



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE –
NORTE**

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS

Mestrado em Ciências Forenses

**Avaliação do dano genético em trabalhadores expostos a
pesticidas através do estudo de aberrações
cromossómicas**

Marta Cunha



Marta Cunha

**Avaliação do dano genético em trabalhadores expostos a
pesticidas através do estudo de aberrações cromossómicas**

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Forenses pelo
Instituto Superior de Ciências da Saúde - Norte**

Trabalho de tese realizado sob a orientação de
Professor Doutor João Paulo Teixeira

**Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte
Departamento de Ciências**

2012

Agradecimentos

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e contributo de várias pessoas às quais gostaria de deixar a minha gratidão.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor João Paulo Teixeira, pela sugestão do tema, por ter aceite orientar esta tese, pela sua generosidade, exigência e espírito crítico sempre com o objectivo de promover a minha evolução ao longo da realização deste trabalho.

Um enorme obrigado à equipa pertencente ao Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, pela simpatia e ajuda na realização deste trabalho.

Agradeço também ao Departamento de Ciências do Instituto Superior Ciências da Saúde – Norte por ter promovido o ambiente necessário para a realização desta tese de mestrado e pela ajuda prestada quando necessário.

Deixo também uma nota de agradecimento às minhas colegas de Mestrado, Patrícia Rodrigues e Maria Bernardete David pelo companheirismo, incentivo e preciosa presença em tantos momentos.

Agradeço sobretudo à minha família e amigos por toda a paciência e apoio ao longo de mais uma jornada.

Resumo

Os pesticidas incluem uma grande variedade de substâncias activas muito diferentes na sua composição e nas suas propriedades, sendo estes compostos largamente utilizados na agricultura para protecção das culturas. A exposição a estes compostos tem vindo a ser associada a várias doenças, entre elas o cancro.

A monitorização biológica humana permite identificar e, até certo ponto, quantificar o risco de exposição a factores ambientais, sendo por isso, uma ferramenta de grande interesse na avaliação da exposição a carcinógenos.

As Aberrações Cromossómicas (AC) constituem um indicador precoce de risco de cancro uma vez que foi já estabelecida uma correlação positiva entre a frequência de AC e o aumento da incidência de determinados tipos de cancro.

Este trabalho incidiu sobre uma população exposta a pesticidas, constituída por 80 agricultores a trabalhar em explorações agrícolas do distrito do Porto. Para o grupo controlo foram seleccionados 84 indivíduos não expostos a pesticidas, da mesma área de residência, com idade, sexo, estilos de vida e hábitos tabágicos semelhantes aos do grupo exposto.

Na análise dos resultados foram consideradas variáveis como o género, idade, hábitos tabágicos, para além de outras relacionadas com a exposição ocupacional, entre elas, o tempo de exposição, local de trabalho e tarefas desempenhadas, utilização de equipamento protecção individual (EPI), tipo de composto químico utilizado, uso inadequado de pesticidas e a estação do ano em que estes são aplicados.

Da análise dos resultados verificou-se que o grupo exposto apresenta uma frequência de AC significativa mais elevada que o grupo controlo. No grupo exposto o valor médio de AC é de 1.56 ± 0.15 e no grupo controlo é de 0.86 ± 0.11 . Em relação ao uso de EPI os resultados demonstram que os indivíduos que não usam EPI apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) na frequência de AC tipo cromossoma (0.71 ± 0.19) quando comparado com os indivíduos que fazem uso de EPI. No entanto na

análise das restantes variáveis estudadas não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo exposto e o grupo controlo.

Abstract

Pesticides include a wide variety of active substances very different in composition and properties. These compounds are widely used in agriculture, to protect crops, and in public health to control diseases. Exposure to these compounds has been associated with various diseases, including cancer.

Biomonitoring is defined as the assessment of human exposure to an environmental chemical and constitutes a tool of major importance in the evaluation of exposure to carcinogens.

Chromosomal aberrations (CA) detection is one of the most ancient cytogenetic tests used in genetic toxicology and it was the first to be associated with increased cancer risk, being therefore considered a cancer predictor.

In this study, the effects of occupational exposure were analyzed in a population of 80 farm workers in the district of Porto. For the control group, 84 subjects with the same demographic characteristics were selected.

Different variables were considered for result analysis such as gender, age, smoking habits, as well as other related to occupational exposure, including exposure time, work and tasks performed, use of personal protective equipment (PPE), type of chemical used, inappropriate use of pesticides and the season in which they are applied.

Results showed that the exposed group present statistically significantly higher CA frequency ($p < 0.05$) than the control group. The exposed group presented 1.56 ± 0.15 and the control group 0.86 ± 0.11 .

Regarding the use of PPE, results showed that individuals who didn't used PPE presented a statistically significantly difference ($p < 0.05$) in frequency of CA chromosome-type (0.71 ± 0.19). However the analysis of the other variables studied did not exhibit statistically significant differences between the exposed group and control group.

The present study allow a better characterization of occupational exposition to pesticides in Portugal and can be used as a tool to establish security measures related to working habits in farms.

Índice

	Páginas
Agradecimentos	III
Resumo	IV
Abstract	VI
Lista de abreviaturas	IX
Índice de figuras	X
Índice de tabelas	XI
1. Introdução	1
1.1 Pesticidas	2
1.1.1 Classificação dos pesticidas	2
1.1.2 Vantagens e desvantagens do uso de pesticidas	5
1.2 A agricultura em Portugal	6
1.3 Contaminação ambiental	8
1.4 Exposição humana a pesticidas	11
1.4.1 Vias de exposição	11
1.4.2 Efeitos na saúde humana	13
1.5 Avaliação da exposição	16
1.5.1 Monitorização ambiental	16
1.5.2 Monitorização biológica	16
1.5.2.1 Biomarcadores	17
1.5.2.1.1 Biomarcadores de exposição	19
1.5.2.1.2 Biomarcadores de efeito	20
1.5.2.1.3 Biomarcadores de susceptibilidade	20
1.6 Aberrações cromossómicas	21
1.6.1 Formação de aberrações cromossómicas	21
1.6.2 Aberrações cromossómicas como biomarcador de efeito	24
1.6.3 Vantagens e desvantagens da técnica	24
1.6.4 Associação entre a frequência de aberrações cromossómicas e o cancro	24

1.6.5 Associação entre o uso de pesticidas e a frequência de aberrações cromossómicas	25
1.7 Objectivo	25
2. Metodologia	26
2.1 População estudada e recolha de amostra biológica	27
2.2 Análise citogenética: Aberrações Cromossómicas	27
2.2.1 Técnica analítica	27
2.2.2 Identificação de aberrações cromossómicas	28
2.3 Análise estatística	29
3. Resultados	30
3.1 Caracterização da população	31
3.2 Dano genético na população estudada	32
3.3 Influência de variáveis demográficas	32
3.3.1 Influência do género	32
3.3.2 Influência da idade	33
3.4 Influência de hábitos tabágicos	34
3.5 Influência dos hábitos de trabalho	35
3.5.1 Local de trabalho	35
3.5.2 Preparação e aplicação de pesticidas	36
3.5.3 Utilização de equipamento de protecção individual	37
3.6 Classe química do composto utilizado	38
3.6.1 Uso inadequado de pesticidas	39
3.7 Estação do ano	40
4. Discussão	41
5. Conclusão	49
Bibliografia	51
Anexos	I
Anexo I. Declaração de Consentimento	II
Anexo II. Questionário individual de saúde	III
Anexo III. Questionário Perfil Exposição/Risco	VI

Lista de abreviaturas

AC	Aberrações Cromossómicas
AChE	Acetilcolinesterase
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos da América)
EPI	Equipamentos de protecção individual
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (soro fetal bovino)
IEH	<i>Institute for Environment and Health</i> (Instituto para o Ambiente e Saúde, Reino Unido)
INE	Instituto Nacional de Estatística
MN	Micronúcleos
NK	<i>Natural killer cells</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
rpm	Rotações por minuto
SCE	<i>Sister Chromatid Exchange</i> (troca entre cromátides irmãs)

Índice de Figuras

Figura		Pág.
1.	Exemplos dos principais pesticidas de acordo com o grupo químico da substância activa e da espécie-alvo	3
2.	Distribuição de explorações agrícolas por localização geográfica em Portugal	6
3.	Venda de pesticidas em Portugal, por tipo de função – adaptado de INE (2009)	7
4.	Principais processos envolvidos na degradação ambiental dos pesticidas – adaptado de Fishel (1991)	9
5.	Grupos de população humana em risco – adaptado de Wong e Ng (1984)	13
6.	Monitorização ambiental e monitorização biológica com os diferentes tipos de biomarcadores utilizados – adaptado de Institute for Environment and Health (1996)	18
7.	Aberrações cromossómicas observadas em linfócitos em metafase...	23
8.	Distribuição das frequências de AC nos grupos controlo e exposto de acordo com o género	33
9.	Percentagem de trabalhadores agrícolas distribuídos pelos locais de trabalho – estufas, ar-livre e ambos os locais	36

Índice de Tabelas

Tabela		Pág.
1.	Características da população em estudo	31
2.	Valores médios de AC nos grupos controlo e exposto	32
3.	Valores médios de AC nos grupos controlo e exposto de acordo com o género	33
4.	Valores médios de AC nos grupos controlo e exposto de acordo com a idade	34
5.	Valores médios de AC nos grupos controlo e exposto de acordo com os hábitos tabágicos	35
6.	Valores médios de AC presentes na população exposta, segundo os locais de trabalho	35
7.	Valores médios de AC presentes na população exposta, de acordo com o envolvimento dos indivíduos na preparação de pesticidas	37
8.	Valores médios de AC presentes na população exposta, de acordo com o envolvimento dos indivíduos na aplicação de pesticidas	37
9.	Valores médios de AC presentes na população exposta, de acordo com o envolvimento dos indivíduos com a utilização de equipamento de protecção individual	38
10.	Valores médios de AC presentes na população exposta, de acordo com o tipo de pesticidas utilizados	39
11.	Valores médios de AC presentes na população exposta, de acordo com o uso inadequado de pesticidas	40
12.	Valores médios de AC presentes na população exposta, de acordo com a estação do ano	40

1. Introdução

1.1 Pesticidas

Os pesticidas, também conhecidos como produtos fitofarmacêuticos, são compostos químicos de origem natural ou sintética, que podem ser constituídos por uma substância ou um conjunto de substâncias, que têm como função prevenir, repelir ou mitigar pragas.

Segundo a Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA), pode definir-se como pesticida qualquer substância ou mistura de substâncias aplicada com função de regular o crescimento vegetal, provocar desfoliação, dessecação e controlar o aparecimento de pragas.

Os pesticidas formam o maior grupo de substâncias venenosas introduzidas intencionalmente no meio ambiente (Sailaja *et al.*, 2006). Estes produtos têm diversas utilidades, tais como, controlo de insectos indesejáveis em habitações, em termos de saúde pública para controlar vectores de doenças, mas é principalmente na agricultura que são utilizados com o objectivo de proteger as culturas de pragas que as possam danificar.

A maioria dos pesticidas utilizados tem mecanismos de toxicidade não-específicos, podendo provocar danos em organismos biológicos similares à espécie-alvo. Desta forma tem sido reportada a ocorrência de efeitos tóxicos em espécies não consideradas como pragas, mas como pertencentes ao mesmo ecossistema.

1.1.1 Classificação dos pesticidas

A classificação dos pesticidas pode ser feita de acordo com as propriedades químicas da substância activa ou através da espécie-alvo. Na figura 1 apontam-se alguns exemplos de pesticidas existentes no mercado, de acordo com as duas formas de classificação referidas.

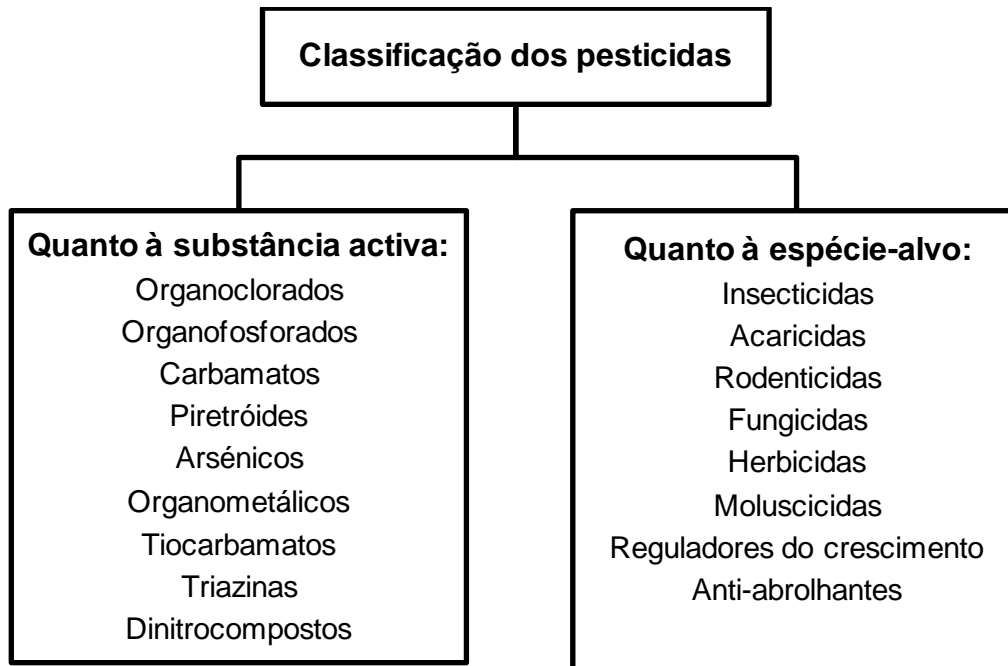


Figura 1 – Exemplos dos principais pesticidas de acordo com o grupo químico da substância activa e da espécie alvo.

De acordo com a EPA os pesticidas mais utilizados são os organoclorados, os organofosforados, os carbamatos e os piretróides.

De seguida apresenta-se um resumo sobre estes grupos de pesticidas, dando evidência às suas propriedades físico-químicas e às espécie-alvo.

- *Organoclorados*

Estes pesticidas apresentam na sua estrutura um hidrocarboneto cíclico (Purdue *et al.*, 2007), e um número variável de átomos de cloro ou de flúor. São compostos que apresentam uma baixa volatilidade, elevada estabilidade química e carácter lipofílico. Apresentam também uma baixa taxa de biodegradação, que lhes confere uma grande persistência no solo. Devido ao seu carácter lipofílico tendem a acumular-se nos tecidos, sendo causa de bioacumulação nos seres vivos (Cruz *et al.*, 2003). São maioritariamente utilizados na eliminação de artrópodes, mas dada a sua falta de especificidade podem afectar outros organismos vivos. A exposição do Homem a este tipo de

pesticidas pode provocar sintomas agudos, como cefaleias, vertigens, náuseas, tremores e convulsões ou efeitos a longo prazo, que afectam o sistema nervoso central e periférico, podendo provocar também alterações do sistema reprodutor e em alguns órgãos como, por exemplo, o fígado. Um dos pesticidas organoclorados mais utilizado foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT).

- *Organofosforados*

Os pesticidas organofosforados têm vindo a substituir os organoclorados, que devido à sua maior especificidade apresentam um risco menor para o ambiente. São utilizados principalmente como insecticidas e reguladores do crescimento vegetal. Embora sejam mais selectivos, apresentam uma toxicidade mais elevada para os seres humanos (Steenland *et al.*, 1994). Esta toxicidade manifesta-se, principalmente, ao nível do sistema nervoso central, pela inibição irreversível da acetilcolinesterase (AChE), provocando a acumulação de acetilcolina nas sinapses nervosas, e originando sintomas como dores de cabeça, fraqueza muscular, náuseas e fadiga, entre outros (Nouira *et al.*, 1994).

- *Carbamatos*

Os carbamatos são ésteres de ácido carbâmico que são usados principalmente como herbicidas, insecticidas, fungicidas e nematocidas. Apresentam um mecanismo de toxicidade similar ao dos organofosforados, através da inibição de AChE, mas que neste caso é reversível (Abdullat *et al.*, 2006).

Os principais efeitos provocados nos seres humanos por intoxicação aguda são similares aos descritos para os organofosforados, ou seja, a acumulação da acetilcolina nas sinapses nervosas, no entanto a sua intensidade e duração são mais curtas (Cecchine *et al.*, 2000).

- *Piretróides*

São compostos sintéticos derivados das piretrinas, usados principalmente como insecticidas. A exposição a estes pesticidas provoca essencialmente toxicidade aguda, por acção na abertura dos canais de sódio da membrana celular (Burr & Ray, 2004), retardando a sua repolarização, podendo provocar paralisia nervosa. Os principais efeitos provocados são a hipersensibilidade ou a irritação directa devido ao contacto com o composto.

1.1.2 Vantagens e desvantagens do uso de pesticidas

Os pesticidas têm diversos efeitos que tanto podem ser benéficos, pois ajudam a mitigar pragas para as culturas, como podem ser também prejudiciais ao nível da saúde humana.

De acordo com Cooper e Hans (2007) os benefícios do uso de pesticidas podem ser divididos em primários e em secundários. Os benefícios primários são consequência directa da utilização dos mesmos. Podemos definir como benefícios primários o controlo de pestes e vectores de doenças de plantas, o controlo de vectores de doenças em humanos e em animais e controlo de organismos que possam causar dano, assim como prevenir ou controlar organismos que prejudicam outras actividades humanas.

Os benefícios secundários não são visíveis de imediato, nem intuitivamente óbvios, sendo por vezes difícil estabelecer uma relação causa-efeito. Podemos referir como benefícios secundários, ao nível da comunidade, a qualidade e segurança alimentar, o aumento da qualidade de vida, entre outras; ao nível nacional, na economia agrícola nacional, na redução da perda de solo por erosão/mistura, entre outras; e, ao nível mundial, assegurando o fornecimento seguro de uma variedade de alimentos, conservação da biodiversidade, aumento das áreas habitáveis, entre outras.

As desvantagens do uso de pesticidas estão relacionadas com a saúde humana e com os diversos tipos de exposição (Sailaja *et al.*, 2006), que podem pôr em risco a vida. Estes efeitos podem ser efeitos agudos ou crónicos. Além

dos efeitos provocados na saúde do homem, podem também interferir no meio ambiente através da contaminação dos solos e lençóis freáticos.

1.2 A agricultura em Portugal

Portugal é um país com uma ligação histórica à agricultura. Apesar deste sector apresentar menor impacto na economia nacional, Portugal é dos países em que a agricultura tem uma grande importância, quando comparado com os restantes países da Europa (Rose *et al.*, 2003). Segundo dados do Instituto Nacional de estatística (INE), a actividade agrícola varia entre as diferentes regiões do país (INE, 2009). Através da análise da figura 2 verifica-se um maior número de explorações agrícolas na região norte do país evidenciando-se as regiões de Trás-os-Montes, Entre Douro e Minho e Beira Litoral.

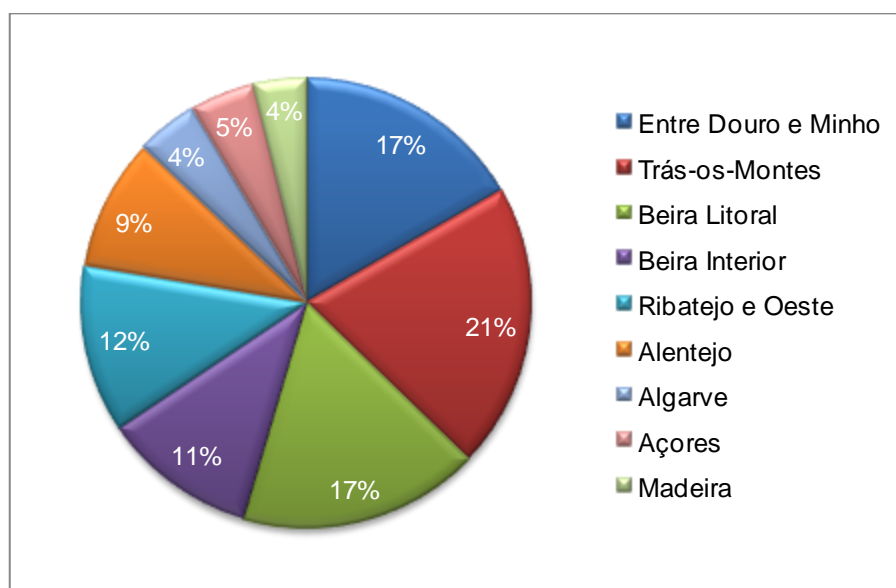


Figura 2 – Distribuição de explorações agrícolas por localização geográfica em Portugal.

Devido à necessidade crescente de cultivo de produtos alimentares tem vindo a ser necessária a aplicação de produtos que protejam as culturas de agentes que as possam danificar. A venda de pesticidas em Portugal tem vindo a aumentar ao longo dos anos; na figura 3 podemos observar que o volume

das vendas no ano de 2007 quando comparado com o ano de 2006, aumentou cerca de 6%.

Em 2007 os fungicidas representavam 69% do total de vendas de pesticidas com cerca de 11500 toneladas, seguido dos herbicidas com cerca de 12,7% correspondendo a cerca de 2100 toneladas. Por último os insecticidas representavam 7,6%, cerca de 1300 toneladas (INE, 2009).

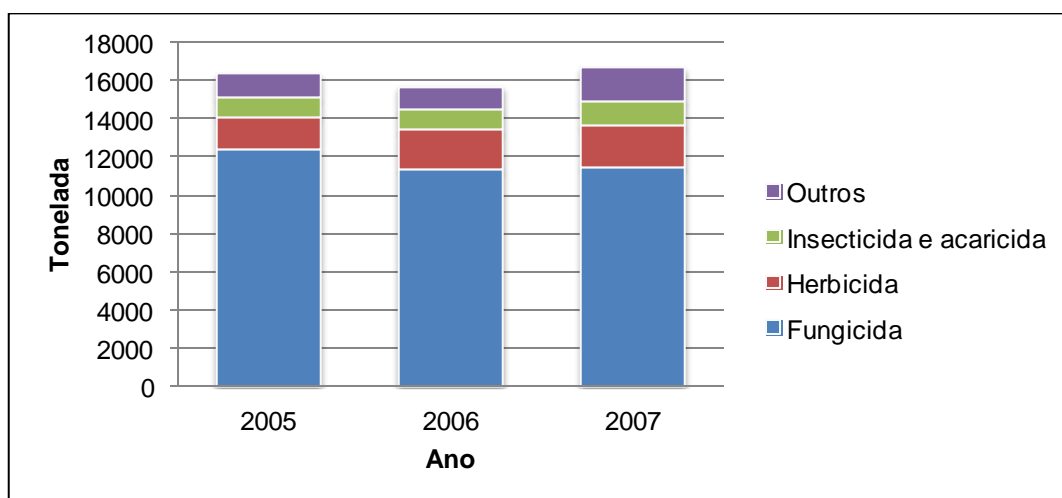


Figura 3 – Venda de pesticidas em Portugal, por tipo de função – adaptado de INE (2009).

De acordo com o Relatório Estatístico da Agricultura de 2009 do EUROSTAT (Marquer *et al.*, 2009), Portugal gastava em média 75€/hectare em produtos fitofarmacêuticos (pesticidas e fertilizantes).

Devido aos efeitos que os pesticidas podem provocar na saúde humana, foi criada ao nível europeu a Directiva 91/414/CEE¹, que regula a colocação de produtos fitofarmacêuticos no mercado. Esta foi transposta para o direito nacional pelo Decreto Lei n.º 284/94, e pela Portaria n.º 563/95, que entrou em vigor, em Portugal, a 25 de Julho de 1993.

O INE disponibilizou em 2009 os indicadores agro-ambientais com informação relativa aos anos entre 1989-2007. Estes indicadores pretendem identificar, qualificar, quantificar e avaliar tendências das interacções mais

¹ Directiva 91/414/CEE do Conselho, de 15 de Julho de 1991, relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Jornal Oficial n.º L230 de 19/08/1991 pp.1-32.

significativas entre a agricultura e o meio ambiente (INE, 2009). Analisando esses indicadores - os *níveis de formação dos produtores agrícolas*, a *superfície de produção biológica* e a *redução dos apoios de Estado às medidas agro-ambientais* - Portugal posiciona-se abaixo da média Europeia em termos de capacidade de resposta no combate a práticas agrícolas mais poluidoras e a sistemas de poluição. Por outro lado, neste estudo são ainda referidos indicadores positivos que colocam Portugal, no cômputo da UE15, como o Estado Membro com menor risco de poluição. Assim, os indicadores *balanço do azoto*, *emissão de gases com efeitos de estufa* e *emissões de amoníaco* indicam que em Portugal a pressão exercida pela actividade agrícola no ambiente é das mais baixas (INE, 2009).

Em suma, Portugal pratica uma agricultura com efeitos reduzidos para o ambiente mas ao mesmo tempo o cenário sociopolítico português não permite, ainda, uma mudança para hábitos ambientalmente mais sustentáveis.

1.3 Contaminação ambiental

Os pesticidas são considerados um dos principais contaminantes ambientais, não só pela elevada frequência da sua utilização, como também, pelas suas características tóxicas.

A quantidade de pesticida que atinge a espécie-alvo é normalmente reduzida (Pimentel, 1995), logo, grande parte do produto difunde-se no meio ambiente, provocando a contaminação de águas subterrâneas e superficiais, solos e ar.

Solos

Os solos são um dos meios mais propensos à poluição por pesticidas. Uma vez introduzidos no meio ambiente os pesticidas podem sofrer diversos processos (Fishel, 1991) que podem levar à sua eliminação, tais como, adsorção e ligação a compostos minerais e orgânicos presentes no solo, absorção pelas raízes das plantas, degradação microbiana, lixiviação, fotodegradação e volatilização.

A figura 4 retrata os processos referidos, resumindo estes processos em três grupos que podem ser **adsorção**, **transferência** e **degradação** (Fishel, 1991).

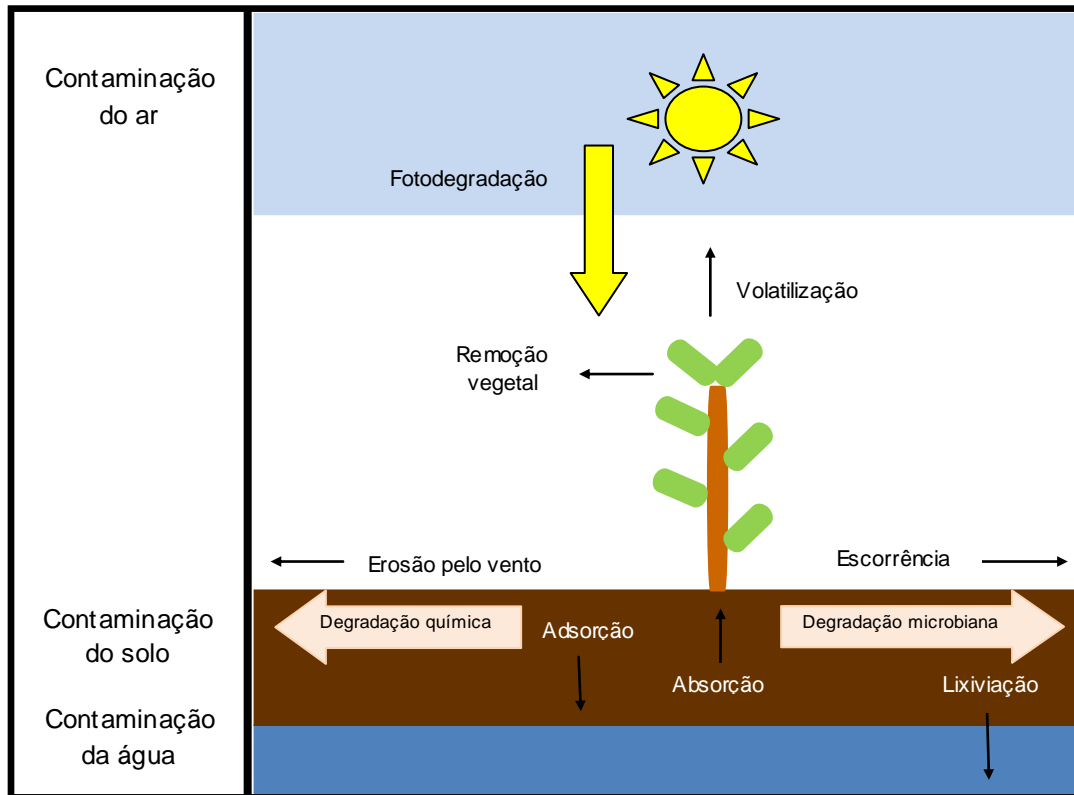


Figura 4 – Principais processos envolvidos na degradação ambiental dos pesticidas [adaptado de Fishel (1991)].

O processo de **adsorção** consiste na ligação do pesticida às partículas do solo. O tipo de solo pode influenciar a adsorção do pesticida; por exemplo, os solos com mais matéria orgânica ou argila adsorvem melhor que os solos arenosos. O mesmo é observado em solos com maior quantidade de água, pois esta vai competir com o pesticida aplicado na ligação às partículas do solo (Fishel, 1991).

As características físico-químicas do pesticida também vão influenciar na sua adsorção ao solo. A adsorção leva à redução da eficácia dos pesticidas no controlo da peste, isto porque, quanto mais for adsorvido menor a sua actuação pois não chega a atingir a espécie-alvo (Fishel, 1991).

Outro problema da adsorção é o dano provocado em certas culturas que possam ser mais sensíveis a determinado pesticida, isto é, depois deste se ligar às partículas do solo vai sendo libertado e a quantidade libertada pode ser prejudicial às culturas (particularmente em sistemas de rotação de culturas) (Fishel, 1991).

O processo de **transferência** dos pesticidas é essencial para o controlo de determinadas pragas, pois a sua distribuição no solo ocorre através de processos como lixiviação, escorrência, volatilização e absorção permitindo desta forma eliminar sementes germinativas de plantas indesejáveis. Por outro lado esta distribuição no solo pode de certa forma diminuir a acção dos pesticidas na espécie-alvo, reduzindo o seu efeito, levar à contaminação de águas superficiais e subterrâneas e desta forma atingir outras espécies, nomeadamente, o ser humano (Fishel, 1991).

O processo de volatilização consiste na passagem de um sólido ou líquido ao estado gasoso. Este processo pode provocar uma redução da eficácia do pesticida pois a quantidade de pesticida que permanece no local-alvo é menor e simultaneamente os vapores do pesticida podem deslocar-se e assim afectarem outras espécies que não as espécies-alvo (Fishel, 1991).

O processo de **degradação** geralmente é considerado benéfico pois vai degradar o pesticida no meio ambiente, tornando-o menos tóxico. Este processo poderá ser prejudicial se o pesticida for degradado antes de actuar sobre a espécie-alvo para a qual foi aplicado. A degradação pode ocorrer de diversas formas: degradação microbiana, degradação química e fotodegradação (Fishel, 1991).

A degradação microbiana é influenciada por vários factores: mistura de compostos do solo, pH, temperatura, arejamento do solo e a quantidade de matéria orgânica. A degradação química depende de factores como temperatura, mistura de compostos do solo, pH e adsorção. A reacção mais comum é a hidrólise, na qual o pesticida reage com a água, resultando na sua degradação. Após a sua aplicação em culturas, os pesticidas podem ser

sujeitos à exposição da luz solar e desta forma sofrer fotodegradação (Fishel, 1991).

↳ *Água*

A contaminação das águas superficiais ocorre fundamentalmente devido ao arrastamento dos pesticidas existentes no solo.

A contaminação dos lençóis freáticos deve-se à constante movimentação das águas superficiais, que com a sua infiltração nos solos tem como possível destino os aquíferos, transportando os pesticidas e contaminando-os (Costa, 2008). Estes reservatórios (aquíferos) abastecem rios e poços, que são usados pelo Homem como fonte de água potável, tornando-se assim um problema de saúde pública pois pode afectar a saúde humana.

1.4 Exposição humana a pesticidas

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que por ano ocorram 3 milhões de casos de envenenamento por pesticidas por todo o mundo, dos quais 220 000 são fatais (World Health Organization & UNEP, 1990).

Os efeitos da exposição humana a pesticidas dependem da via de exposição. As principais vias de exposição são a ingestão oral (voluntária ou involuntária), inalação e contacto.

1.4.1 Vias de exposição

A exposição pode variar de acordo com a via, a frequência e duração, a composição química do pesticida e a sua concentração.

Os agricultores devido à exposição ocupacional a pesticidas poderão ser considerados um grupo de risco. A exposição neste sector de actividade pode ser aguda ou crónica (Fleming *et al.*, 1999).

A via de exposição mais comum na população em geral é a ingestão de alimentos contaminados; na população exposta ocupacionalmente (maioritariamente os agricultores) o contacto directo com o pesticida durante a sua preparação, aplicação e no manuseamento das culturas nas quais é aplicado, e a inalação, são as principais vias de exposição.

O ser humano está também sujeito a exposição ambiental a pesticidas uma vez que podem existir no ar ambiente, água e nos solos, devido ao seu uso doméstico (Costa, 2008).

A frequência de exposição está relacionada com o intervalo em que ocorre a aplicação dos pesticidas, enquanto a duração poderá ser aguda ou crónica. Os efeitos resultantes da exposição aguda variam de acordo com a composição química dos pesticidas e da sua concentração.

A população em geral poderá estar sujeita a uma exposição crónica, isto é, a pequenas quantidades de pesticidas durante longos períodos de tempo, podendo ocorrer acumulação do químico no organismo e provocar efeitos tóxicos. No entanto, os indivíduos expostos ocupacionalmente estão sujeitos a uma exposição crónica de concentrações moderadas/elevadas de pesticidas e durante longos períodos de tempo.

A figura 5 apresenta um esquema que relaciona os diferentes grupos da população humana em risco e as características da exposição associadas.

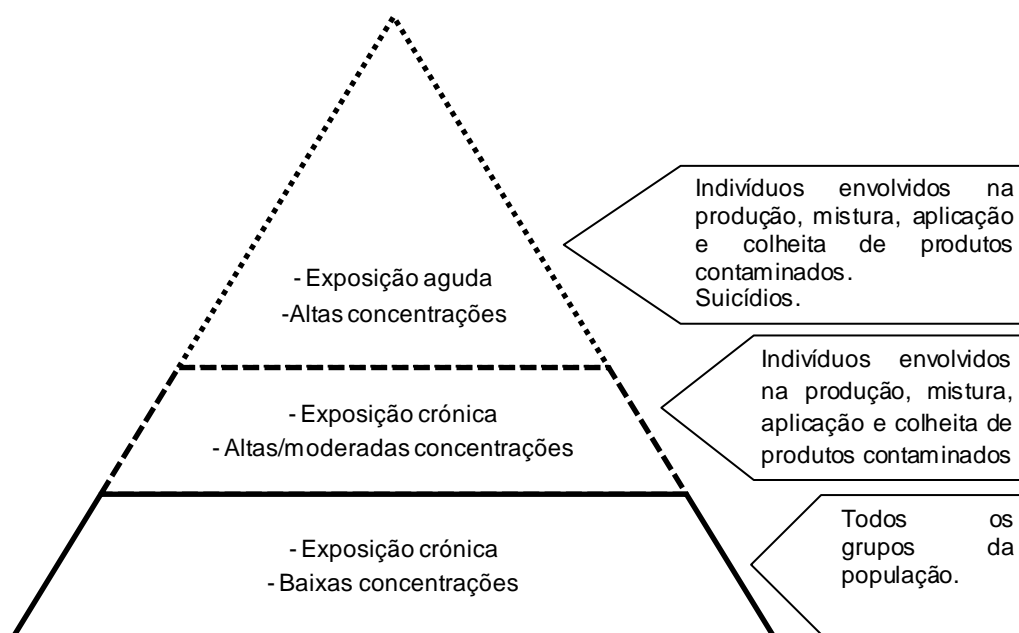


Figura 5 – Grupos de população humana em risco – adaptado de Wong e Ng (1984)

1.4.2 Efeitos na saúde humana

A exposição a pesticidas tem sido associada a efeitos negativos na saúde humana, podendo estes manifestar-se em diferentes sistemas ou órgãos. Alguns dos efeitos agudos associados à exposição a pesticidas são os efeitos dermatológicos devido ao contacto directo com os pesticidas (Sanborn *et al.*, 2004) decorrentes da exposição a elevadas concentrações destes compostos.

A exposição crónica a baixas/médias concentrações de pesticidas pode ter efeitos dermatológicos, genotóxicos, carcinogénicos (tumores sólidos, linfomas, leucemia, entre outros), respiratórios, reprodutivos, neurológicos e imunológicos (Sanborn *et al.*, 2004).

Os efeitos **dermatológicos** são os mais frequentemente associados à exposição ocupacional a pesticidas, isto porque a pele é o órgão que sofre maior exposição durante o uso destes produtos químicos. Os efeitos relatados em diversos estudos são as dermatites alérgicas e irritantes, assim como as queimaduras químicas (Sanborn *et al.*, 2007). Devido à variedade de produtos

químicos utilizados pelos trabalhadores torna-se difícil a associação de um pesticida a determinado efeito dermatológico. Outro factor que pode influenciar o aparecimento destes efeitos resulta da não utilização de roupa apropriada e a não observação das boas práticas de higiene (Blanco *et al.*, 2005).

Entende-se por efeito **genotóxico**, a capacidade que determinados compostos químicos têm de causar dano genético intracelular, sendo relatados por diversos autores (Costa *et al.*, 2006; Ergene *et al.*, 2007; Jors *et al.*, 2007); podendo afectar vários sistemas biológicos. A ocorrência de dano genotóxico pode dar origem ao aparecimento de neoplasias.

Em relação aos efeitos **carcinogénicos**, os pesticidas podem provocar dano genético intracelular e desta forma, havendo acumulação de danos, estes podem promover a formação de vários tipos de neoplasias (Blair & Zahm, 1995), nomeadamente linfoma Non-Hodgkin (Chiu & Blair, 2009), cancro da bexiga (Viel & Challier, 1995), leucemia, mielomas, cancro da pele (Blair & Zahm, 1995), cancro na mama (Teitelbaum *et al.*, 2007), cancro pancreático (Ji *et al.*, 2001) e cancro do pulmão (Alavanja *et al.*, 2004).

Quanto aos efeitos **respiratórios**, alguns estudos apontam que um dos principais efeitos provocados pela exposição crónica a pesticidas é o aumento do risco de aparecimento de rinite (Slager *et al.*, 2009). Os carbamatos, organoclorados e organofosforados são três grupos químicos que estão associados ao aumento de sensibilização dos indivíduos, podendo originar o aparecimento de asma atópica, outro dos efeitos respiratórios reportado na literatura (Hoppin *et al.*, 2008).

Entre os efeitos **reprodutivos** estão descritas alterações na formação do aparelho reprodutor dos fetos do sexo masculino, devido à exposição ocupacional da mãe durante a gravidez (Andersen *et al.*, 2008) e na fertilidade masculina na idade adulta (Fowler *et al.*, 2007; Clementi *et al.*, 2008; Perry, 2008). A exposição a pesticidas está também associada ao aumento do risco

de parto prematuro (Pathak *et al.*, 2009), baixo peso à nascença, alterações no desenvolvimento fetal (Garry *et al.*, 2002; Sanborn *et al.*, 2007) bem como o aumento de abortos espontâneos (Arbuckle *et al.*, 2001).

Em relação aos efeitos **neurológicos** e **mentais**, alguns estudos revelam que a exposição crónica pode dar origem ou acelerar a Doença de Parkinson (Dick, 2006; Hatcher *et al.*, 2008), assim como aumentar o risco de demência (Baldi *et al.*, 2011). Outros estudos apontam que a exposição ao pesticida dieldrina pode provocar danos neurotóxicos (Song *et al.*, 2010). A exposição a pesticidas poderá também provocar alteração de funções cognitivas, dificuldade de concentração, suicídios e depressões (Beseler & Stallones, 2008).

Os efeitos **imunológicos** são relatados em alguns estudos nos quais a exposição a pesticidas pode provocar a inibição ou alteração da funcionalidade de células do sistema imunológico (Colosio *et al.*, 1999; Corsini *et al.*, 2008; Steerenberg *et al.*, 2008). Estudos realizados demonstram que na presença de determinados pesticidas organoclorados é observada a inibição de células NK (*natural killer*), diminuindo desta forma a sua capacidade de eliminar células tumorais (Beach & Whalen, 2006). Os organofosforados podem também provocar dano nas células NK através da indução da sua apoptose precoce, inibindo assim a sua função como células imunológicas (Li *et al.*, 2007).

Alguns estudos referem ainda que, a exposição a pesticidas pode provocar aumento do risco de enfarte no miocárdio em indivíduos expostos ocupacionalmente (Mills *et al.*, 2009); aumento do risco de degeneração da retina para indivíduos expostos a alguns fungicidas (Kirrane *et al.*, 2005); aumento do risco de incidência de diabetes em indivíduos expostos a pesticidas do grupo dos organoclorados e organofosforados (Montgomery *et al.*, 2008).

1.5 Avaliação da exposição

Com a exposição constante a compostos tóxicos passíveis de provocar dano na saúde humana, é necessária uma avaliação do risco a que determinado grupo da população poderá estar exposta. Esta avaliação poderá ser feita recorrendo à monitorização ambiental e biológica que em conjunto permitem a determinação de potenciais riscos, sendo desta forma possível compreender o binómio dose-efeito (Costa, 2008).

1.5.1 Monitorização ambiental

A monitorização ambiental tem como objectivo a identificação e quantificação do agente químico no meio ambiente, avaliando o risco para a saúde, por comparação com os valores de referência estabelecidos (Prista & Uva, 2006). Esta análise permite determinar a dose externa do xenobiótico e é feita através da sua identificação e quantificação em amostras de ar, água, solo ou alimentos (Costa, 2008).

No entanto, este tipo de estudo não tem em conta as características demográficas da população como sexo, idade, hábitos alimentares, tabágicos, estado de saúde e exposição a outros agentes genotóxicos, nem tão pouco a variabilidade genética inerente aos indivíduos que poderão condicionar os efeitos do tóxico.

A monitorização ambiental é especialmente necessária para identificar fontes de exposição e facilitar as medidas a tomar para a redução de emissões (Angerer *et al.*, 2007).

1.5.2 Monitorização Biológica

A monitorização biológica incide sobre o indivíduo exposto, uma vez que consiste na quantificação e avaliação do xenobiótico, dos seus metabolitos ou outros parâmetros resultantes da sua interacção com o organismo, medidos em meios biológicos, como sangue, urina e ar exalado (Amorim, 2003), com vista à

determinação da exposição e do risco para a saúde, por comparação com referências apropriadas (Aitio & Kallio, 1999). A monitorização biológica visa, portanto, avaliar o risco resultante da exposição, não pela presença do xenobiótico no meio ambiente, mas em função da quantidade que efectivamente penetrou no organismo (Prista & Uva, 2003).

Conclui-se assim que a monitorização ambiental e biológica fornecem informações diferentes mas complementares sobre os riscos resultantes da interacção entre o agente químico presente no ambiente ocupacional e os trabalhadores a ele expostos, sendo fundamental que não sejam tomadas como acções alternativas, mas os seus resultados sejam antes interpretados e dimensionados no seu exacto significado e, baseados na sua complementaridade (Prista & Uva, 2006).

1.5.2.1 Biomarcadores

Biomarcador é qualquer substância, processo e/ou produto, possível de ser doseado no organismo humano e que pode ser considerado preditivo de doença (Farmer *et al.*, 2006).

Os biomarcadores são uma ferramenta importante na avaliação dos índices de exposição e no estabelecimento de limites para a mesma, uma vez que são intermediários entre a exposição e a manifestação clínica da doença. A detecção de um biomarcador não indica obrigatoriamente a presença de uma doença ou de um processo tóxico, na maioria das situações apenas indica a exposição do organismo a uma substância, constituindo informação complementar aos programas de vigilância da saúde (Amorim, 2003).

De forma a obter-se informações mais completas relativas à exposição a um determinado composto, devem usar-se combinações de diversos biomarcadores, aplicando-se a diversos tecidos ou meios biológicos.

As células mais utilizadas em estudos de biomonitorização biológica são os linfócitos devido à fácil colheita e isolamento, ao elevado número presente

no sangue, ao seu tempo de vida de aproximadamente 1600 dias e devido à sua elevada resistência mesmo após a exposição a compostos citotóxicos (Ramalho *et al.*, 1995).

Os biomarcadores podem ser de três tipos: biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade. Dependendo do biomarcador utilizado poderá ser possível avaliar a exposição, os efeitos provocados por determinados compostos ou susceptibilidade individual.

Através do esquema da figura 6 é possível verificar que os diferentes biomarcadores se complementam de forma a poder obter toda a informação necessária para a determinação do risco/exposição.

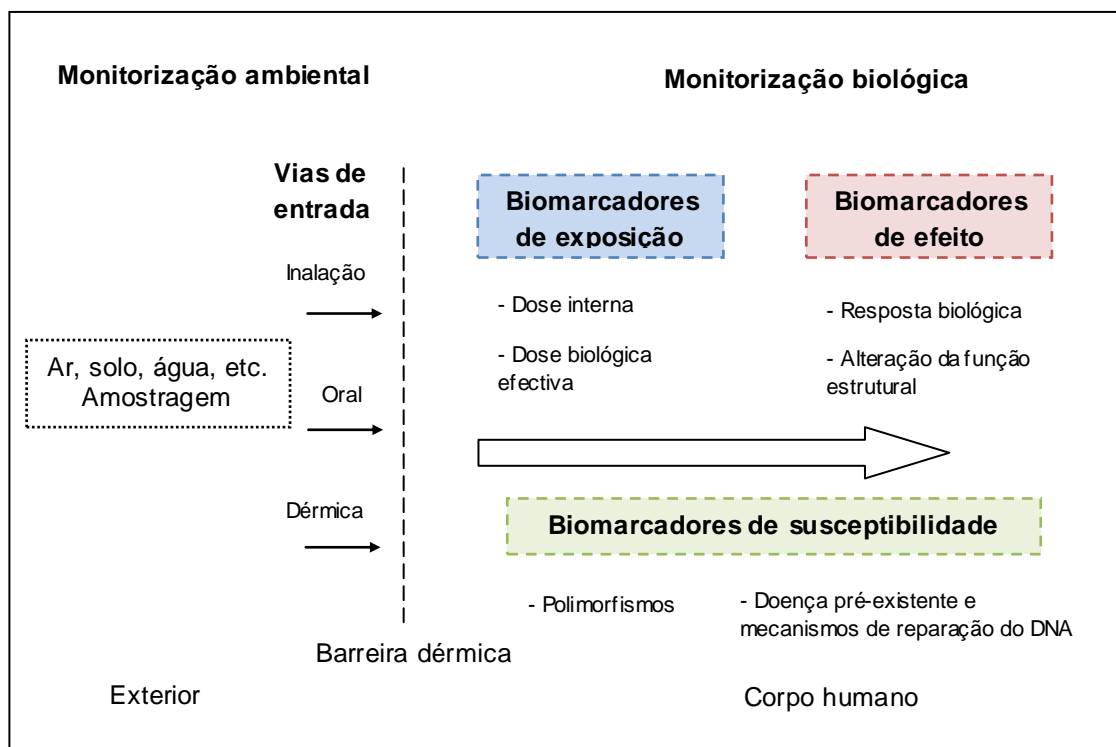


Figura 6 – Monitorização ambiental e monitorização biológica – adaptado de Institute for Environment and Health (1996).

As monitorizações ambiental e biológica apesar de fornecerem informações distintas são métodos de avaliação que se complementam, ou seja, permitem a associação entre a dose externa de um composto e a dose

interna presente no organismo. No entanto a monitorização biológica apresenta vantagens relativamente à monitorização ambiental, isto porque os indicadores biológicos reflectem a totalidade da exposição (Prista & Uva, 2006).

1.5.2.1.1 Biomarcadores de exposição

Os biomarcadores de exposição são usados para avaliar e confirmar a exposição de uma população a um determinado composto, estabelecendo uma relação entre a exposição externa e a sua dose interna (Prista & Uva, 2006). Estes biomarcadores podem ser divididos em biomarcadores de dose interna e biomarcadores de dose biológica efectiva.

- *Biomarcadores de dose interna*

Os biomarcadores de dose interna representam a quantidade de composto que penetrou no organismo e que foi realmente absorvida pelo mesmo (Prista & Uva, 2006).

Estes biomarcadores permitem determinar que ocorreu de facto uma exposição, através do doseamento do composto e/ou dos seus metabolitos em fluidos biológicos. Apesar de se determinar que ocorreu exposição, esta não é indicativa de que ocorra obrigatoriamente doença associada à exposição a determinado composto.

- *Biomarcadores de dose biológica efectiva*

Os biomarcadores de dose biológica efectiva permitem obter informação sobre a extensão da exposição ao composto em locais-alvo, tais como, tecidos, células, organelos e macromoléculas (ADN e proteínas). Exemplos deste tipo de biomarcadores são os aductos de ADN e de proteínas (albumina e hemoglobina) (Amorim, 2003).

Os aductos de ADN são indicadores de um efeito biológico precoce que surgem da ligação covalente de um metabolito extremamente reactivo (electrofílico) com as bases nucleofílicas do ADN. Se não reparado poderá dar origem a um processo de carcinogénese (Delft *et al.*, 1998; Amorim, 2003).

1.5.2.1.2 Biomarcadores de efeito

Os biomarcadores de efeito são indicadores de alterações bioquímicas, fisiológicas, comportamentais ou de outra natureza (Prista & Uva, 2006), resultantes da interacção entre o organismo e o composto capaz de causar dano. Em resultado da interacção química podem ocorrer modificações precoces que precedem danos estruturais a variados níveis, nomeadamente, a nível molecular, celular e tecidual (Prista & Uva, 2006). Estes danos podem ser reversíveis, mas podem ser também preditivos de respostas tardias, resultando em doença clínica. Estes biomarcadores não são específicos, pois não é possível associar o efeito directamente com o composto tóxico que lhe possa ter dado origem.

Os biomarcadores de efeito focam-se principalmente na análise citogenética, nomeadamente no estudo de aberrações cromossómicas (AC), formação de micronúcleos (MN) e troca de cromátides irmãs (SCE). A análise citogenética é realizada em sangue periférico, através de culturas de linfócitos, nos quais é possível verificar a existência de dano genético provocado por exposição a determinado composto genotóxico (Albertini *et al.*, 2000).

1.5.2.1.3 Biomarcadores de susceptibilidade

Os biomarcadores de susceptibilidade podem reflectir factores genéticos ou adquiridos que influenciam a resposta do organismo a uma

determinada exposição química. Estes são factores pré-existentes e independentes da exposição.

A susceptibilidade refere-se à forma como as variações genéticas influenciam, aumentando ou diminuindo, a susceptibilidade individual a factores ambientais nocivos, como é o caso de alguns compostos químicos, radiação ou estilos de vida (Amorim, 2003).

Estes biomarcadores são indicadores da capacidade inerente ou adquirida que um organismo possui para responder ao estímulo provocado pela exposição a um composto tóxico. Destacam diferenças individuais e/ou populacionais pré-existentes e independentes da exposição. Estas diferenças são geralmente de origem genética, apesar da ocorrência de alterações fisiológicas, a existência de medicação e a exposição a outros compostos tóxicos ambientais possam influenciar a susceptibilidade individual a determinado agente externo (IEH, 1996).

Um exemplo muito comum da interacção entre factores ambientais e variações genéticas são as doenças multifactoriais que incluem patologias como a diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares e cancro. Estas doenças não dependem somente da acção de um único gene, mas resultam da acção combinada de componentes exógenos – ambientais (fumo de tabaco, cancerígenos químicos e comportamento reprodutor e sexual), e endógenos – genéticos, hormonais e imunológicos (Rueff *et al.*, 2002).

1.6 Aberrações Cromossómicas

1.6.1 Formação de Aberrações cromossómicas

A detecção de aberrações cromossómicas é um dos testes citogenéticos mais antigos usados em toxicologia genética. Esta técnica é usada desde 1960 e avalia as alterações nos cromossomas, podendo estas ser de ordem estrutural ou numérica. Estas alterações podem ocorrer espontaneamente ou ser provocadas pela exposição a agentes genotóxicos (Farmer *et al.*, 2006).

As aberrações cromossômicas estruturais podem resultar de diversos mecanismos, no entanto os mecanismos mais frequentes na origem das AC são o dano directo no ADN, replicação de um modelo de ADN danificado ou inibição da síntese do ADN (Albertini *et al.*, 2000).

O dano nos cromossomas pode ocorrer em qualquer fase do ciclo celular – G₁, S, G₂ e mitose, podendo ocorrer também durante a meiose. A fase do ciclo celular em que ocorre o dano faz variar o tipo de dano observado, podendo este ocorrer ao nível do cromossoma afectando o mesmo *locus* em ambas as cromátides ou afectando apenas uma das cromátides (Albertini *et al.*, 2000). Se o dano ocorrer durante a fase G₁ na qual ainda não houve replicação, este dano vai perpetuar-se na fase S afectando desta forma o cromossoma. Mas se o dano ocorrer na fase G₂ este pode afectar apenas uma das cromátides (Therman, 1980).

Podem distinguir-se vários tipos de danos cromossômicos estruturais: deleções terminais, inversões, trocas simétricas, rearranjos assimétricos (anéis acêntricos ou com centrómero) e trocas assimétricas (dicêntricos, figuras tri- e tetra-radiais) (Therman, 1980).

Quando ocorrem duas quebras no mesmo cromossoma, estas podem dar origem à formação de um anel cêntrico e um fragmento acêntrico, ou dar origem a um cromossoma com uma deleção intersticial. Isto ocorre quando as extremidades não se unem novamente ao cromossoma, podendo originar um fragmento acêntrico. Estes fragmentos, quando são de tamanho reduzido, denominam-se minutos (Therman, 1980). Os “gaps” resultam de locais de fragilidade, presentes em determinadas regiões dos cromossomas, regiões nas quais parece não existir coloração (Therman, 1980).

Outra das possíveis consequências da quebra de cromátides resulta da troca de cromátides entre dois cromossomas formando-se um cromossoma dicêntrico e um fragmento acêntrico ou então dar origem à formação de uma forma tetrarradial. Estas podem ser de dois tipos, dependendo da posição em

que se encontram os centrômeros dos dois cromossomas, podendo estar em sítios opostos (alternados) ou ao lado um do outro (adjacentes) (Therman, 1980).

Na figura 7 encontram-se representados diferentes tipos de AC.

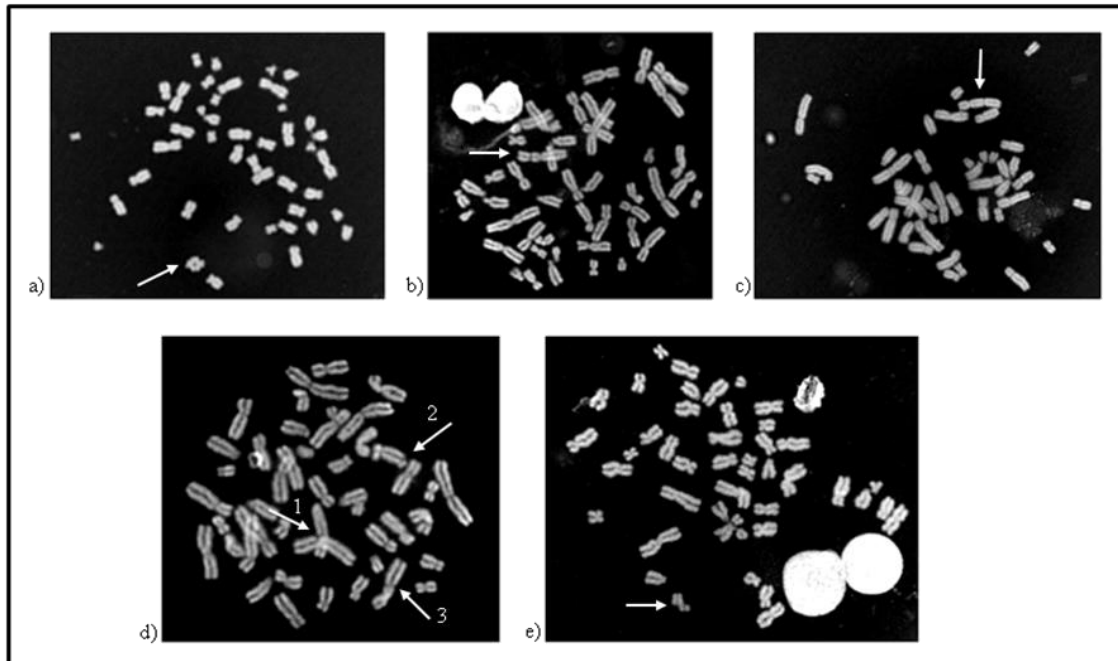


Figura 7 – Aberrações cromossômicas observadas em linfócitos em metafase.

Estas referem-se a indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas. a) forma tetrarradial; b) gap em ambas as cromátides; c) cromossoma dicêntrico; d) 1- quebra em uma cromátide; 2- quebra em ambas as cromátides e 3- gap em ambas as cromátides; e) quebra em ambas as cromátides.

As quebras cromossômicas podem ser espontâneas ou resultar da exposição a agentes externos. A frequência de quebras espontâneas varia de pessoa para pessoa, mas existem estudos que apontam o seu aumento com a idade. Isto ocorre porque a degeneração fisiológica vai aumentar a não-dijunção e a quebra dos cromossomas (Therman, 1980).

Relativamente às quebras, estas poderão ser provocadas por agentes externos: por radiações ou por agentes químicos. Grande parte dos agentes químicos induzem as quebras durante a fase G_2 do ciclo celular.

1.6.2 Aberrações cromossômicas como biomarcador de efeito

As AC como biomarcador de efeito permitem verificar a existência de dano genético e desta forma podem confirmar uma possível exposição a determinado composto químico que poderá levar a doença clínica.

Para identificação de AC são consideradas alterações estruturais que envolvam quebras, tais como as que afectam directamente o cromossoma ou apenas uma cromátide. Os gaps são contabilizados separadamente. Em relação às alterações numéricas apenas são consideradas metafases que contenham 45 a 47 cromossomas (Albertini *et al.*, 2000).

1.6.3 Vantagens e desvantagens da técnica

A vantagem deste teste quando comparado com outros testes de análise citogenética para risco de detecção de determinadas doenças, é ser considerado um teste preditivo de risco de cancro (Norppa *et al.*, 2006).

Poder-se-á considerar uma desvantagem o facto deste teste ser bastante trabalhoso e requerer um treino especializado para o técnico que analisa as AC (Knudsen & Hansen, 2007).

1.6.4 Associação entre a frequência de aberrações cromossômicas e o cancro

A frequência de AC estruturais em linfócitos do sangue periférico tem sido aplicada durante os últimos 30 anos como biomarcador precoce de efeitos provocados por agentes carcinogéneos (Hagmar *et al.*, 2004).

Foram realizados estudos por diversos autores, cujos resultados sugerem uma associação entre a frequência de AC no sangue periférico e o aumento do risco de cancro (Hagmar *et al.*, 1998; Bonassi *et al.*, 2008). Apesar de não ser possível associar o tipo de AC e o tipo de cancro em específico, segundo Wang (2008) existe uma associação entre o tipo de AC numéricas e o aumento do risco de linfoma Non-Hodgkin, sendo que se verifica uma maior incidência quando ocorrem hiperploídias (47 cromossomas) (Wang *et al.*, 2008).

No que diz respeito ao tipo de AC, que podem ser do tipo cromossómico ou do tipo cromátide, alguns estudos realizados sugerem que ambos os tipos

de AC são predictivas de risco de cancro (Hagmar *et al.*, 2004; Norppa *et al.*, 2006). Estudos realizados por Bonassi *et al.* (2008), Boffetta *et al.* (2007) e Norppa *et al.* (2006), concluíram que as AC do tipo cromossómico possuem um carácter preditivo de risco de cancro superior às AC do tipo cromátide.

Num outro estudo foi possível associar o aumento de AC com neoplasias em diversos órgãos, nomeadamente, mama, próstata, cabeça/pescoço, estando estes associados com AC do tipo cromossómico (Vodicka *et al.*, 2010).

1.6.5 Associação entre o uso de pesticidas e a frequência de aberrações cromossómicas

Os pesticidas são usados em todo o mundo em quantidades cada vez mais elevadas. Devido ao seu uso excessivo têm vindo a ser relatadas intoxicações tanto agudas, como crónicas.

Têm sido realizados estudos cujo objectivo é avaliar o efeito dos pesticidas ao nível celular, mais precisamente ao nível do dano genético que pode originar patologias oncológicas. De acordo com vários autores (Carbonell *et al.*, 1995; Mohammad *et al.*, 1995; Ergene *et al.*, 2007), há um aumento significativo de AC em indivíduos expostos a pesticidas demonstrando desta forma que estes produtos podem constituir um potencial risco. Há, no entanto, estudos nos quais não foi possível estabelecer a associação entre a exposição a pesticidas e o dano genético (Hoyos *et al.*, 1996; Scarpato *et al.*, 1996; Gregio D'Arce & Colus, 2000).

1.7 Objectivo

Com este trabalho pretende-se avaliar o dano genético numa população residente na zona norte do país exposta ocupacionalmente a pesticidas, com uma população controlo, da mesma área de residência, pela análise da frequência de aberrações cromossómicas.

2. Metodologia

2.1 População estudada e recolha de amostra biológica

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge de acordo com a Declaração de Helsínquia de 1975.

A população em estudo é constituída por dois grupos um exposto e um grupo controlo. O grupo exposto inclui 80 indivíduos da região Norte de Portugal, expostos, ocupacionalmente, a pesticidas. O grupo controlo é constituído por 84 indivíduos residentes na mesma área, com as mesmas características demográficas e estilos de vida, dos indivíduos expostos, mas sem exposição evidente a agentes químicos.

Os participantes foram informados do objectivo do estudo e assinaram um consentimento informado (anexo I). Todos os indivíduos foram submetidos a um questionário para caracterização demográfica e de estilo de vida (anexo II). Ao grupo exposto foi efectuado um segundo questionário relativo à actividade profissional: dose de pesticida geralmente utilizada, área tratada, formulação do composto utilizado, uso de equipamento de protecção individual (EPI), entre outras (anexo III).

Para análise de AC foram colhidos 5 mL de sangue num tubo contendo heparina de sódio, previamente codificados e conservados a 4°C até a análise.

2.2 Análise citogenética: Aberrações Cromossómicas

2.2.1 Técnica analítica

O procedimento experimental adoptado para a análise de AC foi o descrito por Roma-Torres et al (2006) brevemente descrito de seguida.

Numa fase inicial o procedimento é realizado em condições de assépsia. A cultura de linfócitos foi preparada adicionando 0.5 mL de sangue heparinizado a 4.5 mL de um meio de cultura [Nutrient Mixture F-10 Hams suplementado com 24% de FBS (soro fetal bovino), 1% de L-glutamina, 1% de heparina sódica (50 IU/mL) e uma mistura de antibióticos [(estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 IU/mL)]. Adicionaram-se 80 µL de fitohemaglutinina

reconstituída a 2% em água desionizada para estimular o crescimento celular. Todas as culturas foram realizadas em duplicado para cada indivíduo e incubadas a 37°C durante um período de 48 horas.

Após o período de incubação foram adicionados à cultura 55 µL de colcemida de forma a interromper a divisão celular em metafase. Continuou-se a incubação por mais 3 horas.

No final do tempo total de incubação as células foram recolhidas por centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos, passo a partir do qual deixa de ser necessário trabalhar em condições de assepsia.

Desprezou-se o sobrenadante e foi realizado o choque osmótico através da adição de uma solução hipotónica de 8 mL de KCl (0.075 M) em banho a 37 °C durante 10 minutos. Após incubação as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. As células assim obtidas (sedimento) foram fixadas em suspensão com adição duma solução gelada de metanol : ácido acético (3:1) por duas vezes intercaladas com centrifugações a 1500 rpm durante 5 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante. Este passo é realizado até o sobrenadante se apresentar límpido.

A preparação de metafases foi feita por espalhamento de gota do sedimento final em lâminas. Prepararam-se pelo menos 3 lâminas por réplica, e foram colocadas a secar na horizontal durante 24 horas ao abrigo da luz.

De seguida, procedeu-se à sua coloração com corante Giemsa a 4% (preparado em tampão fosfato de sódio, pH 6,8) durante 8 minutos, e posterior lavagem em água corrente. No final foram colocadas a secar na vertical.

Depois de bem secas, fez-se a montagem das lamelas nas lâminas com Entellan e colocou-se a secar na horizontal.

2.2.2 Identificação de aberrações cromossómicas

Na contagem de células utilizou-se um microscópio de campo claro e seguiu-se a metodologia de Therman (1980). As células foram observadas num microscópio de marca Olympus, modelo BH-2, com uma ampliação de 1000x

(ocular: 10x; objectiva: 100x). Para cada indivíduo foram seleccionadas 2 lâminas e foram contabilizadas AC em 100 metafases (50 metafases por replica/lâmina).

A avaliação / contagem de células com AC seguiu os critérios de acordo com Therman (1980):

- Foram consideradas metafases com 45 ou mais cromossomas.
- Nas AC totais foram consideradas quebras nas duas cromátides e numa cromátide.
- Nas AC do tipo cromossómico foram consideradas quebras nas duas cromátides.
- Nas AC do tipo cromátide foram consideradas as quebras em apenas uma das cromátides.

2.3 Análise estatística

De modo a avaliar a ocorrência de dano genético proveniente da exposição a pesticidas procedeu-se ao tratamento estatístico dos resultados obtidos.

A frequência de AC foi considerada a variável dependente e como variáveis independentes foram considerados a idade dos indivíduos, sexo, hábitos tabágicos, tempo e tipo de exposição e local de trabalho.

A distribuição das variáveis foi analisada quanto à sua distribuição normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov e visto que os resultados se desviavam da normalidade foram aplicados testes não paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

A associação entre as variáveis foi analisada através da correlação de Spearman.

O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$ e para análise estatística foi utilizado o programa SPSS, versão 16.0 para Windows.

3. Resultados

3.1 Caracterização da população

A população em estudo foi composta por 164 indivíduos, 80 no grupo exposto e 84 no grupo controle. As características sociodemográficas inerentes a cada um dos grupos estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Características da população estudo.

		População em estudo	
		Grupo controle (n=84)	Grupo exposto (n=80)
Idade	(anos) ^a	38.8 ± 12.5	39.9 ± 12.3
Gênero	Masculino	35 (41.7%)	41 (51.2%)
	Feminino	49 (58.3%)	39 (48.8%)
Tempo de exposição	(anos) ^a	-----	23 ± 16.2
Hábitos Tabágicos	Não fumadores	72 (85.7%)	75 (93.8%)
	Fumadores	12 (14.3%)	5 (6.2%)
Cigarros/dia	<15	5 (41.7%)	4 (80.0%)
	≥ 15	7 (58.3%)	1 (20.0%)
Local de trabalho	Ar-livre	-----	13 (16.2%)
	Estufas	-----	6 (7.5%)
	Ambos	-----	61 (76.2%)
Preparação de pesticidas	Não	-----	28 (35.0%)
	Sim	-----	52 (65.0%)
Classe química de pesticidas (última exposição)	Piretróides	-----	4 (5.7%)
	Carbamatos	-----	20 (28.6%)
	Organofosforados	-----	16 (22.9%)
	Outros	-----	30 (42.9%)
Uso de EPI	Não	-----	24 (30.0%)
	Sim	-----	56 (70.0%)
Uso inadequado de pesticidas	Não	-----	64 (82.5%)
	Sim	-----	14 (17.5%)
Estação do ano	Outono-Inverno	-----	41 (51.2%)
	Primavera-Verão	-----	39 (48.8%)

^a média ± desvio padrão

3.2 Dano genético na população estudada

As AC englobam todo o tipo de alterações estruturais e/ou numéricas, no entanto com base nos estudos realizados por Hagmar et al. (2004) e Albertini et al. (2000) foram consideradas apenas AC estruturais do tipo cromossoma e cromátide, sendo consideradas apenas as quebras, uma vez que estas estão associadas ao aumento do risco de cancro, enquanto AC estruturais do tipo “gaps” e AC de número podem ser influenciadas por factores inerentes à técnica utilizada.

Na tabela 2 estão apresentados os valores das frequências de AC obtidos no grupo controlo e no grupo exposto. Verificou-se um aumento significativo de AC totais e AC do tipo cromátide no grupo exposto comparativamente com o grupo de controlo e obteve-se uma correlação (positiva) estatisticamente significativa em relação ao aumento de AC totais e aberrações do tipo cromátide ($p < 0.05$) no grupo exposto.

Tabela 2 – Valores médios (%)^b de AC nos grupos controlo e exposto.

Grupo estudado	N	AC totais	Aberrações do tipo cromossoma	Aberrações do tipo cromátide
<i>Controlo</i>	84	0.86 ± 0.11 (0-4)	0.23 ± 0.07 (0-3)	0.63 ± 0.09 (0-3)
<i>Exposto</i>	80	1.56 ± 0.15* (0-5)	0.35 ± 0.08 (0-3)	1.21 ± 0.13* (0-5)

^b média ± SE (intervalo)

SE (standard error mean/ estimativa do erro padrão da média)

* estatisticamente significativo relativamente ao grupo controlo ($p < 0.05$)

3.3 Influência de variáveis demográficas

3.3.1 Influência do género

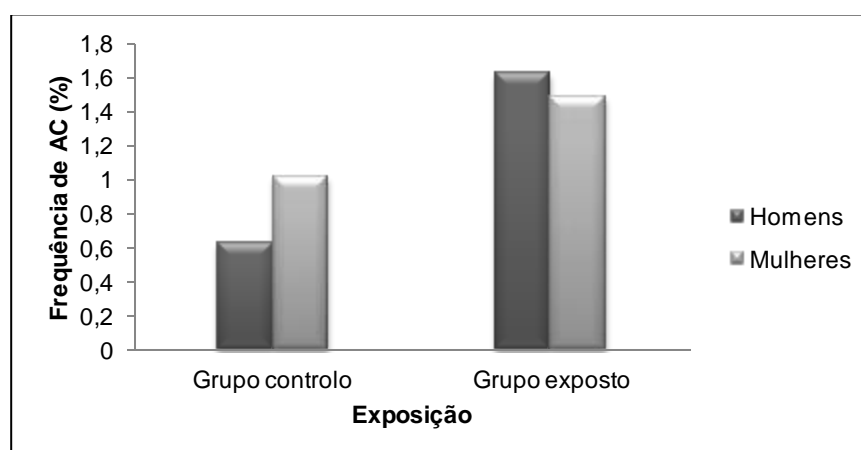
Analisando a influência do género na frequência de AC, não se verificam diferenças significativas na frequência de AC entre o género feminino e masculino, em ambos os grupos estudados (tabela 3).

Tabela 3 – Valores médios (%)^b de AC nos grupos controlo e exposto de acordo com o género.

Género	N (%)	AC totais	Aberrações do tipo cromossoma	Aberrações do tipo cromátide
<i>Grupo Controlo</i>				
Feminino	49 (58)	1.02 ± 0.16 (0-4)	0.27 ± 0.10 (0-3)	0.76 ± 0.13 (0-3)
Masculino	35 (42)	0.63 ± 0.15 (0-4)	0.17 ± 0.10 (0-3)	0.46 ± 0.11 (0-2)
<i>Grupo Exposto</i>				
Feminino	39 (49)	1.49 ± 0.20 (0-4)	0.28 ± 0.08 (0-2)	1.21 ± 0.19 (0-4)
Masculino	41 (51)	1.63 ± 0.21 (0-5)	0.41 ± 0.13 (0-3)	1.22 ± 0.18 (0-5)

^b média ± SE (intervalo)

No entanto é possível verificar-se que o grupo exposto apresenta uma maior frequência de AC totais em indivíduos do género masculino, como se pode ver na figura 8, quando comparado com o grupo controlo, no entanto esta diferença não é estatisticamente significativa.

**Figura 8** – Distribuição das frequências de AC nos grupos controlo e exposto de acordo com o género.

3.3.2 Influência da idade

Para avaliação do efeito da idade na frequência de AC, definiram-se quatro classes etárias de forma a que o número de indivíduos em cada classe seja relativamente semelhante. Estas classes estão divididos da seguinte forma: 18-29 anos; 30-38 anos; 39-49 anos e ≥ de 50 anos, sendo os dados apresentados na tabela 4.

Da análise dos valores obtidos, verificou-se não existirem diferenças significativas entre grupos etários.

Tabela 4 – Valores médios (%)^b de AC nos grupos controlo e exposto de acordo com a idade.

Grupos etários	N (%)	AC totais	Aberrações do tipo cromossoma	Aberrações do tipo cromátide
<i>Grupo Controlo</i>				
18-29 anos	24 (29)	0.71 ± 0.16 (0-3)	0.17 ± 0.08 (0-1)	0.54 ± 0.16 (0-3)
30-38 anos	20 (24)	1.30 ± 0.30 (0-4)	0.55 ± 0.25 (0-3)	0.75 ± 0.20 (0-3)
39-49 anos	22 (26)	0.95 ± 0.21 (0-3)	0.14 ± 0.07 (0-1)	0.82 ± 0.18 (0-2)
≥ 50 anos	18 (21)	0.44 ± 0.20 (0-3)	0.06 ± 0.06 (0-1)	0.39 ± 0.18 (0-3)
<i>Grupo Exposto</i>				
18-29 anos	18 (23)	1.67 ± 0.28 (0-4)	0.44 ± 0.20 (0-3)	1.22 ± 0.25 (0-3)
30-38 anos	21 (26)	1.14 ± 0.22 (0-4)	0.43 ± 0.16 (0-3)	0.71 ± 0.14 (0-2)
39-49 anos	20 (25)	2.05 ± 0.35 (0-4)	0.40 ± 0.15 (0-2)	1.65 ± 0.28 (0-4)
≥ 50 anos	21 (26)	1.43 ± 0.30 (0-5)	0.14 ± 0.10 (0-2)	1.29 ± 0.31 (0-5)

^b média ± SE (intervalo)

3.4 Influência de hábitos tabágicos

A influência dos hábitos tabágicos na frequência de AC nos grupos em estudo está descrita na tabela 6.

Da análise dos valores obtidos, verificou-se um ligeiro aumento da frequência de AC em indivíduos fumadores comparativamente aos não-fumadores de cada grupo estudado, no entanto este aumento não é significativo.

Tabela 5 – Valores médios (%)^b de AC nos grupos controlo e exposto de acordo com os hábitos tabágicos.

Hábitos tabágicos	N (%)	AC totais	Aberrações do tipo cromossoma	Aberrações do tipo cromátide
<i>Grupo Controlo</i>				
Não-fumadores	72 (86)	0.83 ± 0.12 (0-4)	0.21 ± 0.07 (0-3)	0.63 ± 0.10 (0-3)
Fumadores	12 (14)	1.00 ± 0.35 (0-4)	0.33 ± 0.26 (0-3)	0.67 ± 0.22 (0-2)
<i>Grupo Exposto</i>				
Não-fumadores	75 (94)	1.53 ± 0.15 (0-5)	0.31 ± 0.07 (0-3)	1.23 ± 0.14 (0-5)
Fumadores	5 (6)	2.00 ± 0.89 (0-4)	1.00 ± 0.63 (0-3)	1.00 ± 0.45 (0-2)

^b média ± SE (intervalo)

3.5 Influência dos hábitos de trabalho

3.5.1 Local de trabalho

A exposição a pesticidas varia de acordo com as actividades realizadas e as circunstâncias em que estas são realizadas, sendo por isso comum a exposição variar entre os diferentes locais de trabalho tais como ar-livre e estufas. Os resultados obtidos em indivíduos que trabalham ao ar livre, em estufas ou que dividem o seu tempo entre estes dois locais de trabalho estão presentes na tabela 6.

Da análise dos valores obtidos, verificou-se um aumento de todos os tipos de frequência de AC em indivíduos cuja exposição se resume ao trabalho em estufas quando comparado com indivíduos que laboram ao ar livre ou em ambos os locais no entanto este aumento não é estatisticamente significativo.

Tabela 6 – Valores médios (%)^b de AC presentes na população exposta, segundo os locais de trabalho.

Local de trabalho	N (%)	AC totais	Aberrações do tipo cromossoma	Aberrações do tipo cromátide
Ar-livre	13 (16)	1.62 ± 0.31 (0-4)	0.62 ± 0.21 (0-2)	1.00 ± 0.32 (0-3)
Ar-livre e estufas	61 (76)	1.48 ± 0.17 (0-5)	0.23 ± 0.07 (0-3)	1.25 ± 0.16 (0-5)
Estufas	6 (8)	2.33 ± 0.56 (1-4)	1.00 ± 0.52 (0-3)	1.33 ± 0.21 (1-2)

^b média ± SE (intervalo)

De notar que a distribuição dos indivíduos entre os diferentes grupos que se formam relativamente ao local de trabalho não é uniforme. O grupo que trabalha em estufas contém um número inferior de indivíduos, de referir também que a grande maioria dos indivíduos (figura 9) trabalha em ambos os locais (estufas e ar-livre).

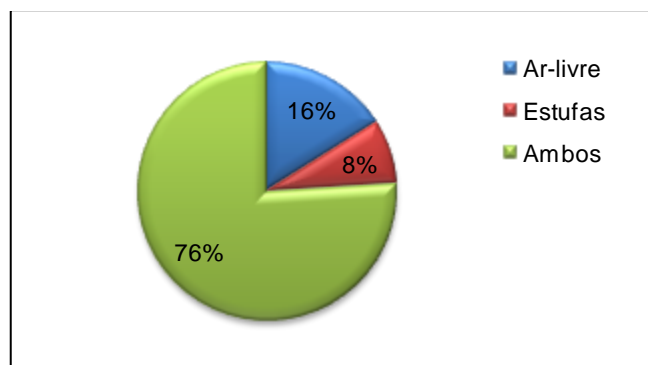


Figura 9 – Percentagem de trabalhadores agrícolas distribuídos pelos locais de trabalho – estufas, ar-livre e ambos os locais.

3.5.2 Preparação e aplicação de pesticidas

- *Preparação de pesticidas*

A preparação de pesticidas é um passo importante no manuseamento dos mesmos, sendo esta a fase em que o produto está mais concentrado.

Da análise dos resultados obtidos presentes na tabela 7, é possível verificar-se que os valores de frequência de AC totais são semelhantes entre os dois grupos (preparação e a não preparação de pesticidas) não havendo diferença estatisticamente significativa.

Tabela 7 – Valores médios (%)^b de AC presentes na população exposta, de acordo com o envolvimento dos indivíduos na preparação de pesticidas.

Preparação de pesticidas	N (%)	AC totais	Aberrações do tipo cromossoma	Aberrações do tipo cromátide
Não	28 (35)	1.54 ± 0.25 (0-4)	0.36 ± 0.14 (0-3)	1.18 ± 0.22 (0-4)
Sim	52 (65)	1.58 ± 0.18 (0-5)	0.35 ± 0.09 (0-3)	1.23 ± 0.16 (0-5)

^b média ± SE (intervalo)

- *Aplicação de pesticidas*

A aplicação de pesticidas é uma das fases do trabalho agrícola que envolve maior exposição, estando associada aos diferentes métodos de aplicação (maquinaria, aplicação contra ou a favor do vento, formulação do pesticidas, entre outras). Da análise dos resultados obtidos verifica-se um aumento da frequência de AC totais em indivíduos que não aplicam pesticidas, quando comparados com os que aplicam, no entanto esta diferença não é significativa (tabela 8).

Tabela 8 – Valores médios (%)^b de AC presentes na população exposta, de acordo com o envolvimento dos indivíduos na aplicação de pesticidas.

Aplicação de pesticidas	N (%)	AC totais	Aberrações do tipo cromossoma	Aberrações do tipo cromátide
Não	28 (35)	1.61 ± 0.25 (0-4)	0.36 ± 0.14 (0-3)	1.25 ± 0.22 (0-4)
Sim	52 (65)	1.58 ± 0.18 (0-5)	0.35 ± 0.09 (0-3)	1.19 ± 0.16 (0-5)

^b média ± SE (intervalo)

3.5.3 Utilização de equipamento de protecção individual

A utilização de EPI deve ser uma regra a ter em conta quando se tem contacto com pesticidas. Este contacto pode ocorrer na preparação ou aplicação do pesticida, assim como na manutenção das culturas.

A utilização de protecção máxima é considerada aquando da utilização de todos os equipamentos disponíveis (mascara, óculos, capacete, fato de protecção, luvas e botas).

Na população em estudo, a utilização de EPI no seu máximo de protecção está presente em 70% da população exposta.

Na tabela 9 estão presentes os resultados obtidos, através dos quais se verificou um aumento não significativo da frequência de AC totais nos indivíduos que não utilizam EPI em comparação com os indivíduos que usam. Verifica-se que apenas nas AC do tipo cromossoma o resultado é estatisticamente significativo ($p < 0.05$) quando comparado com indivíduos que não utilizam EPI.

Tabela 9 – Valores médios (%)^b de AC presentes na população exposta, de acordo com o envolvimento dos indivíduos com a utilização de equipamento de protecção individual.

Utilização de equipamento de protecção individual	N (%)	AC totais	Aberrações do tipo cromossoma	Aberrações do tipo cromátide
Não	24 (30)	1.79 ± 0.29 (0-4)	0.71 ± 0.19* (0-3)	1.08 ± 0.21 (0-3)
Sim	56 (70)	1.46 ± 0.17 (0-5)	0.20 ± 0.06 (0-2)	1.27 ± 0.16 (0-5)

^b média ± SE (intervalo)

* estatisticamente significativo relativamente aos indivíduos que não utilizam equipamento de protecção individual ($p < 0.005$)

3.6 Classe química do composto utilizado

Os pesticidas utilizados dependem do tipo de cultura e da praga que se pretende eliminar.

Os resultados relativos ao tipo de pesticidas utilizados estão presentes na tabela 10. Da análise dos resultados obtidos verifica-se que a frequência de AC totais é maior em indivíduos que estão expostos a pesticidas do tipo piretróides e carbamatos, no entanto esta diferença não é estatisticamente significativa relativamente às outras classes químicas de pesticidas. Em

relação à frequência de AC do tipo cromossoma verificou-se um aumento nos indivíduos expostos a carbamatos e organofosforados, no entanto esta diferença não é estatisticamente significativa quando comparados com as outras classes químicas de pesticidas. Relativamente às AC do tipo cromátide verificou-se um aumento da frequência nos indivíduos expostos a piretróides, no entanto esta diferença não é significativa, relativamente às outras classes de pesticidas.

Tabela 10 – Valores médios (%)^b de AC presentes na população exposta, de acordo com o tipo de pesticidas utilizados.

Classe química	N (%)	AC totais	Aberrações do tipo cromossoma	Aberrações do tipo cromátide
<i>Piretróides</i>	4 (6)	1.75 ± 0.85 (0-4)	0.25 ± 0.25 (0-1)	1.50 ± 0.65 (0-3)
Carbamatos	20 (28)	1.75 ± 0.35 (0-5)	0.50 ± 0.20 (0-3)	1.25 ± 0.32 (0-5)
Organofosforados	16 (23)	1.44 ± 0.35 (0-4)	0.44 ± 0.20 (0-3)	1.00 ± 0.30 (0-4)
Outros	30 (43)	1.53 ± 0.21 (0-4)	0.20 ± 0.09 (0-2)	1.33 ± 0.19 (0-3)

^b média ± SE (intervalo)

3.6.1 Uso inadequado de pesticidas

Foi considerado uso inadequado de pesticidas sempre que se verificou: o uso de pesticidas retirados do mercado, o uso de concentrações de pesticidas superiores ao indicado no rótulo e o seu uso em culturas não previstas para o pesticida em questão. Na tabela 11 estão presentes os resultados obtidos, nos quais se verificou um aumento da frequência de AC totais em indivíduos que fazem uso inadequado de pesticidas. Em relação às AC do tipo cromossoma e do tipo cromátide verificou-se um aumento da frequência em indivíduos que fazem um uso inadequado dos pesticidas, no entanto a diferença não é estatisticamente significativa.

Tabela 11 – Valores médios (%)^b de AC presentes na população exposta, de acordo com o uso inadequado de pesticidas.

<i>Uso inadequado de pesticidas</i>	<i>N (%)</i>	<i>AC totais</i>	<i>Aberrações do tipo cromossoma</i>	<i>Aberrações do tipo cromátide</i>
<i>Não</i>	66 (82.5)	1.52 ± 0.16 (0-5)	0.35 ± 0.08 (0-3)	1.17 ± 0.14 (0-5)
<i>Sim</i>	14 (17.5)	1.79 ± 0.42 (0-4)	0.36 ± 0.23 (0-3)	1.43 ± 0.33 (0-3)

^bmédia ± SE (intervalo)

3.7 Estação do ano

A estação do ano é um factor fundamental na aplicação de pesticidas, pois o tipo de culturas varia ao longo do ano. Por outro lado, a frequência de aplicações é muito superior na Primavera e Verão que nos meses de Outono e Inverno. Estas diferenças justificam o estudo de possíveis alterações nos níveis de dano genético observados em indivíduos que participaram no estudo durante os meses de Primavera-Verão relativamente aos que participaram durante o Outono-Inverno.

Na tabela 12 apresentam-se os resultados obtidos para os valores médios, de AC nos indivíduos estudados consoante a estação do ano.

Tabela 12 – Valores médios (%)^b de AC presentes na população exposta, de acordo com a estação do ano.

<i>Estação do ano</i>	<i>N (%)</i>	<i>AC totais</i>	<i>Aberrações do tipo cromossoma</i>	<i>Aberrações do tipo cromátide</i>
<i>Outono-Inverno</i>	41	1.46 ± 0.19 (0-4)	0.29 ± 0.10 (0-3)	1.17 ± 0.18 (0-4)
<i>Primavera-Verão</i>	39	1.67 ± 0.22 (0-5)	0.41 ± 0.12 (0-3)	1.26 ± 0.19 (0-5)

^bmédia ± SE (intervalo)

Podemos observar um aumento da frequência de AC totais nos indivíduos que aplicam os pesticidas durante a época Primavera-Verão, quando comparado com os indivíduos que aplicam os pesticidas durante a época Outono-Inverno, no entanto esta diferença não é significativa.

4. Discussão

Com o elevado uso de pesticidas existe uma preocupação crescente quanto à exposição de determinados grupos da população a substâncias químicas que podem causar efeitos negativos na saúde humana, como por exemplo a exposição ocupacional de trabalhadores agrícolas a pesticidas.

Diversos autores têm relatado uma associação entre a exposição a pesticidas e a ocorrência de dano genético. A acumulação dos danos genéticos provocados podem promover o início do processo de carcinogénese e por sua vez levar à formação de diversas neoplasias (Blair & Zahm, 1995).

Os resultados obtidos neste estudo para o indicador de genotoxicidade – Aberrações Cromossómicas – revelam que os indivíduos expostos ocupacionalmente apresentam um aumento significativo ($p < 0.05$) na frequência de AC totais relativamente aos indivíduos do grupo controlo. No que diz respeito aos outros indicadores considerados (aberrações do tipo cromossómico e cromátide) verifica-se um aumento significativo ($p < 0.05$) na população exposta de aberrações do tipo cromátide quando comparado com o grupo controlo. Este resultado poderá ser explicado pelo facto de as aberrações do tipo cromátide estarem relacionadas com a exposição a produtos químicos, enquanto as aberrações do tipo cromossómico estão associadas à exposição a radiações, como descrito por Therman (1980).

A associação entre a frequência de AC e a manifestação de doença oncológica poderá ser indicativa de que determinada população poderá sofrer no futuro uma maior incidência de neoplasias quando comparada com outra população não exposta a pesticidas ou outro tipo de produtos químicos. Esta associação não é no entanto, aplicada ao indivíduo em si, uma vez que a ocorrência de neoplasias depende de vários factores, tanto intrínsecos como extrínsecos ao indivíduo (Costa *et al.*, 2008).

Vários estudos realizados em agricultores expostos a misturas de pesticidas (Garaj-Vrhovac & Zeljezic, 2002; Jors *et al.*, 2007) demonstram

aumentos significativos da frequência de AC nos indivíduos expostos relativamente ao grupo controlo.

Como é referido por diversos autores em estudos de biomonitorização de populações expostas, características como idade, sexo, hábitos tabágicos, entre outros factores, são capazes de enviesar os parâmetros que se pretendem avaliar (Jors *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008).

Género

Neste estudo, verificou-se que no grupo controlo existe um ligeiro aumento da frequência de AC no género feminino, enquanto no grupo exposto este aumento verifica-se no género masculino. Sendo assim, conclui-se a não existência de uma relação entre o género e o aumento de AC, visto os resultados não serem estatisticamente significativos confirmando resultados obtidos por outros autores (Antonucci & de Syllos Colus, 2000; Zeljezic & Garaj-Vrhovac, 2001; Sailaja *et al.*, 2006).

Idade

No que se refere à idade foram estabelecidas quatro classes etárias, sendo estas: 18-29 anos; 30-38 anos; 39-49 anos e \geq de 50 anos.

Foi possível verificar que no grupo controlo existe um aumento da frequência de AC em indivíduos cujas idades variam entre os 30 e 38 anos, enquanto de no grupo exposto o aumento da frequência de AC se situa na faixa etária dos 39 a 49 anos, sendo que este aumento poderá dever-se ao facto de se tratar de uma classe representativa de indivíduos cujo volume de trabalho é superior às restantes classes etárias, talvez por apresentarem maior experiência e estarem sujeitos à exposição ocupacional a pesticidas durante longos períodos de tempo.

Apesar desse aumento não existe uma diferença estatisticamente significativa, estando os resultados obtidos de acordo com resultados obtidos por outros autores (Antonucci & de Syllos Colus, 2000; Zeljezic & Garaj-Vrhovac, 2001; Sailaja *et al.*, 2006).

No entanto, num estudo realizado por Mladinic *et al.* (2010), é referido o aumento da frequência de AC em indivíduos com idade mais avançada. Esta frequência pode dever-se a factores tais como formação excessiva de espécies reactivas de oxigénio, reparação incompleta ou a não reparação do ADN levando à acumulação de mutações no ADN.

Hábitos tabágicos

Respeitante aos hábitos tabágicos, verificou-se que tanto no grupo controlo como no grupo exposto existe um aumento da frequência de AC em indivíduos que fumam. Estes resultados, no entanto, não são estatisticamente significativos como está referido em diversos estudos (Antonucci & de Syllos Colus, 2000; Zeljezic & Garaj-Vrhovac, 2001; Sailaja *et al.*, 2006), devendo-se provavelmente ao baixo número de indivíduos fumadores presentes em ambos os grupos.

No entanto, alguns autores como Ergene *et al.* (2007) e Obe *et al.* (1978), referem que os indivíduos fumadores apresentam uma elevada frequência de AC. Os factores que podem influenciar o aumento da frequência de AC são os compostos carcinogénicos genotóxicos presentes no tabaco, tais como N-nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos, entre outros (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. & International Agency for Research on Cancer., 2007).

Local de trabalho

O local de trabalho é um factor fundamental, pois faz variar o tipo de exposição a que uma população está sujeita.

O estudo realizado por Lander *et al.* (2000) aponta um aumento da frequência de AC em indivíduos que trabalham exclusivamente em estufas, quando comparados com trabalhadores que exercem as mesmas funções ao ar-livre.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram um aumento da frequência de AC em indivíduos expostos, cujo trabalho se resume apenas a estufas, quando comparados com indivíduos que trabalham ao ar-livre ou em

ambos os locais. Esta diferença deve-se sobretudo ao tipo de atmosfera gerada nas estufas, onde o ambiente fechado, a elevada humidade e o calor promovem o aumento da concentração do pesticida aplicado, o que não se verifica ao ar-livre.

Apesar do aumento da frequência de AC, estes resultados não são estatisticamente significativos.

Preparação e aplicação de pesticidas

No que se refere à preparação de pesticidas é possível verificar um aumento da frequência de AC em indivíduos envolvidos na sua preparação, no entanto estes resultados não são estatisticamente significativos.

Em relação à aplicação de pesticidas verificou-se um aumento da frequência de AC em indivíduos que não estão envolvidos na aplicação do pesticida, podendo ser explicado pelo facto destes terem uma falsa concepção de segurança, uma vez que não estão directamente envolvidos nas mesmas tarefas que os indivíduos que aplicam os pesticidas, optando assim pela não utilização de EPI como está também demonstrado no estudo realizado por Costa et al. (2006). No entanto estes resultados não são estatisticamente significativos.

Utilização de EPI

O uso de EPI é considerado um factor determinante na protecção de indivíduos expostos ocupacionalmente. Segundo Machera *et al.* (2009) está também dependente de critérios termofisiológicos e ergonómicos, isto porque se verifica que em determinados países, de climas mais quentes são usados menos frequentemente, promovendo desta forma uma maior exposição aos pesticidas. Este estudo enfatiza a importância da utilização de EPI de forma a prevenir o contacto directo com o pesticida durante as diferentes actividades agrícolas, tais como preparação do pesticida, a sua aplicação e por último mas não menos importante, a manutenção das culturas e sua colheita.

Nos resultados obtidos neste estudo verificou-se um aumento da frequência de AC ($p < 0.05$) em indivíduos que não utilizam EPI. Este aumento ocorreu ao nível do cromossoma, ou seja, aberrações do tipo cromossômico, que segundo Therman (1980) e Bonassi e Au (2002) ocorrem durante a exposição a radiação ionizante. Sendo assim, este resultado pode dever-se à exposição a outros factores externos, assim como, a mecanismos de reparação ao nível da cromátide tornando desta forma as AC, ao nível da cromátide, menos evidentes.

Compostos químicos

Em relação aos compostos químicos utilizados verificou-se um aumento da frequência de AC com o uso de piretróides e carbamatos, apesar destes compostos não serem os mais utilizados. No entanto estes resultados não são estatisticamente significativos. Estes podem dever-se ao uso inadequado destes compostos ou devido à sua capacidade de provocar dano genético.

Segundo um estudo *in vitro* realizado por Suman *et al.* (2006) verificou-se que a exposição de linfócitos humanos ao pesticida piretróide cipermetrina produzia efeitos genotóxicos.

Também em relação aos carbamatos, é referido num estudo *in vitro* realizado por Soloneski *et al.* (2001) um aumento do dano no DNA após exposição de linfócitos humanos ao pesticida ditiocarbamato, podendo ser por isso considerado um composto genotóxico.

Uso inadequado de pesticidas:

Em relação ao uso inadequado de pesticidas, refere-se, ao uso de pesticidas retirados do mercado, uso de concentração de pesticida superior à referida no rótulo do composto e o uso de pesticidas inapropriados para determinada cultura.

Em geral os trabalhadores agrícolas não estão expostos apenas a um determinado pesticida, estando por vezes expostos a vários, entre eles alguns

que possam já ter sido retirados do mercado devido a características carcinogénicas ou mutagénicas como já foi referido no IARC (1991).

A exposição aos pesticidas não se resume apenas ao composto activo do produto mas também à exposição a outros compostos que podem ser inertes ou potenciar o pesticida em si, podendo desta forma tornar-se tóxico para humanos (Costa *et al.*, 2008). Sendo assim quando estes compostos são utilizados de forma incorrecta podem constituir risco para a saúde humana.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram um aumento da frequência de AC em indivíduos que fazem uso inadequado dos pesticidas, no entanto estes resultados não são estatisticamente significativos.

Estação do ano

A estação do ano em que ocorrem os cultivos é considerada uma variável importante devido à maior utilização de pesticidas em determinadas alturas do ano. Constitui uma variável temporal de exposição.

Da análise dos resultados verificou-se um aumento da frequência de AC na estação primavera-verão, tal como referido no estudo realizado por Lander *et al.* (2000), este aumento deve-se ao facto de existir uma maior utilização de pesticidas. Apesar dos resultados apresentarem um aumento de frequência de AC, estes não são significativos.

Com este trabalho foi possível estabelecer uma associação entre o dano genotóxico e a exposição ocupacional a pesticidas, porém não foi possível relacionar o aumento da frequência de AC com as variáveis de exposição analisadas. Uma das possíveis causas destes resultados pode dever-se ao facto dos dados serem recolhidos através de questionários, podendo levar a casos de “missclassification” (classificação incorrecta), ou seja, os indivíduos podem ter fornecido informação incorrecta no que diz respeito à exposição.

Uma das formas de ultrapassar esta questão é através da utilização de biomarcadores de exposição, de forma a classificar os indivíduos em categorias de muito exposto, relativamente exposto ou pouco exposto.

No entanto é possível verificar de forma evidente que a exposição a pesticidas pode causar dano genético, mas pelas limitações do estudo da exposição a pesticidas não foi possível distinguir quais as variáveis de exposição mais importantes.

Por outro lado, os dados recolhidos através de questionário referem-se apenas à última exposição, ou seja, se usou inadequadamente pesticidas pela última vez, a classe química do último pesticida utilizado, entre outras. Tendo em conta o volume de trabalho destes indivíduos, os dados relativos à última exposição podem revelar-se enganadores.

5. Conclusão

A exposição ocupacional a pesticidas tem sido associada a um aumento do dano genético. Têm vindo a ser realizados estudos epidemiológicos que comprovam a associação entre a exposição a pesticidas e diversos efeitos provocados na saúde humana.

No entanto, uma vez que diversas variáveis não podem ser controladas, estes estudos podem apresentar falhas. Estas variáveis podem relacionar-se com o estilo de vida das diferentes populações, diversos hábitos sociais e laborais, estando estes relacionados com as diferentes formas de cultivo, preparação, forma de aplicação e o tipo de pesticida.

Devido ao uso de diferentes pesticidas ao longo de determinado período de tempo ou até misturas destes compostos, a associação entre o efeito provocado e o composto utilizado estão por vezes dificultados. Por estas razões as estratégias de biomonitorização devem ser cautelosas evitando por isso comparações entre diferentes grupos populacionais, tipo de exposição e resultados citogenéticos obtidos. Com a existência destas limitações não foi possível perceber quais as variáveis de exposição mais importante. No entanto, os resultados evidenciam a influência destes compostos químicos no aumento da frequência de AC.

Um factor importante que deverá ser tido em conta é o uso de EPI, isto porque como evidenciam os resultados obtidos neste estudo, o seu uso influencia a frequência de AC. Este facto deve-se ao desconhecimento, por parte dos trabalhadores expostos ocupacionalmente, do uso correcto de EPI aquando do manuseamento de pesticidas.

O facto dos dados terem sido recolhidos através de questionários poderão ter dado origem a erros de classificação do tipo de exposição a que os indivíduos estão sujeitos, constituindo desta forma uma limitação ao estudo realizado. De forma a contornar estas limitações, poderão ser utilizados biomarcadores de forma a classificar os indivíduos nas diferentes categorias de exposição.

Bibliografia

- Abdullat IM, Battah AH & Hadidi KA (2006) The use of serial measurement of plasma cholinesterase in the management of acute poisoning with organophosphates and carbamates. *Forensic Sci Int* **162**, 126-130.
- Aitio A & Kallio A (1999) Exposure and effect monitoring: a critical appraisal of their practical application. *Toxicol Lett* **108**, 137-147.
- Alavanja MC, Dosemeci M, Samanic C, Lubin J, Lynch CF, Knott C, Barker J, Hoppin JA, Sandler DP, Coble J, Thomas K & Blair A (2004) Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. *Am J Epidemiol* **160**, 876-885.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD & Aitio A (2000) IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res* **463**, 111-172.
- Amorim LCA (2003) Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia* **6**, 158-170.
- Andersen HR, Schmidt IM, Grandjean P, Jensen TK, Budtz-Jorgensen E, Kjaerstad MB, Baelum J, Nielsen JB, Skakkebaek NE & Main KM (2008) Impaired reproductive development in sons of women occupationally exposed to pesticides during pregnancy. *Environ Health Perspect* **116**, 566-572.
- Angerer J, Ewers U & Wilhelm M (2007) Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health* **210**, 201-228.
- Antonucci GA & de Syllos Colus IM (2000) Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides. *Teratog Carcinog Mutagen* **20**, 265-272.
- Arbuckle TE, Lin Z & Mery LS (2001) An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ Health Perspect* **109**, 851-857.
- Baldi I, Gruber A, Rondeau V, Lebailly P, Brochard P & Fabrigoule C (2011) Neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides: results from the 4-year follow-up of the PHYTONER study. *Occup Environ Med* **68**, 108-115.
- Beach TM & Whalen MM (2006) Effects of organochlorine pesticides on interleukin secretion from lymphocytes. *Hum Exp Toxicol* **25**, 651-659.
- Beseler CL & Stallones L (2008) A cohort study of pesticide poisoning and depression in Colorado farm residents. *Ann Epidemiol* **18**, 768-774.
- Blair A & Zahm SH (1995) Agricultural exposures and cancer. *Environ Health Perspect* **103 Suppl 8**, 205-208.
- Blanco LE, Aragon A, Lundberg I, Liden C, Wesseling C & Nise G (2005) Determinants of dermal exposure among Nicaraguan subsistence farmers during pesticide applications with backpack sprayers. *Ann Occup Hyg* **49**, 17-24.
- Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Puskaierova D, Znaor A, Kelecsenyi Z, Kurtinaitis J, Rachtan J, Forni A, Vermeulen R & Bonassi S (2007) Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol* **165**, 36-43.
- Bonassi S & Au WW (2002) Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat Res* **511**, 73-86.
- Bonassi S, Norppa H, Ceppi M, Stromberg U, Vermeulen R, Znaor A, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lazutka J, Rossner P, Sram RJ & Boffetta P (2008) Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the

- risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis* **29**, 1178-1183.
- Burr SA & Ray DE (2004) Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicol Sci* **77**, 341-346.
- Carbonell E, Valbuena A, Xamena N, Creus A & Marcos R (1995) Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutat Res* **344**, 127-134.
- Cecchine G, Golomb BA, Hilborne LH, Spektor DM & Anthony CR (2000) Pesticides. In *A review of the scientific literature as it pertains to Gulf War Illnesses*: Rand Corp Santa Monica CA.
- Chiu BC & Blair A (2009) Pesticides, chromosomal aberrations, and non-Hodgkin's lymphoma. *J Agromedicine* **14**, 250-255.
- Clementi M, Tiboni GM, Causin R, La Rocca C, Maranghi F, Raffagnato F & Tenconi R (2008) Pesticides and fertility: an epidemiological study in Northeast Italy and review of the literature. *Reprod Toxicol* **26**, 13-18.
- Colosio C, Corsini E, Barcellini W & Maroni M (1999) Immune parameters in biological monitoring of pesticide exposure: current knowledge and perspectives. *Toxicol Lett* **108**, 285-295.
- Cooper J & Dobson H (2007) The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection* **26**, 1337-1348.
- Corsini E, Liesivuori J, Vergieva T, Van Loveren H & Colosio C (2008) Effects of pesticide exposure on the human immune system. *Hum Exp Toxicol* **27**, 671-680.
- Costa C (2008) The Portuguese Pesticide Scenario. In *Pesticide Research Trends*, pp. 211-239 [AB Tennefy, editor]: Nova Science Publishers, Inc.
- Costa C, Teixeira JP & Mayan O (2008) Pesticides as genetic damage inducers. In *Progress in DNA damage research*, pp. 111-163 [SMaS Nakano, editor]: Nova Science Publishers.
- Costa C, Teixeira JP, Silva S, Roma-Torres J, Coelho P, Gaspar J, Alves M, Laffon B, Rueff J & Mayan O (2006) Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis* **21**, 343-350.
- Cruz S, Lino C & Silveira MI (2003) Evaluation of organochlorine pesticide residues in human serum from an urban and two rural populations in Portugal. *Sci Total Environ* **317**, 23-35.
- Delft JH, Baan RA & Roza L (1998) Biological effect markers for exposure to carcinogenic compound and their relevance for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* **28**, 477-510.
- Dick FD (2006) Parkinson's disease and pesticide exposures. *Br Med Bull* **79-80**, 219-231.
- Ergene S, Celik A, Cavas T & Kaya F (2007) Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Goksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environ Int* **33**, 877-885.
- Farmer, Peter B & Emeny J (2006) Biomarkers of carcinogen exposure and early effects, pp. 163. Pland: Nofer Institute of Occupational Medicine.
- Fishel F (1991) Pesticides and the Environment. *University Extension University of Missouri-Columbia*, 6.
- Fleming LE, Bean JA, Rudolph M & Hamilton K (1999) Mortality in a cohort of licensed pesticide applicators in Florida. *Occup Environ Med* **56**, 14-21.
- Fowler PA, Abramovich DR, Haites NE, Cash P, Groome NP, Al-Qahtani A, Murray TJ & Lea RG (2007) Human fetal testis Leydig cell disruption by exposure to the pesticide dieldrin at low concentrations. *Hum Reprod* **22**, 2919-2927.

- Garaj-Vrhovac V & Zeljezic D (2002) Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. *J Appl Toxicol* **22**, 249-255.
- Garry VF, Harkins ME, Erickson LL, Long-Simpson LK, Holland SE & Burroughs BL (2002) Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA. *Environ Health Perspect* **110 Suppl 3**, 441-449.
- Gregio D'Arce LP & Colus IM (2000) Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil. *Teratog Carcinog Mutagen* **20**, 161-170.
- Hagmar L, Bonassi S, Stromberg U, Brogger A, Knudsen LE, Norppa H & Reuterwall C (1998) Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res* **58**, 4117-4121.
- Hagmar L, Stromberg U, Bonassi S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lindholm C & Norppa H (2004) Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res* **64**, 2258-2263.
- Hatcher JM, Pennell KD & Miller GW (2008) Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 322-329.
- Hoppin JA, Umbach DM, London SJ, Henneberger PK, Kullman GJ, Alavanja MC & Sandler DP (2008) Pesticides and atopic and nonatopic asthma among farm women in the Agricultural Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 11-18.
- Hoyos LS, Carvajal S, Solano L, Rodriguez J, Orozco L, Lopez Y & Au WW (1996) Cytogenetic Monitoring of Farmers exposed to pesticides in Colombia. *Environ Health Perspect* **104 Suppl 3**, 535-538.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1990 : Lyon France), International Agency for Research on Cancer. & World Health Organization. (1991) *Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. & International Agency for Research on Cancer. (2007) *Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines*. Lyon, France
Geneva: World Health Organization
distributed by WHO Press.
- IEH (1996) The use of biomarkers in environmental exposure assessment, pp. 118 [MlfEa Health, editor. Leicester, UK.
- INE IP (2009) Indicadores Agro-Ambientais 1989-2007, pp. 1-11.
- Ji BT, Silverman DT, Stewart PA, Blair A, Swanson GM, Baris D, Greenberg RS, Hayes RB, Brown LM, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Pottern LM, Schwartz AG & Hoover RN (2001) Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *Am J Ind Med* **39**, 92-99.
- Jors E, Gonzales AR, Ascarrunz ME, Tirado N, Takahashi C, Lafuente E, Dos Santos RA, Bailon N, Cervantes R, O H, Baelum J & Lander F (2007) Genetic Alterations in Pesticide Exposed Bolivian Farmers: An evaluation by analysis of chromosomal aberrations and the comet assay. *Biomark Insights* **2**, 439-445.
- Kirrane EF, Hoppin JA, Kamel F, Umbach DM, Boyes WK, Deroos AJ, Alavanja M & Sandler DP (2005) Retinal degeneration and other eye disorders in wives of farmer pesticide applicators enrolled in the agricultural health study. *Am J Epidemiol* **161**, 1020-1029.
- Knudsen LE & Hansen AM (2007) Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *Int J Hyg Environ Health* **210**, 461-470.

- Lander BF, Knudsen LE, Gamborg MO, Jarventaus H & Norppa H (2000) Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health* **26**, 436-442.
- Li Q, Kobayashi M & Kawada T (2007) Organophosphorus pesticides induce apoptosis in human NK cells. *Toxicology* **239**, 89-95.
- Machera K, Tsakirakis A, Charistou A, Anastasiadou P & Glass CR (2009) Dermal exposure of pesticide applicators as a measure of overall performance under field conditions. *Ann Occup Hyg* **53**, 573-584.
- Marquer P, Pop I, Olsen O, Cardoso F, Ollier C, Dias A & Baudouin L (2009) *Agricultural statistics: Main results: 2007-08*: EUROSTAT.
- Mills KT, Blair A, Freeman LE, Sandler DP & Hoppin JA (2009) Pesticides and myocardial infarction incidence and mortality among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol* **170**, 892-900.
- Mladinic M, Kopjar N, Milic M, Dasovic AB, Huzak M & Zeljezic D (2010) Genomic instability in a healthy elderly population: a pilot study of possible cytogenetic markers related to ageing. *Mutagenesis* **25**, 455-462.
- Mohammad O, Walid AA & Ghada K (1995) Chromosomal aberrations in human lymphocytes from two groups of workers occupationally exposed to pesticides in Syria. *Environ Res* **70**, 24-29.
- Montgomery MP, Kamel F, Saldana TM, Alavanja MC & Sandler DP (2008) Incident diabetes and pesticide exposure among licensed pesticide applicators: Agricultural Health Study, 1993-2003. *Am J Epidemiol* **167**, 1235-1246.
- Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Stromberg U, Rossner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Sram RJ, Knudsen LE, Barale R & Fucic A (2006) Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res* **600**, 37-45.
- Nouira S, Abroug F, Elatrous S, Boujdaria R & Bouchoucha S (1994) Prognostic value of serum cholinesterase in organophosphate poisoning. *Chest* **106**, 1811-1814.
- Obe G & Herha J (1978) Chromosomal aberrations in heavy smokers. *Hum Genet* **41**, 259-263.
- Pathak R, Ahmed RS, Tripathi AK, Guleria K, Sharma CS, Makhijani SD & Banerjee BD (2009) Maternal and cord blood levels of organochlorine pesticides: association with preterm labor. *Clin Biochem* **42**, 746-749.
- Perry MJ (2008) Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm: a systematic review. *Hum Reprod Update* **14**, 233-242.
- Pimentel D (1995) Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* **8**, 17-29.
- Prista J & Uva AS (2003) Exposição profissional a agentes químicos: os indicadores biológicos na vigilância de saúde dos trabalhadores. *Revista Saúde & Trabalho* **4**, 5-12.
- Prista J & Uva AS (2006) A utilização de indicadores biológicos em Saúde Ocupacional. *Revista Portuguesa de Saúde Pública* **6**, 45-54.
- Purdue MP, Hoppin JA, Blair A, Dosemeci M & Alavanja MC (2007) Occupational exposure to organochlorine insecticides and cancer incidence in the Agricultural Health Study. *Int J Cancer* **120**, 642-649.
- Ramalho AT, Curado MP & Natarajan AT (1995) Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil. *Mutat Res* **331**, 47-54.
- Roma-Torres J, Teixeira JP, Silva S, Laffon B, Cunha LM, Mendez J & Mayan O (2006) Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat Res* **604**, 19-27.

- Rose F, Gargano N & Saez R (2003) Situação da Agricultura em Portugal, pp. 1-78: Comissão Europeia: Direcção-Geral da Agricultura.
- Rueff J, Gaspar J & Kranendonk M (2002) DNA polymorphisms as modulators of genotoxicity and cancer. *Biol Chem* **383**, 923-932.
- Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Vuyyuri SB, Danadevi K, Hussain SA & Grover P (2006) Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res* **609**, 74-80.
- Sanborn M, Cole D, Kerr K, Vakil C, Sanin LH & Bassil K (2004) Pesticides Literature Review. *The Ontario College of Family Physicians*, 188.
- Sanborn M, Kerr KJ, Sanin LH, Cole DC, Bassil KL & Vakil C (2007) Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors. *Can Fam Physician* **53**, 1712-1720.
- Scarpato R, Migliore L, Angotzi G, Fedi A, Miligi L & Loprieno N (1996) Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists: no evidence of DNA damage related to pesticide exposure. *Mutat Res* **367**, 73-82.
- Slager RE, Poole JA, LeVan TD, Sandler DP, Alavanja MC & Hoppin JA (2009) Rhinitis associated with pesticide exposure among commercial pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Occup Environ Med* **66**, 718-724.
- Soloneski S, Gonzalez M, Piaggio E, Apezteguia M, Reigosa MA & Larramendy ML (2001) Effect of the dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. I. Genotoxic evaluation on cultured human lymphocytes exposed in vitro. *Mutagenesis* **16**, 487-493.
- Song C, Kanthasamy A, Anantharam V, Sun F & Kanthasamy AG (2010) Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. *Mol Pharmacol* **77**, 621-632.
- Steenland K, Jenkins B, Ames RG, O'Malley M, Chrislip D & Russo J (1994) Chronic neurological sequelae to organophosphate pesticide poisoning. *Am J Public Health* **84**, 731-736.
- Steenenbergh P, van Amelsvoort L, Colosio C, Corsini E, Fustinoni S, Vergieva T, Zaikov C, Pennanen S, Liesivuori J & Van Loveren H (2008) Toxicological evaluation of the immune function of pesticide workers, a European wide assessment. *Hum Exp Toxicol* **27**, 701-707.
- Suman G, Naravani R & Jamil K (2006) In vitro cytogenetic studies of cypermethrin on human lymphocytes. *Indian J Exp Biol* **44**, 233-239.
- Teitelbaum SL, Gammon MD, Britton JA, Neugut AI, Levin B & Stellman SD (2007) Reported residential pesticide use and breast cancer risk on Long Island, New York. *Am J Epidemiol* **165**, 643-651.
- Therman E (1980) *Human chromosomes : structure, behavior, effects*. New York: Springer-Verlag.
- Viel JF & Challier B (1995) Bladder cancer among French farmers: does exposure to pesticides in vineyards play a part? *Occup Environ Med* **52**, 587-592.
- Vodicka P, Polivkova Z, Sytarova S, Demova H, Kucerova M, Vodickova L, Polakova V, Naccarati A, Smerhovsky Z, Ambrus M, Cema M & Hemminki K (2010) Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of newly diagnosed cancer patients and healthy controls. *Carcinogenesis* **31**, 1238-1241.
- Wang SS, Davis S, Hartge P, Cozen W, Severson RK, Cerhan JR & Rothman N (2008) Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 78-82.
- Wong KT & Ng TS (1984) Alleged paraquat poisoning in Perak. *Med J Malaysia* **39**, 52-55.

- World Health Organization & UNEP (1990) Public health impact of pesticides used in agriculture, pp. 128 p. Geneva: World Health Organization.
- Zeljezic D & Garaj-Vrhovac V (2001) Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis* **16**, 359-363.

ANEXOS

“Os pesticidas e a saúde no sector agrícola. Análise de dano genético.”

Declaração de Consentimento

Em reunião com o grupo de trabalho que pretende desenvolver o estudo em causa, fiquei informado sobre os objectivos e os métodos que serão utilizados, pelo que me considero esclarecido sobre a colaboração que me é pedida como participante.

Fui ainda informado que:

1 – A informação que fornecer ao responder ao questionário apresentado, bem como os resultados das análises que forem efectuadas sobre as amostras do meu sangue e urina, serão estritamente confidenciais. Assim que os procedimentos do estudo o permitam o questionário e os recipientes das amostras serão codificados e tornados anónimos, isto é, deixarão de poder ser relacionados com a minha identificação.

2- Todos os investigadores e técnicos que utilizem esses dados estão obrigados a segredo profissional, situação salvaguardada na Instituição através da assinatura da Declaração de Ética

3- Os resultados do estudo serão sempre apresentados numa base de grupo, pelo que nunca incluirão o meu nome ou qualquer elemento que permita a minha identificação.

Nestas condições, declaro que aceito participar no estudo, disponibilizando-me para:

1- Ser entrevistado e prestar informações sobre vários aspectos respeitantes a doenças de que tenha sofrido bem como a algumas características pessoais relevantes e história profissional;

2- Permitir a colheita de uma amostra de sangue e urina de acordo com o protocolo que me foi entregue.

A componente laboratorial do projecto realiza-se no Centro de Saúde Ambiental e Ocupacional da Delegação do Porto do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, sendo emitido um boletim que será enviado ao médico de família / delegado de saúde.

Data: ____/____/____

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

Código: _____

DSA, INSA Porto **QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL DE SAÚDE** Código _____

1. Data de nascimento _____

2. Sexo M F

3. Altura _____ m Peso _____ kg

4. Naturalidade _____

5. Localidade onde reside _____

6. Residiu/Reside perto de centrais eléctricas (cabos de alta tensão)?

Sim Não Não sabe

Se sim, a que distância e em que datas?

Distância _____ Datas _____

Actividade Profissional

6. Área de actividade _____

7. Há quanto tempo a exerce _____

8. Profissões anteriores	Período
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

9. Trabalha em

Estufas Ar livre Ar livre e estufas

Em que proporção?

10. Está envolvido na preparação de pesticidas?

Sim Não

11. Aplica pesticidas? Sim Não

12. Quando o aplicador entope usa o sopro para o desentupir?

Sim Não Às vezes

13. De um modo geral**a Lava as mãos depois das aplicações?**Sim Não **b Troca de roupa antes de sair do trabalho?**Sim Não **c Come, fuma ou bebe no local de trabalho?**Sim Não **d Leva roupa ou outros materiais expostos a pesticidas para casa?**Sim Não **e Lava separadamente a roupa que leva para casa?**Sim Não **14. Há quanto tempo foi o seu último contacto com pesticidas?** _____**15. Já sofreu alguma intoxicação por pesticidas?** Sim Não

Há quanto tempo? _____

Foi hospitalizado? Sim Não **16. Já se sentiu mal durante a aplicação de pesticidas?** Sim Não

Quais os sintomas? _____

_____**17. Tem actividades fora do local de trabalho onde contacta com produtos químicos?**Sim Não Que actividade e quanto tempo dispense por semana nessa actividade?
_____**HÁBITOS TABÁGICOS****18. É actualmente fumador?**Sim Não **19. Alguma vez fumou?**Sim Não **20. Se é ex-fumador**

Com que idade começou a fumar? _____ anos

Com que idade deixou de fumar? _____ anos

21. Se é fumador

Com que idade começou a fumar? _____ anos

Quantos cigarros fuma por dia? _____

22. Se é fumador passivo

Tem contacto regular durante duas ou mais horas com fumadores?

Sim Não **CONSUMO DE ÁLCOOL****23. Consome álcool regularmente?**Sim Não

nº de unidades/dia _____

Que tipo de bebida alcoólica bebe habitualmente? _____

(1 unidade = 1 caneca de cerveja, 1 copo de vinho ou 1 balão de aguardente)

OUTRAS INFORMAÇÕES**24. Tem alguma doença crónica?**Sim Não

Qual? _____

25. Recebeu alguma transfusão de sangue nos últimos 12 meses?Sim Não **26. Foi submetido a alguma cirurgia nos últimos 12 meses?** Sim Não

Especifique _____

27. Alguma vez fez um tratamento de quimioterapia ou radioterapia?Sim Não

Se sim, há quanto tempo? _____

27. A quantos raios X foi submetido nos últimos três anos? _____**28. Toma habitualmente alguma medicação?**Sim Não

Se sim, qual? _____

Casos de cancro na Família

--

Perfil Exposição/Risco			
Parâmetros a recolher			1. Número de identificação
2. Área tratada (ha)		5. Frequência de utilização (dia/ano)	
3. Taxa aplicação produto (Kg/ha)		6. Horas de trabalho/dia	
4. Concentração da substância activa no produto(g/kg)		7. nº de fanques aplicados por dia	
			8. cultura
			9. nº de trabalhadores
			10. volume da estufa X h
			m ² = h =
11. altura e densidade da cultura (m)		12. Formulação	
altura*		Grânulos solúveis H ₂ O	
densidade**		Pós molháveis	
		Líquido	
		Pó	
13. Nome comercial Pesticida			
14. Nome substância activa			
15. Frases de risco			
16. Actividade (% horas de trabalho)		17. EPI durante	
Mistura		Mistura	
Descarga		Descarga	
Aplicação		Aplicação	
Reentrada		Reentrada	
Manutenção		Manutenção	
18. Técnicas de aplicação			
Manual***		19. Formação operadores	
Tractor		Boa (vários cursos e/ou formações ao longo do tempo)	
		Média (1 curso aplicação pesticidas)	
		Suficiente (treino informal)	
		Nenhuma	
		20. Maquinaria	
		Sistema programado Computador	
		Polvilhador	
		Pulverizador baixa pressão	
		Turbina	
		Atomizador	
		Outro (especificar)	
19. Formação operadores			
20. Maquinaria			
18. Técnicas de aplicação			
17. EPI durante			
16. Actividade (% horas de trabalho)			
15. Frases de risco			
14. Nome substância activa			
13. Nome comercial Pesticida			
10. volume da estufa X h			
9. nº de trabalhadores			
8. cultura			
7. nº de fanques aplicados por dia			
6. Horas de trabalho/dia			
5. Frequência de utilização (dia/ano)			
4. Concentração da substância activa no produto(g/kg)			
3. Taxa aplicação produto (Kg/ha)			
2. Área tratada (ha)			
1. Número de identificação			
Instruções			
* altura = altura de cultura mesmo considerando o suporte em que pode estar colocada			
** densidade=distância entre duas filas de plantas			
*** estão incluídas aplicações com atomizador de dorso, pulverizador de dorso e carrinho de mão			
em caso de dúvidas ler instruções detalhadas no verso			
Notas			
DATA			