Ecotoxicology**. 8, 369-384, 1999.

130. USEPA. United States Environmental Protection Agency. 2010. Agreement to terminate all uses of aldicarb. 2010. Disponível em [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/aldicarb fs.html](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/aldicarb_fs.html), acessado em 17.05.2011.
131. WAICHMAN, A.V., EVEB, E., NINA, N.C.S. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. **Crop Prot.** 26(4), 576–83, 2007.
132. WATTERSON, A. Pesticide Use. In: Watterson, A. Pesticide User's Health and Safety Handbook: An International Guide. 3rd edition. Michigan: Gower Publishing Company. 1988. p. 46-69.
133. WERNECK, G., HASSELMANN, M.H. Intoxicações exógenas em crianças menores de seis anos atendidas em hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro. **Rev Assoc Med Bras.** 55 (3), 302-307, 2009.
134. WHO. World Health Organization. Organophosphorus insecticides: A general Introduction. Environmental health criteria, 63, 1986. Disponível em <http://www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/FC89617A-1DB8-4AB6-82AD-75197CC7D67C/0/Organophosphorouspesticides.pdf>, acessado em 26.12.2011.
135. WHO. World Health Organization. Environmental Health Criteria 155, Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles, 1993. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm#SectionNumber:1.1>, acessado em 15.12.2011.
136. WHO. World Health Organization. Environmental Health Criteria 210. Principles for the Assessment of Risks to Human Health From Exposure to Chemicals, 1999. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc210.htm>, acessado em 15.12.2011.
137. WHO. World Health Organization. Environmental Health. Derman Absorption. Environmental Health Criteria 235, 2006a. Disponível em <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc235.pdf>, acessado em 15.12.2011.
138. WHO. World Health Organization. Environmental Health. Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals. Environmental Health Criteria 237, 2006b Disponível em <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc237.pdf>, acessado em 15.12.2011.

139. WILSON, B.W. Cholinesterases. In: Krieger R. Handbook of Pesticide Toxicology: Agents. 2nd edition. California: Academic press; 2001. p. 967-985.
140. WOREK, F., KOLLER, M., THIERMANN, H., SZINICZ, L. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. **Toxicology**. 214, 182-189, 2005.

ANEXO A - QUESTIONÁRIO

Nome do Entrevistador _____ Data : ___/___/___
 Nome do entrevistado: _____
 Endereço: _____ Cidade: _____
 Telefone () - _____ Idade : _____ anos

1. A propriedade na qual trabalha é de::
 agricultura familiar – ir para questão 2
 meeiro/outro – ir para questão 3
2. Quantas pessoas moram na propriedade ? _____ pessoas

Parentesco	Idade	Trabalha na lavoura
_____	_____	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
_____	_____	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
_____	_____	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
_____	_____	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
_____	_____	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

3. Até que ano você estudou?
 Analfabeto Alfabetizado s/ escolarização Primário incompleto
 Secundário incompleto Outro: _____
4. Você ingere bebida alcoólica? Sim Não

Em caso de não passe para a pergunta 6, em caso de sim continue

5. Com que frequência?
 Diariamente Semanalmente Só nos finais de semana De vez em quando
6. Quais são as tarefas que você costuma fazer, no geral?
 Preparar solo/plantar Usar produtos químicos na lavoura
 Transportar/armazenar Colher Lidar com animais
 Limpar equipamentos e utensílios
 Outro: _____
7. Na sua opinião, seu trabalho na agricultura pode trazer algum problema para a sua saúde?
 Sim Não
8. Você e os outros moradores/agricultores da propriedade consomem alimentos produzidos na propriedade?
 Sim Não
9. Quais são as 4 principais culturas produzidas na propriedade?
 A. _____ B. _____ C. _____
 D. _____
10. Em média, você trabalha quantas horas por dia na lavoura?
 Até 5 horas de 5-8 horas Mais de 8 horas
11. Qual o nome que você usa para designar esses produtos?
 Veneno Agrotóxico Pesticida
 Remédio Outro: _____
12. Há quanto tempo está sem usar esses produtos?
 a 1 dia Entre 2 e 3 dias Entre 4 e 5 dias
 Entre 1 semana e 2(duas) semanas Mais de 2 semanas
13. Durante quantos anos você vem usando (ou usou) esses produtos?

- () Até 5 anos () 5-10 anos () 10-20 anos
 () 20-30 anos () Mais de 30 anos

14. Quais agrotóxicos foram usados na propriedade na última aplicação?

- () Elsan () Deltaphos () Evolution () Hostathion
 () Lorsban () Dithane () Outros: _____

15. Você acha necessário o uso desses produtos nas lavouras ? () Sim () Não

16. Qual o principal tipo de equipamento usado, na propriedade, para aplicar esses produtos?

- () Pulverizador costal manual () Pulverizador costal motorizado
 () Pulverizador puxado por trator () Outros : _____

17. O que é feito com a sobra desses produtos já preparados, depois de serem aplicados?

- () Guarda para outra aplicação () Aplica na Lavoura até terminar
 () Joga no chão () Faz na medida certa
 () Joga em algum açude/rio () Outros: _____

18. Onde são comprados os produtos utilizados na propriedade:

- () Revendedoras (comércio) () Cooperativa
 () Outros: _____

19. De quem você recebe orientação sobre o uso desses produtos:

- () Profissional da Emater
 () Pessoal da cooperativa/associação/revendedora
 () Campanhas do governo (estadual ou municipal)
 () Colegas de outras hortas/vizinhos
 () Nunca tive orientação técnica de agrônomos ou técnicos agrícolas
 () Outros: _____

20. Você segue essas orientações

- () Sim () Não () Às vezes/só no começo

21. Você costuma ler as instruções das embalagens desses produtos sobre a utilização na lavoura?

- () Sim () Não

22. Você costuma ler as instruções sobre cuidados e perigos dos produtos utilizados na lavoura?

- () Sim () Não

23. Você já recebeu algum material por escrito, como livretos, panfletos ou cartilhas, com orientações sobre o uso desses produtos ?

- () Sim () Não

Em caso de não passe para a pergunta 26, em caso de sim continue

24. Quando? () Neste ano () No ano passado (2009) () Antes de 2009 (ano passado)

25. De quem você recebeu este material ? _____

26. Você segue as instruções do receituário agrônomo para utilização desses produtos?

- () Não sei o que é isso () Sim () Não

27. Você obedece o tempo de carência após última aplicação antes da colheita?

- () Não sei o que é isso () Sim () Não

28. Você observa a direção do vento durante aplicação do produto? () Sim () Não

29. Você escolhe algum horário do dia para passar esses produtos na lavoura?

- () Sim () Não

Em caso de **não** passe para a questão 31, em caso de **sim** continue

30. Em qual horário preferencialmente você aplica esses produtos? _____
31. Você acha necessário o uso de EPI para proteger a saúde do agricultor? () Sim () Não
32. Você acha necessário o uso de EPI quando a plantação é nova/pequena? () Sim () Não
33. Costuma usar algum tipo de Equipamento de Proteção Individual (EPI) para lidar com estes “produtos”?

Equipamento	sempre	nunca	às vezes
Botas	()	()	()
Luvas	()	()	()
Chapéu	()	()	()
Roupas impermeáveis:	()	()	()
Máscara para produtos químicos	()	()	()
Outros: _____	()	()	()

Se **não** fizer uso de Roupas impermeáveis passe para a questão 35, em caso se **sim** continue

34. Após a aplicação desses produtos, o que você faz com a roupa impermeável?
- () Deixa secar – não lava () Deixa secar – lava nos finais de semana
- () Sempre lava – horta () Sempre lava – casa
- () Sempre lava – horta/finais de semana – casa
- () Outro: _____
35. Quem lava esta roupa?
- () o agricultor – na horta/esposa – casa () agricultor – horta/casa
- () esposa – casa () outro: _____
36. Você procura:
- | | sempre | nunca | às vezes |
|--|--------|-------|----------|
| Lavar as mãos cada vez que lida c/ esses “produtos”? | () | () | () |
| Tomar banho após o trabalho c/ esses “produtos”? | () | () | () |
| Trocar de roupa todos os dias após usar os “produtos”? | () | () | () |
| Evitar comer ou fumar enquanto usa os “produtos”? | () | () | () |
37. Onde ficam guardados estes produtos na propriedade?
- () Em depósito reservado, próprio para esses produtos
- () Em local da casa de moradia: porão, armários, canto, etc.
- () Em lugar fora da casa de moradia onde já são guardados outros produtos agrícolas, como celeiro, paiol..
- () Outros, quais : _____
38. O que é feito com as embalagens vazias?
- () Deixa em algum lugar no campo
- () Enterra/Queima
- () Guarda em lugar próprio para depois devolver ao comerciante/revendedora/cooperativa
- () Joga fora em lixo comum
- () Não sabe
- () Outros Quais: _____
39. Onde são lavados os equipamentos de aplicação:
- () Não são lavados () No poço – lavoura () No chão - lavoura
- () Outro: _____
40. Você já sentiu algum mal estar por ter usado estes “produtos” ? () Sim () Não

Em caso de **não** passe para o n° 48, em caso de **sim** continue

41. Quando foi a última vez que sentiu mal estar por causa destes “produtos”?
Mês : _____ Ano: _____

42. O que você sentiu?

43. Você já foi intoxicado por estes produtos? () Sim () Não

Em caso de não passe para o nº 48, em caso de sim continue

44. Quando foi a sua ultima intoxicação por estes produtos ?
Mês: _____ Ano: _____

45. Quem diagnosticou esta intoxicação ?

- () Diagnosticada por médicos (onde: _____)
() Por outros profissionais de saúde (quem: _____)
() Por você mesmo (o entrevistado)
() Revendedores dos produtos
() Por outras pessoas: (quem _____)

46. Alguma vez foi hospitalizado(a) ou procurou ajuda médica por intoxicação devida a estes “produtos”?

- () Não () Sim, de 2 a 3 vezes
() Sim, uma vez () Sim, quatro ou mais vezes.

47. Precisou ficar afastado de suas atividades habituais?

- () Não precisou
() Sim, ficou parado por ___ dias
() Trocou para atividades mais leves

48. Você acha que estes produtos são prejudiciais a saúde das pessoas? () Sim () Não

Em caso de não passe para a pergunta nº 50, em caso de sim continue.

49. De quais pessoas?

- () que aplicam os produtos
() que trabalham na lavoura
() que moram próximo
() que vão comer o produto da lavoura
() Outro: _____

50. Você acha que os produtos utilizados na lavoura ficam nos alimentos produzidos?

- () Sim () Não

Em caso de não passe para a pergunta 52, em caso de sim continue.

51. Por quanto tempo?

- () Um dia ou menos
() Mais ou menos uma semana
() Mais ou menos 1 mês
() mais de um mês
() depende do tempo de carência

52. Você acha que esses produtos são prejudiciais a saúde dos animais? () Sim () Não

53. Você acha que estes produtos prejudicam o meio ambiente ? () Sim () Não

Em caso de não passe para a pergunta nº 55, em caso de sim continue

54. Em caso de sim, qual?

- () Águas de rios , córregos, açudes () Solo () Vegetação (mata,cerrado)

() Água de poço comum/semi-artesanal () Ar () Outro: _____

Você se sente bem informado sobre como devem ser utilizados esses produtos na lavoura para:

55. não prejudicar **a sua saúde** ? () Sim () Não () Mais ou menos
 56. não prejudicar **a saúde de outras pessoas**? () Sim () Não () Mais ou menos
 57. não prejudicar **o meio ambiente** ? () Sim () Não () Mais ou menos

58. Gostaria de ter mais informações sobre a utilização destes produtos ? () Sim () Não

Em caso de não passe para a pergunta 61, em caso de sim continue

59. Como você gostaria de receber estas informações ?

- () Filmes () Panfleto/Cartilhas () Palestras
 () Cursos de treinamento () Programas de rádio/TV

60. De quem principalmente você gostaria de receber estas informações ?

- () Revendedoras () Universidades () Cooperativas
 () EMATER () Governo () Área de saúde da sua cidade
 () Outras: _____

61. Está tomando algum remédio? () Sim () Não

Qual (is)?

Por quê?

Quem receitou?

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, GOIANÁPOLIS

Projeto de Pesquisa: “Avaliação de trabalhadores no cultivo de tomates no estado de Goiás: percepção, comportamento de segurança e índices de exposição”.

Leia cuidadosamente o que segue e pergunte a responsável pelo estudo, Juliana de Oliveira Pasiani, qualquer dúvida que tiver.

O senhor é convidado a participar da pesquisa para verificar a compreensão e a importância que os trabalhadores rurais têm sobre as instruções que recebem para a utilização de agrotóxicos e propor uma maneira de explicar as informações para que seja mais bem compreendida por todos. Isso será feito por meio de um questionário.
Caso fique constrangido com alguma pergunta, poderá não respondê-la.

O senhor também é convidado a doar amostras de sangue (totalizando 5 tubo de 4ml) para serem analisadas no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília e no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Brasília. Assim, serão avaliados os níveis de intoxicação por agrotóxicos e se há indicativo de alguma disfunção renal ou hepática em agricultores de Goianápolis.

O trabalho não apresenta nenhum risco para a sua saúde, entretanto, há o desconforto nas coletas de sangue devido ao uso de agulhas. Possui como benefício a análise da sua saúde em relação à exposição aos agrotóxicos organofosforados, já que os resultados dos exames feitos serão entregues ao senhor. Se necessário, será feito aconselhamento médico.

Informamos que o nome e a identidade dos participantes destas análises serão mantidos em total sigilo. Nos dados que serão divulgados em artigos científicos, aparecerão apenas sua idade, grau de escolaridade e sexo. Todo material utilizado durante a pesquisa ficarão sob a responsabilidade da responsável pelo projeto, Juliana de Oliveira Pasiani, e ficará localizado no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Para maiores informações telefonar para a Farmacêutica Juliana Pasiani – Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília (0XX61 – 3307.3671/9159.2592).

Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo chame o Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da UnB no telefone (0XX61 – 3107.1947)

- Sua participação no estudo é voluntária. Você pode escolher não fazer parte do estudo, ou pode desistir a qualquer momento.

- Li e entendi esse termo de consentimento, todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sou voluntário a fazer parte nesse estudo.

Nome do voluntário:

Assinatura:

Data:

Nome do pesquisador responsável:

Assinatura

Data:

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, NÚCLEO RURAL TAQUARA.

Projeto de Pesquisa: “Avaliação de trabalhadores no cultivo de hortaliças, verduras e legumes: percepção, comportamento de segurança e índices de exposição”.

Leia cuidadosamente o que segue e pergunte a responsável pelo estudo, Juliana de Oliveira Pasiani, qualquer dúvida que tiver.

O senhor é convidado a participar da pesquisa para verificar a compreensão e a importância que os trabalhadores rurais têm sobre as instruções que recebem para a utilização de agrotóxicos e propor uma maneira de explicar as informações para que seja mais bem compreendida por todos. Isso será feito por meio de um questionário.
Caso fique constrangido com alguma pergunta, poderá não respondê-la.

O senhor também é convidado a doar amostras de sangue (totalizando 5 tubo de 4ml) para serem analisadas no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília e no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Brasília. Assim, serão avaliados os níveis de intoxicação por agrotóxicos e se há indicativo de alguma disfunção renal ou hepática em agricultores do Núcleo Rural Taquara.

O trabalho não apresenta nenhum risco para a sua saúde, entretanto, há o desconforto nas coletas de sangue devido ao uso de agulhas. Possui como benefício a análise da sua saúde em relação à exposição aos agrotóxicos organofosforados, já que os resultados dos exames feitos serão entregues ao senhor. Se necessário, será feito aconselhamento médico.

Informamos que o nome e a identidade dos participantes destas análises serão mantidos em total sigilo. Nos dados que serão divulgados em artigos científicos, aparecerão apenas sua idade, grau de escolaridade e sexo. Todo material utilizado durante a pesquisa ficarão sob a responsabilidade da responsável pelo projeto, Juliana de Oliveira Pasiani, e ficará localizado no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Para maiores informações telefonar para a Farmacêutica Juliana Pasiani – Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília (0XX61 – 3307.3671/9159.2592).

Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo chame o Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da UnB no telefone (0XX61 – 3107.1947)

- Sua participação no estudo é voluntária. Você pode escolher não fazer parte do estudo, ou pode desistir a qualquer momento.

- Li e entendi esse termo de consentimento, todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sou voluntário a fazer parte nesse estudo.

Nome do voluntário:

Assinatura:

Data:

Nome do pesquisador responsável:

Assinatura

Data:

ANEXO D - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: 32/09

Título do Projeto: Avaliação de trabalhadores no cultivo de tomates no estado de Goiás – Goianópolis: percepção, comportamento de segurança e índices de exposição

Pesquisadora Responsável: Juliana de Oliveira Pasiani

Data de Entrada: 22/05/2009

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 32/09 com o título: “Avaliação de trabalhadores no cultivo de tomates no estado de Goiás – Goianópolis: percepção, comportamento de segurança e índices de exposição”, analisado na 5ª Reunião Ordinária, realizada no dia 09 de junho de 2009.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 26 de agosto de 2009.

Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB

ANEXO E – INCLUSÃO DA ÁREA DO NÚCLEO RURAL TAQUARA



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **32/09**

Título do Projeto: “Avaliação de trabalhadores no cultivo de hortaliças, verduras e legumes: percepção, comportamento de segurança e índices de exposição”.

Pesquisadora Responsável: Juliana de Oliveira Pasiani

Data de Entrada: 22/05/2009

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR emenda** ao projeto **32/09** com o título: “Avaliação de trabalhadores no cultivo de hortaliças, verduras e legumes: percepção, comportamento de segurança e índices de exposição”. analisado na 6ª Reunião Ordinária, realizada no dia 13 de julho de 2010, com as seguintes especificações:

- Mudança do nome do projeto Para “ Avaliação de trabalhadores no cultivo de hortaliças, verduras e legumes: percepção, comportamento de segurança e índices de exposição;
- A inclusão do Núcleo Rural Taquara no projeto;
- O aumento do numero de indivíduos que irão participar;

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 07 de outubro de 2010.


Prof. Natália Menezes de Sá
Coordenadora do CEP-FS/UnB