

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

U. PORTO



FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Avaliação do dano genético em linfócitos de
trabalhadores expostos a pesticidas através do teste de
micronúcleos**

Joana Tavares Neves

Dissertação de Mestrado em Contaminação e Toxicologia
Ambientais

2010

Joana Tavares Neves

**Avaliação do dano genético em linfócitos de trabalhadores
expostos a pesticidas através do teste de micronúcleos**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre
em Contaminação e Toxicologia Ambientais
submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas
de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor João Paulo Teixeira

Categoria – Investigador auxiliar do
Departamento de Saúde Ambiental e
Ocupacional

Afiliação – Instituto Nacional de Saúde
Dr. Ricardo Jorge, I.P.

Resumo

O consumo crescente de produtos fitofarmacêuticos utilizados mundialmente é considerado cada vez mais como um potencial perigo para a saúde pública. Alguns destes compostos são reconhecidos como genotóxicos e mutagénicos, podendo também provocar diversos efeitos nefastos na saúde, inclusive doenças cancerígenas. Apesar da exposição afectar a população em geral, existem grupos, como os trabalhadores agrícolas, que são considerados grupo de risco uma vez que acabam por estar mais expostos durante as suas actividades laborais. Neste estudo foram analisados os efeitos da exposição ocupacional numa população de 60 agricultores residentes nas zonas de Póvoa do Varzim e Esposende e comparados com uma população controlo com as mesmas dimensões e características demográficas. A análise citogenética utilizada foi o teste dos micronúcleos (MN) em linfócitos de sangue periférico. Os resultados obtidos demonstram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) na frequência de MN entre os grupos estudados: o grupo exposto apresenta: $8,30 \pm 0,50$ e o grupo controlo: $2,35 \pm 0,23$. Sexo, idade e hábitos tabágicos não demonstraram efeito significativo. Também, as características relativas aos hábitos laborais não foram significativamente diferentes, notando-se no entanto um incremento na frequência de MN nos indivíduos que aplicam os pesticidas e também nos indivíduos que não utilizam o equipamento de protecção individual (EPI). Foi aplicado ao grupo exposto um modelo de avaliação de risco em que os resultados revelam uma possível sobrevalorização do índice de toxicidade do produto no cálculo do perfil de risco atribuído aos indivíduos, descurando outros parâmetros também importantes. Os dados obtidos permitem uma melhor caracterização da exposição ocupacional a pesticidas em Portugal e pode ser utilizado como ferramenta no incremento das medidas de segurança quanto a hábitos laborais nas explorações agrícolas.

Abstract

The growing consumerism of pesticides used all over the world is increasingly regarded as a potential danger for the public health. Some of these compounds are recognized as genotoxic and mutagenic ones, can also cause several adverse effects in health, including cancer diseases. Although this exposition affects the population in general, there are groups, like the agricultural workers, that are considered group of risk since they have a larger exposition during their working activities. In this study the effects of occupational exposition were analyzed in a population of 60 agricultures living in Póvoa do Varzim and Esposende and compared with a control population with the same size and demographic features. The cytogenetic analyses used was the test of micronucleus (MN) in lymphocytes in peripheral blood. The obtained results showed a statistically significantly difference ($p < 0,001$) in the frequency of MN among the studied groups: the exposed group presented 8.30 ± 0.50 and the control group 2.35 ± 0.23 . Sex, age and smoking habits don't show a significant effect. The features related to working habits weren't also significantly different, verifying nevertheless an increasing of frequency of MN in the individuals who apply the pesticides and also in the individuals who don't use the individual protection equipment (EPI). It was administrated to the exposed group a model of risk assessment where the results reveal a possible overvaluation of the indication of toxicity index in the measurement of the risk profile assigned to the individuals, neglecting also other equally important parameters. The obtained results allow a better characterization of occupational exposition to pesticides in Portugal and can be used as a tool in the increase of security measures related to working habits in agricultural exploitations.

Agradecimentos

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento.

Agradeço ao Doutor João Paulo Teixeira, pela disponibilidade em todos os momentos, pela exigência de método e rigor e pela incansável orientação científica que contribuíram significativamente para a qualidade deste trabalho.

Um agradecimento especial à Doutora Carla Costa, pela revisão crítica do texto, pelos esclarecimentos, sugestões e pela acessibilidade, cordialidade e simpatia demonstradas.

A todos os elementos do Departamento de Saúde Ambiental e Ocupacional, pela simpatia e apoio, em particular à Doutora Solange, à Doutora Patrícia e à Doutora Susana pelo permanente estímulo e apoio laboratorial e científico que permitiram o enriquecimento deste trabalho.

Gostaria também de agradecer à Professora Fátima, pela revisão e pelos conselhos preciosos.

Deixo uma nota de agradecimento aos meus colegas de Mestrado Carolina e Ana pelo companheirismo e amizade e aos meus amigos Elisabete, Marta, Teresa, Maria João, André, Tiago e Joana pelo incentivo e preciosa presença em tantos momentos.

Agradeço sobretudo à minha família, pais e irmão e ao meu namorado João por me acompanharem em mais uma jornada, sempre com um sorriso, amor e compreensão inestimáveis.

ÍNDICE

	Pag.
Lista de abreviaturas	xi
Índice de tabelas	xii
Índice de figuras	xiii

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Evolução da agricultura no mundo	3
1.2 A agricultura na Europa e em Portugal	5
1.3 O conceito de produto fitofarmacêutico	8
1.4 Contaminação ambiental	11
1.5 Exposição humana a pesticidas	13
1.5.1 Exposição da população geral	13
1.5.2 Exposição ocupacional	14
1.6 Avaliação da exposição	20
1.6.1 Monitorização ambiental	20
1.6.2 Monitorização biológica	21
1.6.2.1 Biomarcadores	22
1.6.2.1.1 Biomarcadores de exposição	23
1.6.2.1.2 Biomarcadores de susceptibilidade	24
1.6.2.1.3 Biomarcadores de efeito	24
1.7 Teste do Micronúcleo	25
1.7.1 Formação e destino dos MN	25
1.7.2 Teste de MN como biomarcador de efeito	27
1.7.3 Vantagens e desvantagens da técnica	28
1.7.4 Associação entre a frequência de MN e o cancro	29
1.8 Objectivo	31

2.METODOLOGIA	33
2.1 População em estudo e recolha da amostra biológica	35
2.2 Análise citogenética: Teste do micronúcleo	36
2.2.1 Cultura celular de linfócitos	36
2.2.2 Fixação e coloração	37
2.2.3 Contagem de células binucleadas e micronúcleos	37
2.3 Análise do perfil risco-exposição	38
2.4 Análise estatística	39
3.RESULTADOS	41
3.1 Caracterização da população	43
3.1.1 Dano genético nos grupos controlo e exposto	45
3.1.2 Influência do género	47
3.1.3 Influência da idade	49
3.1.4 Influência dos hábitos tabágicos	51
3.2 Características do local e de hábitos de trabalho	53
3.2.1 Local de trabalho	53
3.2.2 Preparação e aplicação de pesticidas	55
3.2.3 Utilização de equipamento de protecção individual	57
3.3 Índice de toxicidade do pesticida utilizado	58
3.4 Relação perfil de risco com a frequência de MN	59
4.DISSCUSSÃO DOS RESULTADOS	61
5.CONCLUSÃO	71
BIBLIOGRAFIA	75
ANEXOS	84

Lista de abreviaturas

AC	Aberrações Cromossómicas
ADN	Ácido desoxirrinucleico
BrdU	5-bromodeoxiuridina
CBPI	<i>Cytokinesis-block Proliferation Index</i> (índice de proliferação de bloqueio de citocinese)
CEE	Comunidade Económica Europeia
CBMN	<i>Cytokinesis-block micronucleus</i> (Teste do MN por bloqueio da citocinese)
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DP	Desvio padrão
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos da América)
EPI	Equipamento de protecção individual
EUA	Estados Unidos da América
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (soro fetal bovino)
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (Hibridização <i>in situ</i> de fluorescência)
HUMN	<i>Human Micronucleus project</i> (Projecto de Micronúcleos Humanos)
ICPS	<i>International Centre for Pesticide and Health Prevention</i> (Centro Internacional de Pesticidas e Prevenção da Saúde)
IEH	<i>Institute for Environment and Health</i> (Instituto para o Ambiente e Saúde, Reino Unido)
IU	<i>International units</i> (unidades internacionais)
INE	Instituto Nacional de Estatística, Portugal
L	Litro
MI	Mililitro
MN	Micronúcleo
nm	Nanómetros
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OMS	Organização Mundial de Saúde
Rpm	Rotações por minuto
SCE	<i>Sister Chromatid Exchange</i> (Troca entre cromátídeos irmãos)
SE	<i>Standard error mean</i> (estimativa do erro padrão da média)
Trl	<i>Training Indicator</i> (Indicador de formação)
UI	<i>Use Indicators</i> (indicadores de utilização)

Índice de tabelas

Tab.		Pag.
1	Exemplos de grupos principais de pesticidas segundo a espécie-alvo e grupo químico da substância activa.	9
2	Factores utilizados na avaliação de risco.	38
3	Índices de risco dos produtos fitofarmacêuticos.	39
4	Características da população em estudo.	43
5	Valores médios de MN nos grupos controlo e exposto.	45
6	Valores médios de MN nos grupos exposto e controlo segundo o género.	47
7	Valores médios de MN nos grupos exposto e controlo segundo a idade.	49
8	Valores médios de MN nos grupos exposto e controlo segundo o efeito de hábitos tabágicos.	51
9	Valores médios de MN no grupo exposto consoante o seu local de trabalho.	53
10	Valores médios de MN no grupo exposto segundo o envolvimento dos indivíduos na preparação e/ou aplicação do pesticida.	55
11	Valores médios de MN no grupo exposto segundo a utilização de equipamento de protecção individual.	57
12	Valores médios de MN no grupo exposto segundo o índice de toxicidade associado ao pesticida utilizado.	58
13	Valores médios de MN no grupo exposto segundo o perfil de risco associado a cada indivíduo.	60

Índice de figuras

Fig.		Pag.
1	Venda de produtos fitofarmacêuticos em Portugal, por tipo de função - adaptado de INE (2009b).	6
2	Figura: A evolução do consumo de pesticidas em 21 países da OCDE entre 1990 e 2006 - adaptado de OCDE (2009).	7
3	Principais processos - adsorção, transferência e degradação - que ocorrem aos pesticidas no ambiente - adaptado de Fishel (1991).	12
4	Grupos de populações humanas em risco - adaptado de Wong, (1984).	15
5	Factores internos e externos que condicionam a susceptibilidade do individuo a possíveis agentes genotóxicos - adaptado de Perera (1997).	21
6	Monitorização ambiental e monitorização biológica com os três tipos de biomarcadores utilizados - adaptado de Institute for Environment and Health (1996).	23
7	Célula binucleada com um MN (ampliação de 500x, ocular: 12.5x; objectiva: 40x).	26
8	Diagrama esquemático da formação de MN (A) a partir de um fragmento acêntrico e de um cromossoma inteiro que sofreu um atraso durante a ascensão aos pólos, em (B) a formação de pontes núcleoplasmáticas a partir de pontes dicêntricas - adaptado de Fenech (1997).	27
9	Teste do MN, através do bloqueio da citocinese - adaptado de Fenech (2005).	30
10	Percentagem de trabalhadores agrícolas distribuídos pelos locais de trabalho - estufas, ar livre e armazém.	44

- 11 Percentagem de trabalhadores agrícolas distribuídos pela actividade que exercem – preparação e aplicação. 44
 - 12 Distribuição das frequências de MN nos grupos controlo e exposto (* $p < 0,001$). 45
 - 13 Distribuição das frequências de MN nos grupos controlo e exposto em diferentes classes de dano genético. 46
 - 14 Distribuição das frequências de MN nos grupos controlo e exposto de acordo com o género. 48
 - 15 Distribuição da frequência de MN presentes nas populações controlo e exposta, segundo a faixa etária dos indivíduos. 50
 - 16 Distribuição das frequências de MN nos grupos controlo e exposto de acordo com os hábitos tabágicos. 52
 - 17 Distribuição da frequência de MN presentes na população exposta, segundo o local de trabalho, estufas, ar livre e armazém. (Barras de erro indicativas de SE). 54
 - 18 Distribuição da frequência de MN nos indivíduos do grupo exposto segundo as suas funções na exploração agrícola. (Barras de erro indicativas de SE). 56
 - 19 Distribuição da frequência de MN presentes na população exposta de acordo com a utilização de equipamento de protecção individual. (Barras de erro indicativas de SE). 57
 - 20 Associação entre a frequência de MN no grupo exposto e o índice de toxicidade do pesticida utilizado. (Barras de erro indicativas de SE). 59
 - 21 Associação entre a frequência de MN no grupo exposto e o perfil associado de risco. (Barras de erro indicativas de SE). 60
-

Introdução

1.1 Evolução da agricultura no mundo

A vida dos primeiros seres humanos é um desafio constante pela sobrevivência. Dependentes da natureza, as primeiras comunidades humanas vivem da recollecção de alimentos, tornando-se assim comunidades nómadas.

A descoberta da agricultura corresponde a um enorme progresso: o Homem tenta dominar a natureza, tornando-se produtor e “logo” excedentário. A história da agricultura torna-se então a base da civilização moderna. O seu aparecimento é datado em registos arqueológicos com cerca de 12 mil anos, correspondente ao período neolítico.

As principais áreas agrícolas estariam dispersas pela superfície terrestre mas focalizadas nos vales dos grandes rios como o Nilo no Egipto, o Tigre e o Eufrates na Mesopotâmia e o rio Amarelo na China.

Por muitos considerada a maior descoberta Humana, a verdade é que a agricultura transformou por completo a evolução do Homem promovendo a passagem de hábitos de nomadismo (caçadores/recolectores) para hábitos de sedentarismo, o que levou à criação de aglomerados populacionais permanentes ou semi-permanentes: surgindo os primeiros aldeamentos.

A necessidade de fixação para vigiar as culturas faz surgir as primeiras cidades (pensa-se que a primeira terá surgido na Turquia, Çatalhöyük, em 6500 a.C.).

O cultivo de áreas em sistemas de monocultura levou ao aparecimento de doenças e pragas que se tornaram objecto de controlo por parte dos primeiros agricultores. Provavelmente os primeiros mecanismos que actuavam contra estas pestes seriam resultado do conhecimento que o Homem tinha da natureza envolvente. Fazia, portanto, uso das interacções biológicas entre organismos como é exemplo o parasitismo, predação, competição, entre outras.

As primeiras substâncias químicas usadas para controlo de pestes terão sido o mercúrio, enxofre e extractos de plantas como a nicotina e piretro (Newman, 1979).

Na Idade Média a agricultura era já considerada como a base económica da sociedade de então. A invenção de novos instrumentos como o arado e a enxada de ferro, entre outros, permitiu a expansão das áreas de cultivo e conseqüentemente o desenvolvimento do comércio. São utilizadas substâncias misturadas com carbonato de cálcio que funcionam como fertilizante quando aplicadas na camada superior do solo.

A Revolução Industrial começou desde cedo a permitir a aplicação da tecnologia moderna às práticas agrícolas. A produtividade das colheitas aumentava assim com recurso a meios mecânicos e à adição de fertilizantes e pesticidas que respondiam às necessidades de um solo esgotado em nutrientes e cada vez mais sujeito a pestes.

As duas Grandes Guerras Mundiais tiveram um efeito significativo na passagem da agricultura chamada tradicional para a agricultura industrializada.

No final da Primeira Guerra Mundial, as empresas produtoras de explosivos depararam-se com uma capacidade excedentária que se virou maioritariamente para a produção de produtos fitofarmacêuticos (Mendes, 2002).

A contribuição da Segunda Guerra Mundial para a industrialização da agricultura teve a ver com a difusão da denominada política de “ajuda alimentar” promovida pelos Estados Unidos da América (EUA). Concomitantemente com tal política solidária, é exportado o seu modelo de produção animal. Esta produção é levada a cabo com base em rações de cereais e proteaginosas; a exigência de produção favoreceu o sistema de monocultura em grande escala.

O aparecimento dos primeiros pesticidas sintéticos ocorreu nos anos 40 do século XX com a produção do diclorodifeniltricloroetano (DDT), conhecido pelas suas propriedades insecticidas (foi largamente aplicado na Segunda Guerra Mundial para combate a parasitas).

A publicação, em 1962, do livro “*Silent Spring*” de Rachel Carson marcou significativamente a forma como seria tratada a introdução de novos químicos no ambiente (Queiroz, 2005)

Foi graças aos alertas que a obra apresentava quanto ao carácter persistente do DDT no meio ambiente e o efeito carcinogénico em organismos vivos, que o produto foi retirado do mercado¹; a sua aplicação é proibida, sob grande polémica, provocada pelos prejuízos decorrentes para as grandes companhias produtoras.

A publicação da obra citada marca o início de uma consciência mais ecológica, que reforça posturas anteriores resultantes da observação de fenómenos até então mais raros (a resistência de determinadas espécies, pragas tardias e efeitos toxicológicos observados na biota).

¹ Foi, no entanto, em 2006 aceite pela Organização Mundial de Saúde a sua aplicação, como forma mais eficaz e económica de combate à malária.

A partir deste momento passaram a ser obrigatórios os registos de pesticidas e surgiram pela primeira vez regulamentos para a sua aplicação.

1.2 A agricultura na Europa e em Portugal

Na Europa, aquando da assinatura do Tratado de Roma, em 1957, a agricultura foi erigida pelos estados membros fundadores da Comunidade Económica Europeia como a primeira prioridade na construção do futuro Mercado Comum. O objectivo específico era o aumento da sua produtividade recorrendo ao desenvolvimento do progresso técnico (Cunha, 1996).

Portugal sempre teve uma ligação muito próxima à agricultura. Com a adesão à União Europeia (1986) a agricultura foi vista, como o “petróleo verde”.

Apesar de este sector apresentar um cada vez menor impacto na economia nacional, sob o ponto de vista Europeu, Portugal é dos países em que a agricultura tem grande importância (Rose *et al.*, 2003).

Dados do Instituto Nacional Português de Estatística (INE) (Instituto Nacional De Estatística, 2009a), referem um aumento do nível de especialização das explorações associado a uma maior produção de géneros agrícolas. Por outro lado explorações com rendimentos muito baixos têm vindo a decrescer.

As explorações de produção vegetal são em maior número, quando comparadas com as de produção animal e como tal, Portugal produz em maior quantidade cereais (milho, trigo), frutos (citrinos, pêra, maçã), produtos hortícolas frescos e vinho.

A mesma fonte indica um aumento exponencial nas explorações de agricultura biológica desde os anos 90: os apoios estatais à conversão para este modo de produção, bem como as condições mais favoráveis dos preços de mercado que atraem o produtor, tanto mais quanto se verifica uma crescente procura por parte dos consumidores. Uma vez que este tipo de produção não apresenta a rentabilidade da agricultura tradicional, a maioria das explorações recorre ainda ao uso de produtos fitofarmacêuticos.

Em 2007, assistiu-se a um acréscimo anual das quantidades vendidas de produtos fitofarmacêuticos, com cerca de 17 mil toneladas expressas em substância activa, traduzindo um acréscimo de 6% em relação ao ano de 2006. Como se pode ver pela figura 1, os fungicidas representaram 68% do total das vendas com cerca de 12kton, seguidos dos herbicidas com 13% correspondentes a 2kton, evidenciando face a 2005,

uma taxa média anual de crescimento de 7%. Por último os insecticidas representaram 7,6%, cerca de 1272t, registando também um aumento de taxa média anual de 9% face a 2005 (Instituto Nacional De Estatística, 2009b). É importante referir que o valor elevado que os fungicidas apresentam se deve ao facto de estar incluído nesta estatística o composto enxofre que representa 78% do total deste grupo e é considerado um pesticida natural, normalmente utilizado como fertilizante e correctivo do solo (Direcção Geral Do Ambiente, 2000).

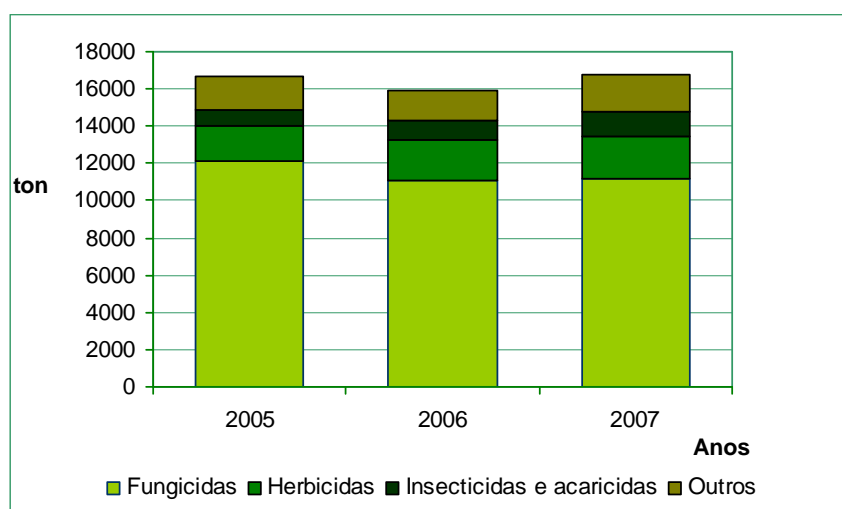


Figura 1: Venda de produtos fitofarmacêuticos em Portugal, por tipo de função - adaptado de INE (2009b).

Segundo o Relatório Estatístico da Agricultura de 2009 do EUROSTAT (Marquer *et al.*, 2009), Portugal gasta em média 75 euros/hectare em produtos fitofarmacêuticos, um valor mais elevado do que a média Europeia que se situa nos 53 euros/hectare. Outros dados, da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), revelam que, apesar da entrada em vigor da Directiva 91/414/CEE² que visa a reavaliação e a redução dos riscos dos pesticidas, Portugal assistiu a um aumento de 103% no consumo destes produtos. Como se pode ver na figura 2, em 17 anos (1990-2006), Portugal destaca-se isolado no conjunto de 21 países da OCDE.

² Directiva 91/414/CEE do Conselho, de 15 de Julho de 1991, relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Jornal Oficial nº L 230 de 19/08/1991 pp.1-32.

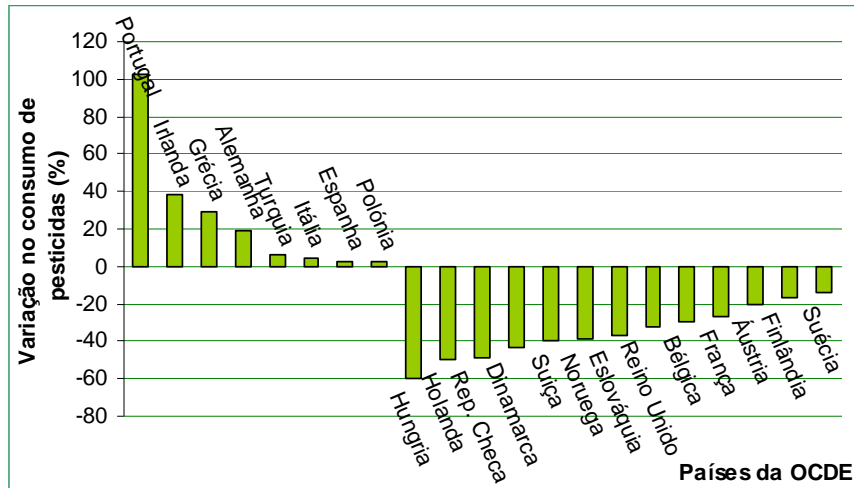


Figura 2: A evolução do consumo de pesticidas em 21 países da OCDE entre 1990 e 2006 - adaptado de OCDE (2009).

Em 2009, o INE disponibilizou os indicadores agro-ambientais, utilizados entre 1989 e 2007 (estes pretendem identificar, quantificar e avaliar tendências das interações mais significativas entre a agricultura e o meio ambiente).

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 ao combate a práticas agrícolas poluidoras e a sistemas de poluição.

Por outro lado, neste estudo são ainda referidos indicadores positivos que colocam Portugal, no âmbito 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 (Instituto Nacional De Estatística, 2009a).

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

1.3 O conceito de produto fitofarmacêutico

Pesticidas ou produtos fitofarmacêuticos são compostos biologicamente activos de origem natural ou sintética, constituídos por uma substância ou um conjunto de substâncias. Têm o propósito de prevenir, eliminar, ou repelir uma espécie considerada peste, nas explorações agrícolas. É também considerado pesticida, pela Agência de Protecção Ambiental dos EUA (EPA), qualquer substância ou mistura aplicada com a função de regular o crescimento vegetal, provocar desfoliação e dessecação.

Os pesticidas formam o maior grupo de substâncias venenosas intencionalmente introduzidas no ambiente (Sailaja *et al.*, 2006). São usados maioritariamente na agricultura com o propósito de aumentar a produtividade das culturas e apenas 2% são usados para outros fins, como aplicações no interior de habitações e como forma de controlar a transmissão de doenças por vectores (Eurostat, 2001).

A sua toxicidade nos diferentes elementos da biota tem vindo a ser reportada desde cedo mesmo em espécies não consideradas como pestes. Isto acontece uma vez que a maioria dos pesticidas utilizados são não-específicos e como tal, espécies com sistemas biológicos similares são alvo da acção do pesticida. Na maioria dos casos, a margem de segurança para os seres humanos reside apenas na maior proporção da massa corporal (Keifer, 2000).

A classificação dos pesticidas é feita de duas formas possíveis, pelo tipo de espécie-alvo ou de acordo com as propriedades químicas do seu ingrediente activo. Na tabela 1 é possível observar um resumo dos pesticidas existentes no mercado de acordo com as estas formas de classificação.

Tabela 1: Exemplos de grupos principais de pesticidas segundo a espécie-alvo e grupo químico da substância activa.

Classificação de pesticidas	
De acordo com a espécie alvo	De acordo com a substância activa
Insecticidas	Organoclorados
Acaricidas	Organofosforados
Moluscicidas	Carbamatos
Rodenticidas	Piretróides
Fungicidas	Arsénicos
Nematocidas	Organometálicos
Herbicidas	Tiocarbamatos
Reguladores de crescimento	Triazinas
Anti-abrolhantes	Dinitrocompostos

De acordo com a EPA, os principais grupos de pesticidas são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. A distinção entre estes produtos tem por base as propriedades químicas do pesticida e/ou a derivação de um método de produção comum.

De seguida, apresenta-se um resumo sobre alguns destes grupos químicos de pesticidas evidenciando o seu grupo-alvo, características físico-químicas bem como alguns dos efeitos nocivos que podem provocar.

- Os **organoclorados** são maioritariamente compostos que têm propriedades insecticidas, apresentam grande persistência no solo e elevada toxicidade para artrópodes. São compostos relativamente insolúveis e com baixa volatilidade. Devido ao seu carácter lipofílico tendem a acumular-se nos tecidos vivos e a movimentar-se através da cadeia alimentar (Edwards, 1993).

A exposição a este grupo de pesticidas pode levar a efeitos crónicos nefastos no sistema nervoso central e periférico, alterações no funcionamento normal do fígado e do sistema reprodutor.

O DDT, anteriormente mencionado, é um exemplo deste tipo de pesticidas.

- Os **organofosforados** vieram gradualmente substituir os anteriores organoclorados por apresentarem menor risco para o ambiente devido ao seu carácter mais selectivo. São normalmente usados como insecticidas e reguladores de crescimento vegetal.

Apesar de serem mais facilmente degradados, são responsáveis por um elevado número de intoxicações agudas (Sanches *et al.*, 2003). São inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase (enzima envolvida em fenómenos de neurotransmissão) e os sintomas de intoxicação podem passar por um aumento no lacrimejar, salivação, broncoconstrição, diarreias, bradicardia e taquicardia, hipertensão, tremores, paralisia e enfraquecimento dos músculos, entre outros.

- Os **carbamatos** são os pesticidas mais usados para combate a insectos, nemátodes, ácaros e fungos. Apresentam maior persistência no solo que os organofosforados e uma toxicidade pouco selectiva quanto a espécies-alvo (Edwards, 1993).

Os efeitos provocados pela sua exposição são similares aos descritos para os organofosforados, no entanto a inibição da acetilcolinesterase neste caso, é reversível tornando os efeitos com menor intensidade e duração (Cecchine *et al.*, 2000).

- Os **piretróides** têm propriedades insecticidas com baixa persistência no meio ambiente, normalmente são degradados por acção da luz, e apresentam baixa toxicidade nos mamíferos (Moretto e Lotti, 2004). Os seus efeitos mais recorrentes são lesões na derme.

1.4 Contaminação ambiental

Estima-se que todos os anos sejam aplicados 2,5 milhões de toneladas de pesticidas em explorações agrícolas, em todo o mundo. A quantidade de pesticida que entra em contacto directo ou é consumido pela espécie-alvo é considerada mínima. Estudos realizados mostram que apenas 0,3% da quantidade total aplicada chega a cumprir o seu propósito (Pimentel, 1995). Todo o restante produto é perdido no meio ambiente e como tal, capaz de afectar outras espécies e a saúde pública.

No momento em que o pesticida é lançado ao meio ambiente é sujeito à acção de processos físicos, químicos ou biológicos. Para avaliar e minimizar os seus efeitos nefastos e construir um programa de risco ambiental é importante compreender os processos pelos quais estes compostos são afectados.

O impacto de um pesticida no ambiente depende do método de aplicação e capacidade de dispersão assim como a concentração aplicada e as suas propriedades toxicológicas características (Emans *et al.*, 1992). A sua dispersão e persistência vão também depender de factores intrínsecos ao próprio ambiente como seja o tipo de vegetação, características do solo e factores climáticos (Abrantes *et al.*, 2006). A sua persistência no meio pode provocar a contaminação de águas subterrâneas e superficiais, solos e ar.

Diversos processos podem determinar o comportamento do pesticida no solo (Fishel, 1991; Werf e Hayo, 1996) tais como:

- a) degradação por microorganismos no solo;
- b) degradação química, como por exemplo a hidrólise;
- c) adsorção e ligação a componentes minerais e orgânicos do solo;
- d) adsorção pelas raízes de plantas;
- e) volatilização;
- f) diluição.

Estes processos, presentes na figura 3, podem ser resumidos em três grupos principais: adsorção, transferência e degradação.

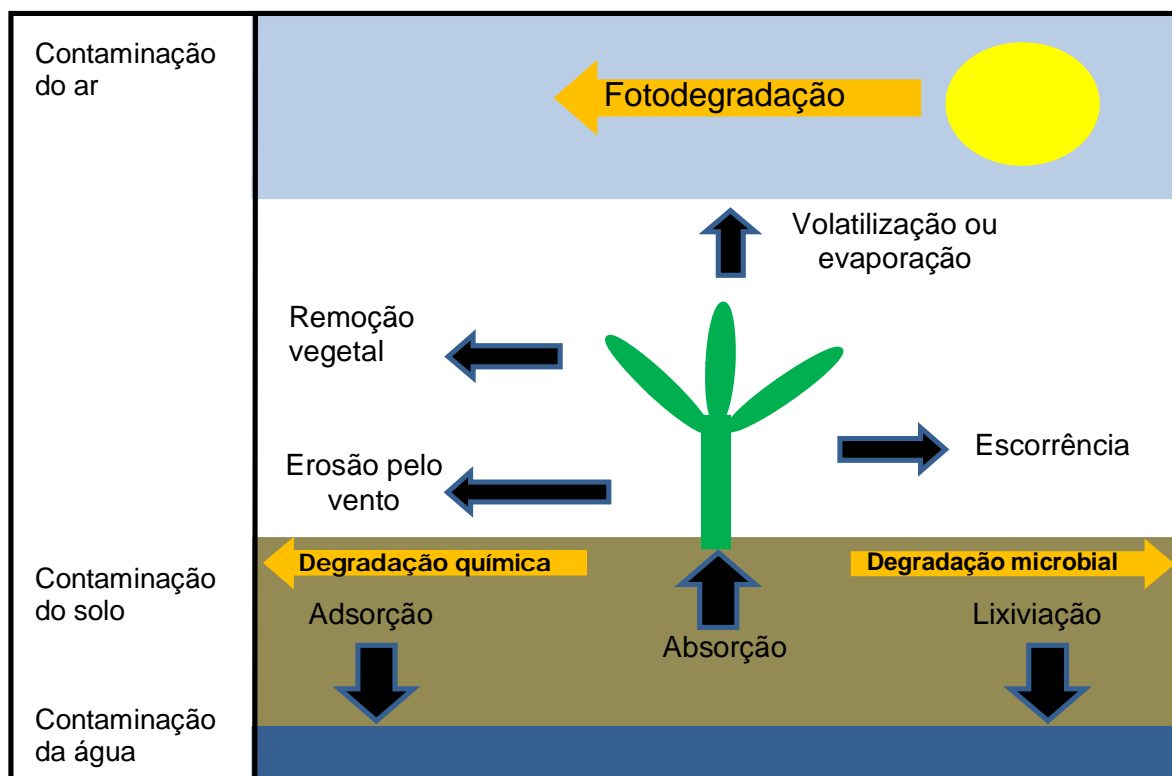


Figura 3: Principais processos - adsorção, transferência e degradação - que ocorrem aos pesticidas no ambiente - adaptado de Fishel (1991).

A adsorção tem que ver com a ligação do composto às partículas do solo, estima-se que entre 20 a 70% do pesticida aplicado ou os seus metabolitos fiquem retidos na fracção coloidal do solo (Calderbank, 1989). As características do solo vão condicionar esta ligação: solos com maior quantidade de matéria orgânica tendem a adsorver mais químicos enquanto que solos encharcados necessitam de maior quantidade de pesticida para produzir o mesmo efeito, uma vez que as partículas de água vão competir com as do pesticida.

Outra forma de adsorção é através das raízes de plantas, onde uma porção significativa do pesticida é retido. Assim, a comunidade vegetal torna-se a principal fonte de bioacumulação na cadeia alimentar e um foco de exposição para humanos e animais (Paterson *et al.*, 1990).

A transferência de um pesticida pode ocorrer através da volatilização, escorrência, lixiviação, fenómenos de absorção e remoção das colheitas. A volatilização é apontada como a maior causa de perda de pesticida na área onde este é aplicado. A taxa desta perda normalmente excede a perda através dos fenómenos de lixiviação, escorrência ou degradação química (Taylor e Spencer, 1990).

A transformação do pesticida líquido ou sólido em vapor é influenciada pelas características do solo que podem ter maior ou menor capacidade de adsorção mas também pelas condições climáticas como a temperatura, humidade e vento.

Fenómenos como escorrência e lixiviação ocorrem devido à água das chuvas ou de irrigação e traduzem-se na principal via de dispersão do pesticida nas águas subterrâneas e superficiais.

Por último, a degradação destes compostos fitofarmacêuticos pode ocorrer através da sua decomposição natural por reacções químicas, por acção de microrganismos ou por fotodegradação.

No primeiro caso, a reacção mais comum é a hidrólise, onde o pesticida é decomposto em metabolitos mais simples. Estas reacções químicas são condicionadas pela temperatura, pH, e humidade. Do mesmo modo, a degradação através de microrganismos é influenciada por estes factores, uma vez que controlam o crescimento e actividade destas comunidades microbianas.

A fotodegradação ocorre enquanto o pesticida se encontra exposto ao ar, na superfície do solo ou nas folhas das plantas, por acção da luz solar. O processo é condicionado pela intensidade luminosa e método de aplicação do produto.

1.5 Exposição humana a pesticidas

1.5.1 Exposição da população geral

Nos anos mais recentes, os países europeus têm adoptado medidas e criado legislação tendo em vista a crescente necessidade de protecção ambiental e da saúde pública. Desta forma, a introdução de novos químicos no Mercado Europeu é altamente controlada.

A Directiva 91/414/CEE, em vigor desde Julho de 1993, com o propósito de redução dos riscos associados ao uso de pesticidas agrícolas levou a uma redução de 26% dos 1004 produtos comercializados na União Europeia (Amaro, 2009).

Mais recentemente, (Janeiro de 2009) o Parlamento Europeu aprovou o *Regulamento de Colocação dos Pesticidas Agrícolas no Mercado*: adicionou-se a exigência de que sejam apenas comercializados pesticidas cuja avaliação de risco seja acordada a nível comunitário ou internacional.

Estes esforços da Comunidade Europeia têm-se traduzido na comercialização de produtos com tendência a uma menor toxicidade e persistência no meio. No entanto, a utilização de pesticidas é global e como tal, torna-se quase impossível que o indivíduo comum não esteja exposto a diferentes níveis de produtos fitofarmacêuticos ao longo da sua vida (Morgan, 1992).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram 3 milhões de casos de envenenamento por pesticida, todos os anos em todo o mundo; destes 220 000 são fatais (World Health Organization, 1990).

Alimentos contaminados, água e ar são as principais fontes de exposição para as populações, no entanto existem outras menos comuns como são as aplicações no interior das habitações e a proximidade com áreas agrícolas tratadas.

Os alimentos comercializados hoje em dia são sujeitos a monitorizações de qualidade, seguindo guias internacionais standardizados, controlando assim a presença de resíduos de pesticidas e evitando riscos para a saúde pública. No entanto e apesar de nestes casos os riscos de efeitos tóxicos agudos não ocorrerem com frequência, estão associados diversos tipos de cancros resultantes de uma exposição crónica a diferentes grupos de pesticidas, como triazinas e arsénicos (Blair, 1990; Blair e Zahm, 1990; Zahm e Blair, 1992).

A via de exposição mais comum para a população geral é a ingestão oral (voluntária ou não) enquanto que na exposição ocupacional, a inalação e/ou exposição dérmica são as mais usuais (Lifshitz *et al.*, 1999).

1.5.2 Exposição ocupacional

Apesar de a população em geral estar exposta a pesticidas, é na população exposta a estes compostos de forma ocupacional que o risco de intoxicação aguda e crónica está mais presente. Esta exposição inclui os processos de produção do composto assim como o seu uso corrente para controlo de pragas (Costa, 2008).

A figura 4 apresenta um diagrama esquemático com diferentes grupos de população humana exposta e cujo risco está avaliado na dose e tempo de exposição a pesticidas.

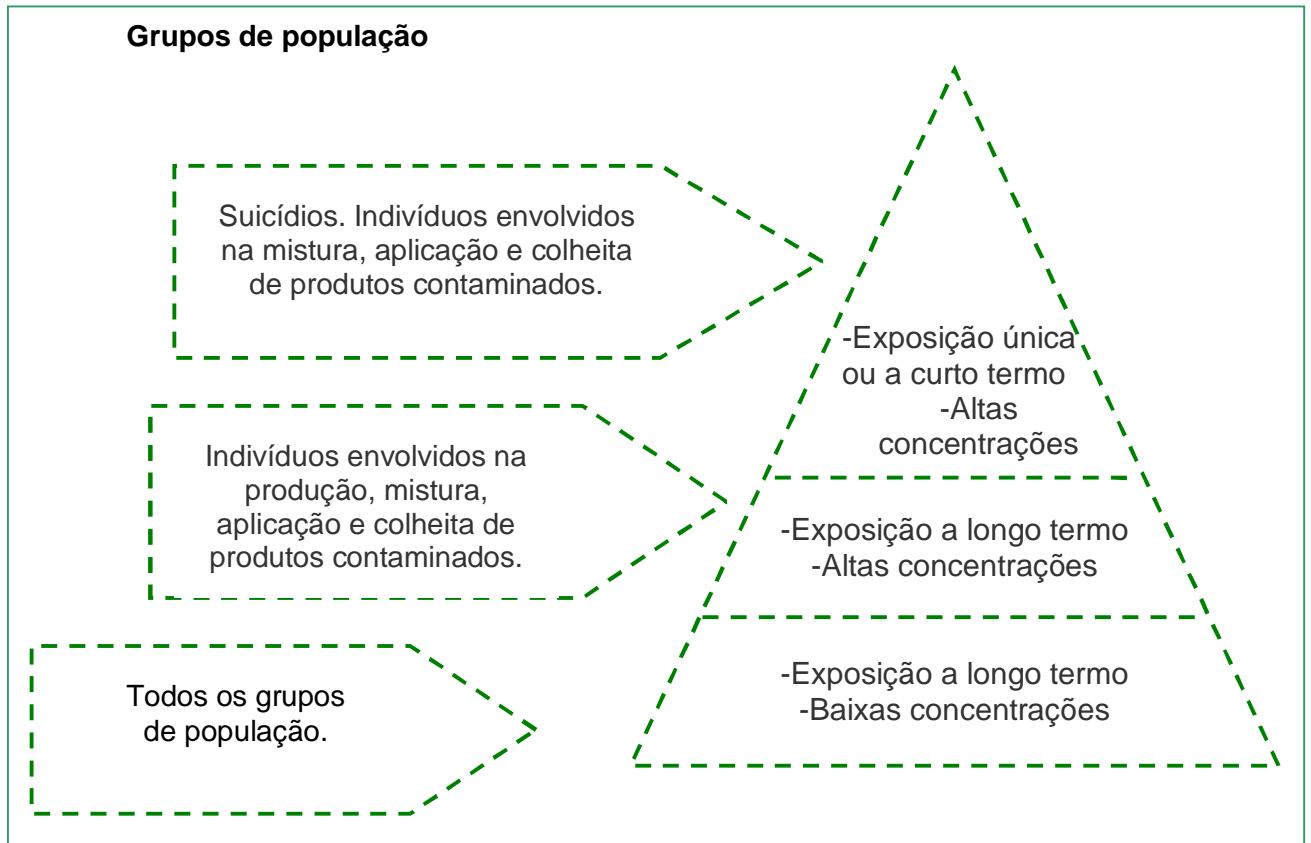


Figura 4: Grupos de populações humanas em risco - adaptado de Wong, (1984).

O sector da agricultura engloba assim a população com maior risco de sofrer efeitos tóxicos através do manuseamento de produtos fitofarmacêuticos. Esta torna-se a amostra preferencial para estudos de potenciais efeitos na saúde humana.

Segundo Gomes (1999), a exposição neste grupo deve-se principalmente a (1) negligência no manuseamento durante a preparação e aplicação do pesticida; (2) falta de equipamento de protecção ou a sua não utilização devido ao desconforto causado por este; (3) falta de cuidados no armazenamento do químico; (4) descuido no processo de eliminação da embalagem; (5) consumo de alimentos e bebidas durante o manuseamento; (6) falta de higiene pessoal; (7) falta de conhecimentos de medidas de segurança; (8) ignorância da legislação e regulamentos quanto a saúde ocupacional.

A exposição ocupacional a produtos fitofarmacêuticos tem associados diferentes riscos para a saúde e como tal tem sido alvo de interesse por parte da comunidade científica.

Os efeitos adversos, descritos na literatura, são variados; entre eles é possível referir o aparecimento de doenças cancerígenas, como cancro pancreático (Ji *et al.*,

2001), cancro no pulmão (Barthel, 1981), leucemia (Blair e Zahm, 1995), cancro da bexiga (Viel e Challier, 1995) e linfoma não-Hodgkin (Meinert *et al.*, 2000), efeitos dermatológicos e respiratórios assim como danos neurológicos e mentais (Sanborn *et al.*, 2004) e na reprodução.

Os dados epidemiológicos obtidos sobre risco de cancro nos grupos expostos são muitas vezes contraditórios. Estudos realizados mostram que os agricultores são propensos a contrair os cancros mencionados mas para outros tipos de cancro apresentam uma taxa de incidência menor do que na população geral, provavelmente devido ao estilo de vida/profissão mais saudável (Bolognesi, 2003).

As dermatites alérgicas e irritantes e as queimaduras químicas são os **efeitos dermatológicos** mais comuns. Estão normalmente associados a populações expostas a pesticidas de forma ocupacional. A associação entre o efeito dermatológico e o produto fitofarmacêutico é por vezes difícil, uma vez que normalmente os trabalhadores utilizam diferentes produtos químicos (solventes, combustíveis, borrachas, agentes de limpeza) e trabalham sob condições de humidade e temperatura variadas que condicionam a absorção dérmica (Sanborn *et al.*, 2004; O'Malley, 2007).

Entre os **efeitos respiratórios**, verifica-se um aumento da sensibilização dos indivíduos a compostos potencialmente alergénicos como pólen, ácaros, pêlos de animais e desinfetantes, entre outros.

Os organofosforados e os carbamatos ao provocar a inibição da acetilcolinesterase promovem a constricção bronquial, aumento de secreções e dificuldades respiratórias. O aparecimento da denominada piadeira está também descrito como sintoma da exposição principalmente a insecticidas e herbicidas (Hoppin, 2006).

Quanto aos **efeitos neurológicos e mentais**, estão descritos tanto para exposições crónicas como agudas (Stallones e Beseler, 2002). Estudos revelam uma associação entre a exposição a pesticidas e o aparecimento de depressões e elevadas taxas de suicídio. A doença de Alzheimer e de Parkinson estão também referidas em estudos como o de Gauthier (2001) e de IEH (2005), respectivamente.

Outros efeitos, considerados não-específicos, estão também descritos e incluem cefaleias, tonturas, fadiga, náuseas, insónias, dificuldade de concentração, confusão mas também um decréscimo nas funções cognitivas (Kamel e Hoppin, 2004).

Estão também reportados **efeitos na reprodução** e diversos tipos de malformações em recém-nascidos (Sever *et al.*, 1997; Tilson, 1998). Diversos autores

referem a influência de pesticidas na disfunção erétil (Oliva *et al.*, 2002), infertilidade e sub-fertilidade (relacionada com o tempo de gravidez) (Sanborn *et al.*, 2007), assim como casos de morte fetal, baixo peso à nascença (Garry *et al.*, 2002) e abortos espontâneos (Arbuckle *et al.*, 2001).

Os diferentes efeitos observados nos grupos de população, expostos a pesticidas, dependem essencialmente do tipo de exposição a que o indivíduo está sujeito, no entanto outras características podem condicionar estes efeitos tóxicos (Costa, 2008):

- A composição química do pesticida e a interacção entre químicos influencia o seu comportamento e permite prever a acção do composto de acordo com as suas propriedades. No entanto, os efeitos provocados pelo composto não vão depender apenas da substância activa mas também das substâncias que o constituem.
- A toxicidade selectiva do pesticida condiciona também o seu efeito; pesticidas com grau de selectividade muito alargado provocam efeitos adversos tanto em espécies-alvo como em espécies não consideradas pestes (Keifer, 2000).
- A via de exposição faz variar a forma de contacto com o organismo e como tal influencia o seu efeito. Normalmente na população exposta ocupacionalmente, a via mais recorrente é a inalação de ar contaminado e também o contacto dérmico aquando da aplicação do produto e/ou em práticas de manutenção das culturas.
- A duração e frequência de exposição ao composto tóxico constituem outros factores determinantes. A exposição pode ser considerada aguda, sub-aguda, crónica e sub-crónica, dependendo da duração desta. O aparecimento dos primeiros efeitos poderá variar consoante o tempo de exposição. Uma toxicidade aguda tende a promover o aparecimento de uma toxicidade imediata com a manifestação de sintomas a ocorrer imediatamente após a exposição.

A frequência da exposição tem que ver com o intervalo entre a aplicação das doses do pesticida. Se o intervalo de tempo for suficiente para que ocorra reparação do dano adverso, então a manifestação de sintomas pode não ocorrer, por outro lado se não houver tempo para que esta reparação ocorra, o químico pode acumular no organismo e provocar dano tóxico com efeitos visíveis (Eaton e Klaassen, 2001; Costa, 2008).

- Por último, as diferenças individuais na resposta ao tóxico também podem fazer variar a toxicidade: destacam-se factores inerentes ao próprio sujeito como a idade, peso e sexo, para além de outras características como hábitos alimentares, hábitos tabágicos e a co-exposição a outros agentes potencialmente cancerígenos (Winder, 2004).

A susceptibilidade ao químico pode depender dos polimorfismos genéticos de enzimas que estão envolvidos no metabolismo do xenobiótico condicionando as fases de absorção, biotransformação e excreção (Bonassi e Au, 2002).

Os estudos de biomonitorização que têm sido realizados têm o propósito de identificar factores de risco e permitir a tomada de medidas de controlo eficazes.

Entre os efeitos estudados encontra-se a avaliação de dano genético que na ausência de reparação pode ter importantes implicações para a saúde humana.

Os estudos disponíveis na literatura científica tendem a avaliar o potencial genotóxico dos pesticidas em populações específicas como são os aplicadores, produtores de flores, agricultores e produtores de produtos fitofarmacêuticos. Mais uma vez os resultados são contraditórios com populações indicativas de uma exposição com efeitos genotóxicos e outras sem efeitos significativos, (Pasquini *et al.*, 1996; Scarpato *et al.*, 1996; Gomez-Arroyo *et al.*, 2000; Pastor *et al.*, 2001b; Pastor *et al.*, 2003; Marquez *et al.*, 2005).

No estudo realizado na Croácia por Garaj-Vrhovac (2001) numa população de trabalhadores expostos a uma mistura de pesticidas foram obtidos resultados que apoiam a associação entre dano genético e a exposição ocupacional. Um dos métodos de biomonitorização para avaliar o dano genético foi o teste dos micronúcleos (MN). De forma a detectar os efeitos genotóxicos primários as amostras de sangue foram colhidas após uma exposição de 8 meses a pesticidas. Para detectar a ocorrência de reparação de ADN nos linfócitos, foi realizada nova recolha de sangue, 8 meses após os

trabalhadores terem sido removidos do local de trabalho e como tal sem contacto com os pesticidas.

Os resultados foram positivos com um acréscimo de dano genético quando comparado com uma população controlo. Nas segundas amostras de sangue obteve-se um decréscimo significativo do dano genético, na frequência de MN, mas ainda assim superiores ao controlo.

Foi possível concluir que os primeiros resultados comprovam a alteração genética imediata provocada pela exposição a pesticidas e os segundos demonstram o resultado da acção dos diferentes mecanismos de reparação de ADN.

Em 2003 foi realizado um estudo de biomonitorização de 4 populações europeias, (Espanha, Polónia, Grécia e Hungria) expostas ocupacionalmente a produtos fitofarmacêuticos, com recurso ao teste do MN em linfócitos de sangue periférico e células exfoliadas da mucosa oral. Os resultados obtidos mostram que não existe aumento na frequência de MN nas populações expostas quando comparadas com o controlo. Quanto a factores como a idade, hábitos tabágicos e sexo os resultados obtidos não apresentam qualquer padrão de influência na frequência de MN (Pastor *et al.*, 2003).

Esta variação de resultados pode ser explicada com base nas diferentes exposições destas populações mas também no tipo de pesticidas usados, nas medidas de protecção adoptadas e no momento em que é avaliado o dano citogenético.

Outro factor importante é a própria composição destes produtos, que passa por complexas misturas que contêm, além da substância activa, outros compostos como solventes, aditivos e agentes emulsionantes e outros capazes de baixar a tensão superficial da água (Hayes, 1991).

Assim, é difícil estabelecer uma ligação entre o composto usado, dose e o seu efeito associado (Costa, 2008).

Torna-se então erróneo extrapolar resultados de um estudo sobre dano genético provocado por pesticidas numa população com características próprias para outro estudo de avaliação de risco noutra população, obrigatoriamente diferente.

1.6 Avaliação da exposição

A exposição a compostos passíveis de causar efeitos nefastos na saúde de determinados grupos da população deve ser sujeita a uma avaliação de risco. Esta avaliação socorre-se de ferramentas inerentes à monitorização ambiental e biológica que permitem a determinação de potenciais riscos e possibilitam a compreensão do binómio dose-efeito (Costa *et al.*, 2008).

Estes tipos de estudos de monitorização estão cobertos por procedimentos uniformizados a nível internacional, o que permite uma análise confiável assim como a comparação de resultados entre laboratórios distintos.

Os dados obtidos resultam muitas vezes no estabelecimento de valores de referência mínimos e máximos que permitem um controlo facilitado dos níveis de risco a que a população poderá estar exposta (por exemplo: exposição a metais pesados doseados no sangue, como o chumbo (Lanphear *et al.*, 1998)).

1.6.1 Monitorização ambiental

Os primeiros estudos de avaliação de risco baseavam-se apenas na monitorização ambiental, em que as amostras (de ar, solo e água) eram recolhidas de forma sistemática, contínua ou repetida. A análise da concentração de poluentes químicos (indicadores de dose externa) tem como objectivo estimar a exposição e o risco para a saúde humana, por comparação dos resultados obtidos com um valor de referência estabelecido (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 (figura 5).

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).

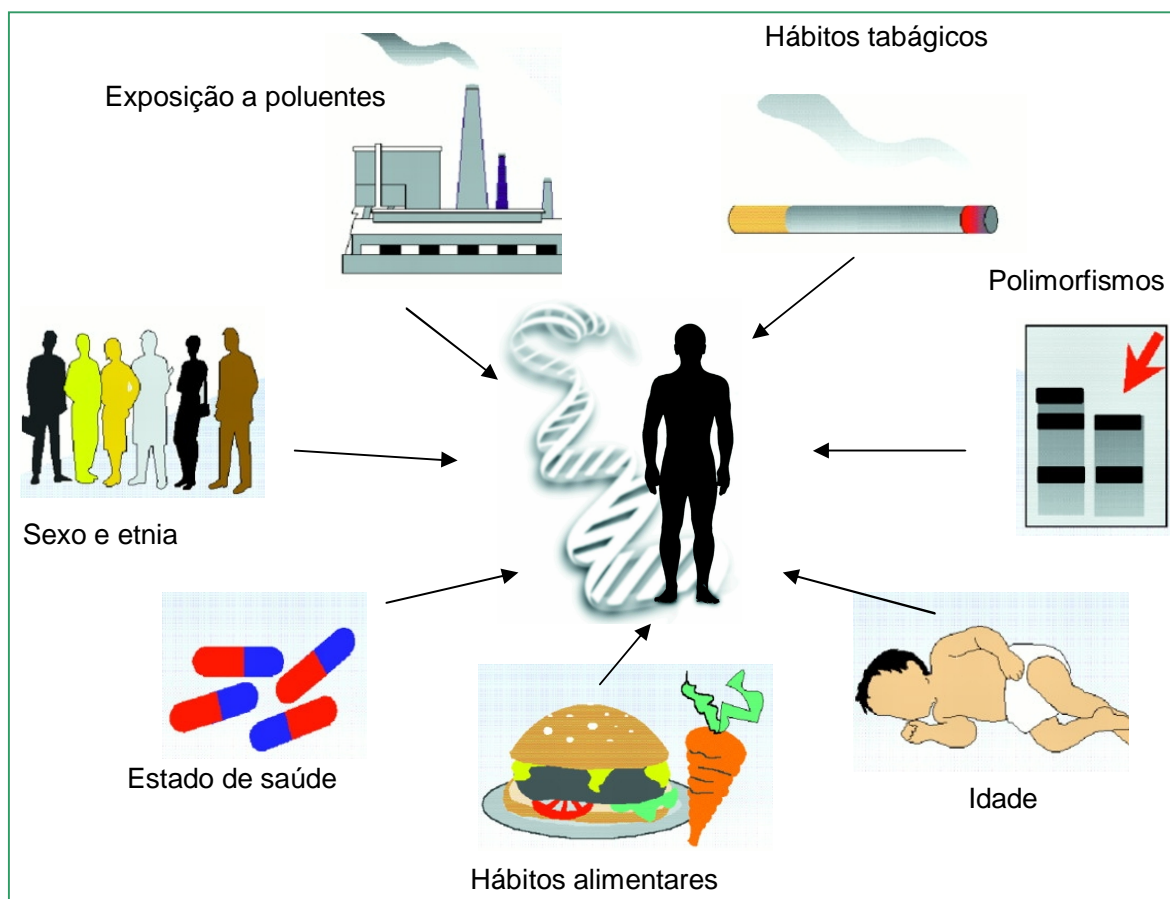


Figura 5: Factores internos e externos que condicionam a susceptibilidade do individuo a possíveis agentes genotóxicos - adaptado de Perera (1997).

1.6.2 Monitorização biológica

Roy Shore (1995) refere que a maior falha na avaliação de risco é a falta de valores quantitativos que são inexistentes ou muito limitados nos estudos de exposição ocupacional e ambiental. Desde então, os investigadores têm-se debruçado sobre a monitorização biológica e o uso de biomarcadores relacionados com a exposição, de forma a chegarem a acordo sobre o indicador biológico ideal para um composto químico específico.

A monitorização biológica veio incluir na avaliação da toxicidade, os mecanismos de toxicidade, metabolização e efeitos químicos. Assim, o cerne do estudo é o indivíduo exposto e o método consiste na quantificação do composto tóxico e/ou dos seus metabolitos em amostras biológicas, como por exemplo sangue e urina, de forma a

quantificar a concentração que efectivamente foi absorvida pelo organismo (Aitio e Kallio, 1999).

São tidas em conta as possíveis vias de entrada no organismo - ingestão, inalação e absorção dérmica.

Segundo Delft (1998), a monitorização biológica prevê variações individuais relativas à taxa de absorção, ao metabolismo, à distribuição pelo corpo e finalmente à excreção do composto químico.

1.6.2.1 Biomarcadores

Segundo Farmer e Emeny (2006), um biomarcador é qualquer substância, processo e/ou produtos que é possível quantificar no corpo.

A escolha de um biomarcador para determinado estudo numa população varia conforme esteja em causa uma avaliação a uma exposição crónica ou uma exposição aguda a um agente possivelmente carcinogénico.

O uso de biomarcadores permite uma estimativa da exposição a determinado composto e uma possível correlação com o efeito manifestado. A determinação de um biomarcador não indica obrigatoriamente um efeito tóxico prolongado mas uma exposição do organismo, neste caso, ao pesticida.

Num processo de avaliação da exposição, é necessário controlar o cenário de exposição com base na resposta do biomarcador a determinado agente. Determinando assim a sensibilidade do marcador é possível o aprimoramento da técnica de avaliação da exposição, ou seja, a escolha do biomarcador deve ser feita tendo em conta o tóxico em estudo, a população alvo e o tempo de exposição.

Os biomarcadores podem ser de três tipos como se pode ver no esquema da figura 6: biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade (Ipcs, 2001). Esta classificação não é rígida e não existe uma categorização convencionalmente aceite uma vez que normalmente são utilizados diferentes combinações de biomarcadores desde a exposição até ao efeito concreto (Costa *et al.*, 2008).

Existe uma transição contínua entre os biomarcadores de exposição e os biomarcadores de efeito uma vez que estes últimos funcionam em certa medida como biomarcadores de exposição e vice-versa. Os factores de susceptibilidade genética podem influenciar os biomarcadores de efeito e de exposição através de polimorfismos

genéticos de enzimas envolvidas na activação metabólica, acção de destoxificação, reparação de ADN, entre outros (Farmer e Emeny, 2006).

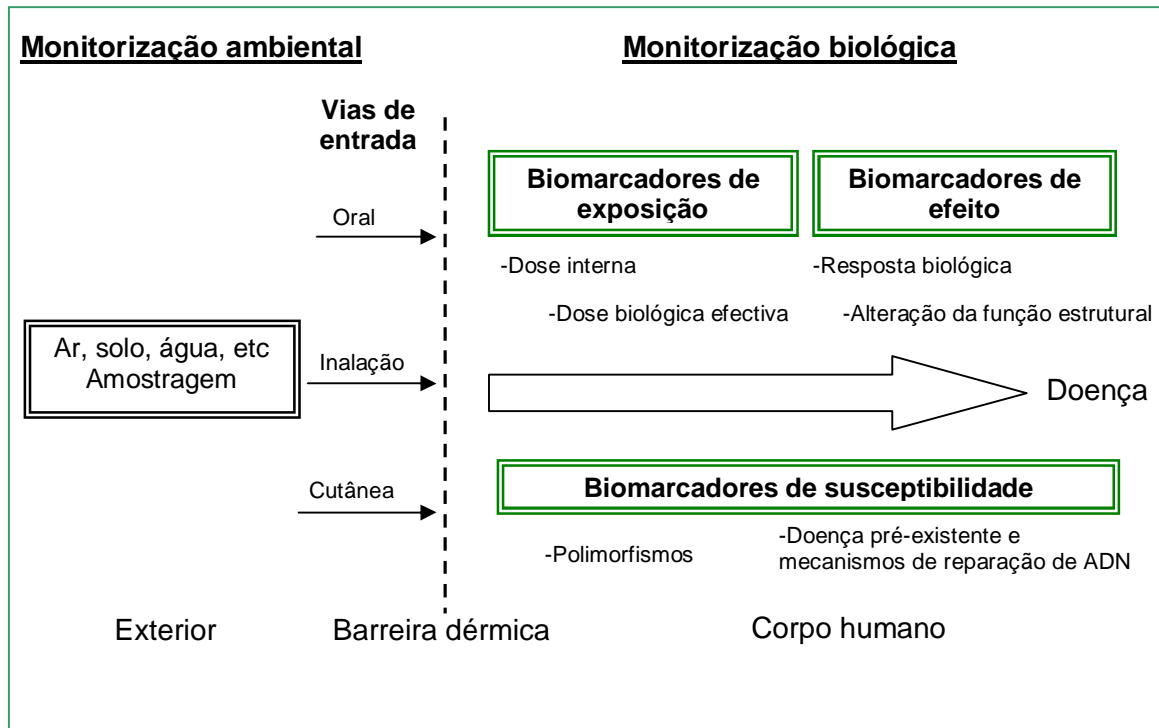


Figura 6: Monitorização ambiental e monitorização biológica com os três tipos de biomarcadores utilizados - adaptado de Institute for Environment and Health (1996).

1.6.2.1.1 Biomarcadores de exposição

Estes biomarcadores fornecem informação sobre a dose do tóxico a que o indivíduo foi exposto. São normalmente utilizados na previsão de riscos e permitem a inferir sobre a interacção dose-resposta aquando da sua quantificação no organismo.

Podem ser divididos em biomarcadores de dose interna e dose biológica efectiva:

- **Biomarcadores de dose interna:** estes biomarcadores integram todas as vias de exposição ao estimar a quantidade do agente tóxico e/ou seus metabolitos nos fluidos biológicos. Não possibilita a detecção de dano tóxico no organismo mas permite uma detecção de exposição ao xenobiótico (Amorim, 2003). Veja-se como exemplo o doseamento de níquel e chumbo na urina e benzeno no ar, sangue e urina.

- **Biomarcadores de dose biológica efectiva:** possibilitam a quantificação do tóxico que interagiu efectivamente com locais-alvo como tecidos, células, organelos ou macromoléculas (ADN e proteínas) do organismo e alterou a sua função fisiológica. Estes biomarcadores podem ser reparados ou podem levar ao desenvolvimento de doença clínica (Barr e Needham, 2002). Como exemplos, temos os aductos de ADN e aductos de proteínas.

1.6.2.1.2 Biomarcadores de susceptibilidade

Os biomarcadores de susceptibilidade indicam as variáveis genéticas que condicionam a resposta do indivíduo a um agente tóxico. A susceptibilidade genética individual pode condicionar o efeito dos compostos químicos no organismo. Assim, estes biomarcadores indicam a capacidade inerente ou adquirida de um indivíduo de responder à exposição ao xenobiótico. Estas diferenças são predominantemente de origem genética, embora a ocorrência de alterações fisiológicas, a existência de medicação e a exposição concomitante a outros agentes ambientais possam influenciar a susceptibilidade individual a um agente externo (Institute for Environment and Health, 1996).

1.6.2.1.3 Biomarcadores de efeito

Estes marcadores reflectem a interacção entre os compostos tóxicos e os receptores biológicos do organismo. Indicam modificações precoces, reversíveis ou não, que precedem danos estruturais ou funcionais progressivos a nível molecular, celular e tecidular (Prista e Uva, 2006). São, por isso, considerados marcadores não específicos uma vez que não é possível associar directamente o aparecimento destas modificações à causa que lhes deu origem.

Os biomarcadores de efeito mais utilizados incluem a análise citogenética nomeadamente as aberrações cromossómicas (AC), troca entre cromátídeos irmãos (SCE), teste do cometa e formação de MN. Estes testes permitem a determinação de uma exposição a compostos genotóxicos mas não possibilitam a determinação do tempo

exacto da exposição, são por isso considerados como marcadores de exposição de largo espectro ao longo da vida do indivíduo.

Este tipo de análise é, normalmente, realizado em culturas de linfócitos de sangue periférico e reflecte o possível dano genético provocado por uma exposição a um composto genotóxico através de alterações cromossómicas estruturais e/ou numéricas (Albertini *et al.*, 2000).

1.7 Teste do Micronúcleo

1.7.1 Formação e destino dos MN

O teste do MN é bastante utilizado para testar a genotoxicidade *in vitro* e também em estudos de biomonitorização de exposição e efeito (Falck e Norppa, 2003).

A primeira utilização do teste de MN foi realizada em 1959, quando se tentava realizar uma avaliação de alterações cromossómicas (Evans *et al.*, 1959). Já mais tarde com Countryman (1976), inicia-se a cultura de linfócitos de sangue periférico humano como futura rotina neste método. Actualmente são utilizados diferentes tipos de células, para avaliar o dano genético, como células epiteliais, eritrócitos e fibroblastos.

A preferência sobre o uso de linfócitos deve-se principalmente ao seu tempo de vida comparativamente com outras células. As células exfoliadas da mucosa bucal apresentam uma duração de aproximadamente 21 dias e os eritrócitos 120 dias enquanto que os glóbulos brancos, neste caso os linfócitos apresentam cerca de 1095 dias (cerca de 3 anos) de tempo de vida. Este valor é bastante discutido na literatura e são apresentados valores entre 730 e 1600 dias (Ramalho *et al.*, 1995)

A utilização de células epiteliais deve-se principalmente à sua exposição mais directa ao agente em causa; no entanto alguns estudos têm revelado que quando comparadas diferentes células, os linfócitos são consideradas as células preferíveis para estudo uma vez que além do tempo de vida apresentam um número basal de MN mais constante e elevado (Pritha *et al.*, 2008).

Numerosos estudos são realizados *in vivo* mas também *in vitro* e diferentes técnicas de coloração são aplicadas (Rossnerova *et al.*, 2009).

Os MN, quando observados ao microscópio (ver figura 7), são estruturas similares ao núcleo principal da célula, de pequenas dimensões e extranucleares, que podem derivar de duas origens distintas: a quebra de cromossomas ou a perda de material genético no cromossoma, como mostra a figura 8. Assim, a sua formação representa dano genético provocado por agentes genotóxicos com dois modos de acção distintos: clastogénicos ou aneugénicos.

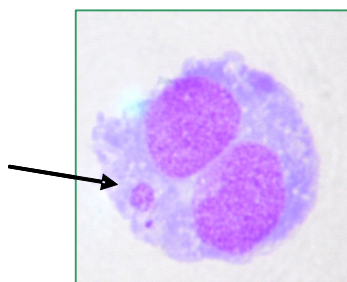


Figura 7: Célula binucleada com um MN (ampliação de 500x, ocular, 12.5x; objectiva 40x).

Os agentes considerados clastogénicos podem levar à formação de MN que contêm no seu interior fragmentos de cromossomas que resultam da quebra de uma ou das duas cadeias de ADN.

Nos casos em que a reparação do erro não ocorre, esta quebra de cromossomas poderá dar origem a um rearranjo assimétrico com a formação de um cromossoma dicêntrico e um fragmento acêntrico (Fenech e Morley, 1985).

O primeiro é arrastado para os pólos da célula durante a anafase e forma uma ponte núcleoplasmática entre os núcleos da célula filha, enquanto que o segundo fragmento sofre um atraso dando origem a um MN que desta forma não é incluído no núcleo da célula filha aquando da telofase (Hagmar *et al.*, 1998b; Bonassi e Au, 2002; Thomas *et al.*, 2003).

Quanto aos agentes com modo de acção aneugénica, o MN é formado com um cromossoma inteiro que sofreu um atraso aquando da ascensão aos pólos. Este atraso na ascensão dá-se por falhas no fuso mitótico ou por danos estruturais no cromossoma (Albertini Rj *et al.*, 2000).

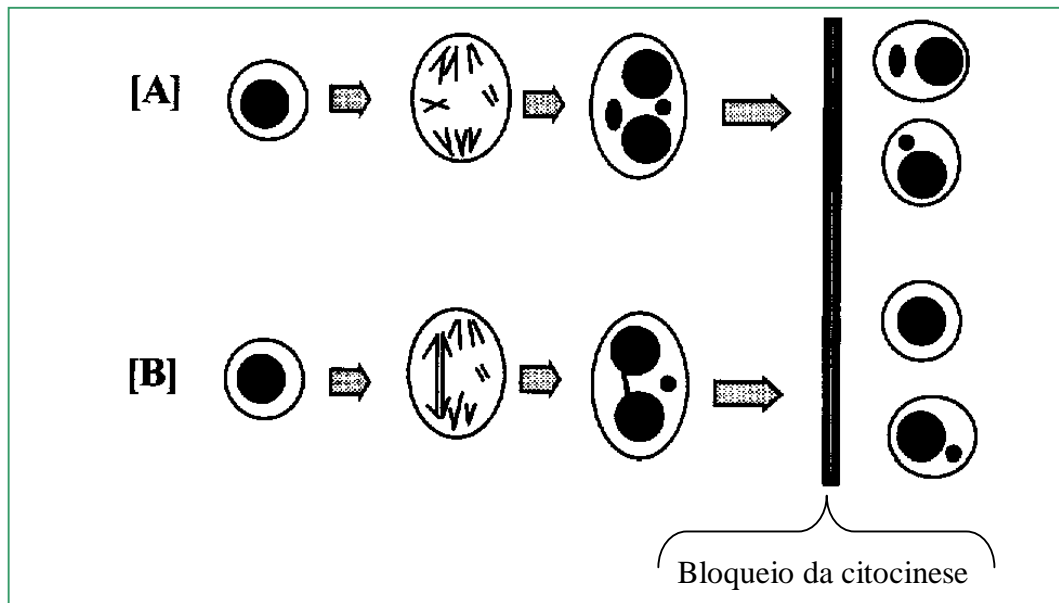


Figura 8: Diagrama esquemático da formação de MN (A) a partir de um fragmento acêntrico e de um cromossoma inteiro que sofreu um atraso durante a ascensão aos pólos, em (B) a formação de pontes núcleoplasmáticas a partir de pontes dicêntricas - adaptado de Fenech (1997).

Após a sua formação, o MN pode seguir diferentes vias apesar de ainda não estarem esclarecidas todas as etapas. Assim, na fase pós-mitótica pode ocorrer a eliminação da célula que contém o MN através da apoptose (Decordier *et al.*, 2002), expulsão do interior da célula, uma vez que o ADN não se encontra funcional (Leach e Jackson-Cook, 2004), inclusão do MN no núcleo principal ou, por último, pode dar-se a integração do MN no citoplasma da célula.

1.7.2 Teste de MN como biomarcador de efeito

Para a identificação dos micronúcleos, as células são colocadas em divisão celular e os micronúcleos são formados aquando da anáfase.

A adição de citocalasina B, um inibidor da polimerização da actina, à cultura, inibe a citocinese e permite a obtenção de células binucleadas. Desta forma é possível distinguir as células que não sofreram citocinese e portanto, apresentam dois núcleos (binucleadas) das que sofreram mitose completa e como tal apresentam apenas um núcleo (mononucleadas).

A determinação da frequência de MN é realizada por contagem visual em numerosos estudos. A introdução de diferentes técnicas de contagem e de coloração por parte dos laboratórios pode adicionar erros de leitura aquando da interpretação e comparação de resultados.

Com o projecto de MN em humanos (HUMN), Fenech promove a unificação na análise do teste de MN ao descrever detalhadamente critérios de contagem para linfócitos assim como a enumeração de fontes de variabilidade no teste, como idade, sexo e hábitos tabágicos, entre outros. Desta forma, os dados obtidos pelos investigadores apresentam grande poder estatístico (Fenech *et al.*, 1999; 2003).

As células binucleadas são consideradas para contagem uma vez que o dano genético a que célula foi exposta teve oportunidade de se expressar através da divisão (Farmer e Emery, 2006). Células mononucleadas não são validadas (para contagem) uma vez que não ocorreu divisão ou estas células escaparam ao bloqueio da citocinese e completaram o ciclo mitótico.

Alguns autores consideram que as células mononucleadas deveriam ser consideradas tal como as células binucleadas uma vez que representam informação complementar sobre o número total de células que sofreram dano e poderiam ter sofrido mitose. Estas células de apenas um núcleo principal são capazes de indicar danos acumulados *in vivo* que estariam presentes antes da cultura celular em si ocorrer, ao contrário das células binucleadas que podem conter MN pré-existentes mais as lesões expressas, como MN, durante a cultura *in vitro* (Kirsch-Volders e Fenech, 2001).

1.7.3 Vantagens e desvantagens da técnica

As vantagens deste teste quando comparado com outros testes clássicos de análise de cromossomas em metafase é a sua alta sensibilidade. Apresenta um factor estatístico valorizado, ou seja, permite a contagem de um elevado número de células ao contrário de outros testes de análises em metafase (Fenech *et al.*, 1999). Com a automatização da contagem de MN, será possível anular a variação imposta pelo indivíduo, que faz a avaliação do dano genético aquando da leitura, assim como permitirá a diminuição do tempo que esta técnica requer. Esta automatização da leitura tem vindo a ser experimentada desde 1982 por citometria de fluxo (Hutter e Stohr, 1982) e mais tarde por diferentes softwares (Tates *et al.*, 1990; Bocker *et al.*, 1995; Varga *et al.*, 2004;

Decordier *et al.*, 2009) mas o erro associado não apresenta ainda segurança na leitura e o método continua ainda por validar.

A alta sensibilidade do teste de MN está relacionada com a capacidade de distinguir entre eventos clastogénicos e eventos aneugénicos ao identificar os mecanismos de formação de MN. Esta distinção é realizada com a identificação do centrómero e do cinetocoro. Assim, com a utilização de anticorpos anti-cinetocoro (CREST) é possível identificar a presença de cinetocoros em cromossomas que sofreram um atraso aquando da divisão celular e também detectar a presença de centrómeros específicos utilizando a técnica de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH).

As desvantagens deste teste são apontadas ao facto de nem todo o dano genético ser possível de identificar através do método de bloqueio da citocinese. Assim, determinadas alterações como translocações recíprocas simétricas não são expressas em MN e constituem também erros nos cromossomas. No entanto, translocações assimétricas, como os cromossomas dicêntricos e os seus fragmentos acêntricos, são já expressas em pontes núcleoplasmáticas e MN respectivamente.

Alguns autores apontam o facto de o uso de determinadas concentrações de citocalasina B poderem induzir dano genético verificando-se assim, resultados falseados e encobertos pela acção deste composto e não apenas do agente de exposição em estudo. No entanto, para concentrações no intervalo de 1-6 µg/ml de citocalasina não se demonstra o efeito de dose-resposta na indução de MN em células binucleadas (Fenech, 1997).

1.7.4 Associação entre a frequência de MN e o cancro

Segundo Bonassi (2007), o aumento da frequência de MN numa determinada população está associada com um maior risco de eventos de cancro. Assim a formação de MN pode permitir prever um caso de patologia oncológica.

Diversos estudos relacionam a frequência de MN com o aparecimento de cancro (Farmer e Emeny, 2006). É possível observar a existência de similaridades entre a frequência de MN e AC indutoras de cancro (Hagmar *et al.*, 1994; Hagmar *et al.*, 1998a; Hagmar *et al.*, 1998b). Também, *in vitro* verifica-se uma elevada concordância entre valores de AC e o teste de MN.

Sob o ponto vista clínico, nota-se o aumento do número de MN em linfócitos de pacientes com cancro e em pacientes com um quadro clínico de síndromes, como a síndrome de Bloom e de ataxia telangiectasia, que apresentam uma predisposição para desenvolver doença cancerosa (Rosin e German, 1985; Rudd *et al.*, 1988; Duffaud *et al.*, 1997).

Também, uma deficiência nutricional (em determinadas vitaminas e ácido fólico) está associada a um maior risco de determinados cancros que normalmente têm associado altas frequências de MN no sangue do indivíduo, (Fenech e Rinaldi, 1995; Blount *et al.*, 1997; Fenech *et al.*, 1997; Fenech *et al.*, 1998).

Ao permitir a avaliação de genotoxicidade e citotoxicidade, o teste do MN apresenta-se como um teste completo (como se pode ver na figura 9), ao permitir avaliar os processos de proliferação celular (inibição da divisão celular), morte celular (necrose e apoptose) e alterações nos cromossomas (formação de MN, pontes núcleoplasmáticas e buds nucleares) (Kirsch-Volders *et al.*, 1997).

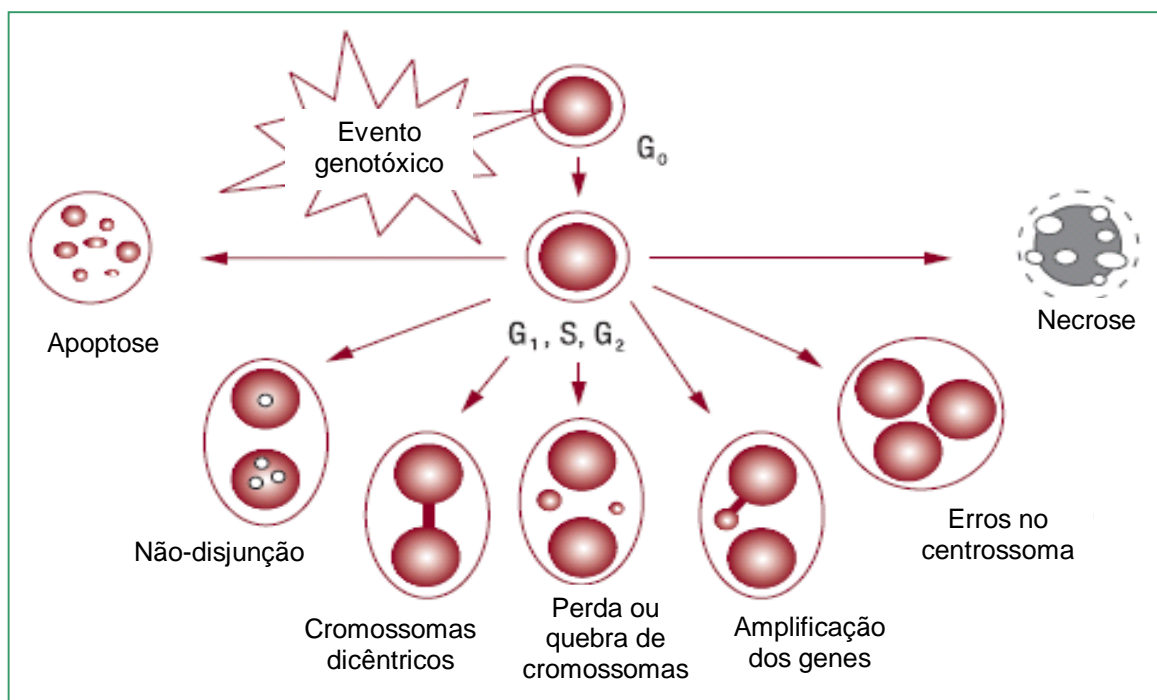


Figura 9: Teste do MN, através do bloqueio da citocinese - adaptado de Fenech (2005).

1.8 Objectivo

Com este trabalho, pretendia-se avaliar o dano genético de uma população residente nas zonas da Póvoa do Varzim e Esposende, exposta ocupacionalmente a produtos fitofarmacêuticos quando comparada com uma população controlo da mesma área.

A análise foi levada a cabo através do teste de citogenética de contagem de MN. Esta técnica permite obter uma frequência de MN presentes por cada 1000 células binucleadas de linfócitos de sangue periférico.

Nesta análise foram tidos em conta factores sociais e demográficos; foi realizada uma tentativa de estabelecer uma associação entre sexo, idade e hábitos tabágicos com a frequência de MN. Outros factores relacionados com a ocupação profissional em causa foram também avaliados, como sejam, o local de trabalho, aplicação e/ou preparação do pesticida, anos de trabalho, aplicações de produto por ano e utilização de equipamento de protecção individual.

Por fim aplicou-se um modelo de avaliação de risco, que ainda se encontra em fase de validação, desenvolvido pelo *International Centre for Pesticide and Health Prevention* (ICPS). Este modelo atribui um perfil de risco aos indivíduos de acordo com as suas características e práticas de trabalho.

Este estudo de avaliação de dano genético torna-se pertinente ao permitir um melhor conhecimento da realidade portuguesa, com a caracterização dos hábitos de trabalho e factores intrínsecos à população que podem provocar danos na saúde advindos de uma exposição a produtos fitofarmacêuticos.

Metodologia

2.1 População em estudo e recolha da amostra biológica

O estudo em causa foi submetido à Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e desenvolvido de acordo com a Declaração de Helsínquia de 1975 e revista em 1989.

A população alvo de estudo consistiu em trabalhadores do sector agrícola, expostos a diferentes pesticidas, nas zonas da Póvoa do Varzim e Esposende, distrito do Porto, Portugal. Como termo de referência foi constituída uma população controlo residente na mesma área da população exposta e com historial ocupacional de não exposição a pesticidas nos últimos 6 meses.

O grupo controlo foi seleccionado a partir de características comuns ao grupo exposto, como sejam, as características demográficas, de idade, sexo, estilos de vida e hábitos tabágicos de forma a manter a homogeneidade da população.

Todos os participantes foram informados sobre os objectivos do estudo e assinaram um consentimento informado ao mesmo tempo que lhes foi administrado dois questionários, presentes em anexo (anexos I e II).

O questionário individual de saúde, administrado a ambos os grupos, tinha como objectivo recolher informação relevante como dados pessoais, factores sociais e demográficos, historial clínico e medicação tomada. O seu preenchimento resultou também na recolha de informação relativa a anteriores exposições a possíveis agentes carcinogénicos (por exemplo: raios-x e hábitos tabágicos).

Ao grupo exposto foi pedido também que respondesse a um segundo questionário, relacionado com a exposição, com questões relativas à sua actividade profissional (como o modo de aplicação de pesticidas, uso de equipamento de protecção individual (EPI) e tempo de exposição durante a actividade laboral).

O factor EPI foi avaliado neste estudo conforme o seu uso pelos trabalhadores agrícolas, assim, consideramos protecção máxima quando há utilização de todos os equipamentos disponíveis como luvas, máscara, óculos, capacete, fato de protecção e botas.

A cada indivíduo foram recolhidos 5 ml de sangue em tubos de heparina sódica, previamente codificados e mantidos a 4°C até serem transportados para o laboratório onde foi processada a análise citogenética.

2.2 Análise citogenética: Teste do micronúcleo

2.2.1 Cultura celular de linfócitos

O procedimento experimental aplicado seguiu o já descrito por Monteiro (2000) em condições de assépsia utilizando para isso uma câmara de fluxo laminar e material esterilizado.

A cultura de linfócitos foi preparada adicionando 0,5 ml de sangue a 4,5 ml de meio F-10 suplementado com 1% de heparina sódica, 1% de L-glutamina, 24% de FBS e mistura de antibióticos (estreptomicina (50 µg/mL) e penicilina (50 IU/mL)).

Para estimular a divisão celular foi adicionado 80 µl de fitohemaglutinina reconstituída a 2% em água desionizada e a mistura foi homogeneizada. Foram realizadas 2 réplicas por cada indivíduo e colocadas a incubar a 37° C durante um período de 44 horas.

Após este período adicionou-se à cultura 150µL citocalasina B (concentração final desta na cultura: 6 µg/mL) de forma a inibir a citocinese das células. Os tubos voltaram a incubar até às 72 horas.

No final do período de incubação, os tubos foram homogeneizados e as células foram separadas por centrifugação a 1000 rpm (270xg) durante 10 minutos. A partir deste passo deixa de ser necessário manter as condições de assépsia anteriores. Decantado o sobrenadante as amostras foram tratadas, por 2 vezes, com 5 ml de solução de lavagem RPMI 1640 suplementado com 2% de FBS e levadas a centrifugar a 1000 rpm durante 7 minutos.

No agitador foram adicionados 5 ml da solução de choque osmótico, RPMI 1640 (meio de cultura), na proporção de 4:1 (água:RPMI) suplementado com 2% de FBS e imediatamente as amostras foram postas a centrifugar 5 minutos a 1000 rpm.

Desprezado o sobrenadante, o pellet foi utilizado para realizar esfregaços em lâminas. Realizaram-se cerca de 6 esfregaços (por cada indivíduo) que foram posteriormente colocados a secar durante 24 horas ao abrigo da luz.

2.2.2 Fixação e coloração

A fixação foi realizada numa tina contendo uma solução de metanol:ácido acético, na proporção 3:1, a -20°C , durante 20 minutos. Depois das lâminas secas procedeu-se à coloração. As lâminas foram mergulhadas em corante Giemsa 4%, com tampão fosfato pH 6,8, durante 7 minutos. Após o período de coloração as lâminas foram lavadas em água corrente e colocadas a secar na posição vertical.

Depois de bem secas, as lâminas foram montadas com Entellan e colocadas a secar na horizontal.

2.2.3 Contagem de células binucleadas e micronúcleos

Na contagem de células utilizou-se um microscópio de campo claro e seguiu-se a metodologia de Caria (1995) e Fenech (1999). As células foram observadas com uma ampliação de 500x (ocular: 12,5x; objectiva: 40x). Para cada indivíduo da amostra foram seleccionadas 2 lâminas e sendo contabilizados os MN presentes em 1000 células binucleadas (500 por réplica/lâmina).

A contagem foi levada a cabo, em amostras codificadas, por um único indivíduo de forma a excluir possíveis enviesamentos na leitura.

A avaliação/contagem de células com MN seguiu os critérios de acordo com Fenech (2003):

- estrutura da cromatina e refacções similares entre núcleos;
- citoplasma bem preservado;
- intensidade de coloração semelhante entre núcleos;
- definição de contornos nucleares e forma oval ou redonda;
- sem ligações aos núcleos principais;
- diâmetro entre $1/16$ e $1/3$ da média do diâmetro do núcleo principal que corresponde a $1/256$ e $1/9$ da área de um dos núcleos principais numa célula binucleada.

2.3 Análise do perfil risco-exposição

O modelo de avaliação de risco desenvolvido pelo ICPS, com base em literatura científica de estudos com medições em campo, foi aplicado a esta população agrícola de forma a atribuir um valor correspondente ao perfil do indivíduo que varia entre a letra A e H, numa escala crescente de risco.

Esta avaliação de risco, em particular, foi desenvolvida para ser aplicada a estufas, no entanto a sua administração a outros locais de trabalho, como ar livre e armazém foi administrada neste estudo.

A atribuição de um determinado perfil de risco aos indivíduos teve por base um inquérito, presente em anexo II, em que os indivíduos responderam a questões relativas a hábitos e condições de trabalho, tipo de cultura, entre outros.

Os factores utilizados na avaliação de risco são os: indicadores de utilização (UI), utilização de EPI e grau de formação dos operadores (TrI), presentes na tabela 2.

Tabela 2: Factores utilizados na avaliação de risco.

Indicadores de utilização (UI)	Utilização de EPI (EPI)	Grau de formação dos operadores (TrI)
-dose aplicada de produto; -área tratada; -concentração da substância activa; -formulação do produto; -taxa de aplicação; -maquinaria utilizada; -tipo de cultura; -trabalho exercido;	-máscara de papel -máscara de filtro -óculos -capacete -fato de protecção -luvas -botas	-boa (vários cursos e/ou formações ao longo do tempo) -média (1 curso aplicação pesticidas) -suficiente (treino informal) -nenhuma

A cada factor é atribuído um valor correspondente que depois é inserido na seguinte fórmula de cálculo do índice de exposição (EI):

$$\Sigma (UI) \times EPI \times TrI = EI$$

De seguida este valor é cruzado com o índice de toxicidade (TI), patente em cada produto fitofarmacêutico, obtendo-se assim o valor de perfil de risco.

Este índice de toxicidade, presente na tabela 3, é característico de cada produto consoante o seu nível de risco para seres humanos e passou a fazer parte dos rótulos de produtos fitofarmacêuticos na sequência das directivas 2001/59/CE³ e 2003/82/CE⁴.

É classificado em 5 fases, nomeadamente: sensibilizante (R43), irritante (R36), nocivo (R20, R22), tóxico (R23, R25) e muito tóxico (R26) de acordo com a(s) via(s) de exposição. Foi também incluída uma fase - R62 - que contempla possíveis efeitos tóxicos ou nocivos na saúde humana e com efeitos nocivos na reprodução.

Tabela 3: Índices de risco dos produtos fitofarmacêuticos.

Fases de risco		TI
R22	Nocivo se ingerido	1
R36	Irritante ocular	
R20	Nocivo se inalado	2
R25	Tóxico se ingerido	
R23	Tóxico se inalado	3
R43	Sensibilizante dérmico	
R26	Muito tóxico se inalado	4
R62	Nocivo para a reprodução	

³ Directiva 2001/59/CE da Comissão, de 6 de Agosto de 2001, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas. Jornal Oficial nº 225 de 21/08/2001, 333pp.

⁴ Directiva 2003/82/CE da Comissão de 11 de Setembro de 2003, que altera a Directiva 91/414/CEE do Conselho no respeitante às fases-tipo relativas a riscos especiais e às fases-tipo relativas às precauções a tomar aplicáveis aos produtos fitofarmacêuticos. Jornal Oficial nº 228 de 12/09/2003, pags.11-28.

2.4 Análise estatística

Para avaliar a ocorrência de dano genético provocado por exposição a pesticidas procedeu-se ao tratamento estatístico dos resultados obtidos na análise citogenética.

Foi considerada variável dependente a frequência de MN e variáveis independentes a idade dos indivíduos, sexo, hábitos tabágicos, tipo de actividade, local de trabalho e uso de EPI.

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

As associações entre duas variáveis foram analisadas através da correlação de Spearman.

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

Resultados

3.1 Caracterização da população

A população em estudo consistiu em 120 indivíduos, 60 no grupo exposto e 60 no grupo controlo. As características sóciodemográficas inerentes a cada um dos grupos estão presentes na tabela 4.

Tabela 4: Características da população em estudo.

		Grupo Controlo	Grupo Exposto
Nº de indivíduos	N total	60	60
	Homens N (%)	26 (43,3)	29 (48,3)
	Mulheres N (%)	34 (56,7)	31 (51,7)
Idade (anos) ^a		39±11 (19-61)	39±12 (16-62)
Tempo de exposição (meses) ^a		-	244±25 (4-624)
Hábitos tabágicos	Fumadores N (%)	7 (11,7)	4 (6,7)
	Não fumadores N (%)	53 (88,3)	56 (93,3)

^a[média±desvio padrão; (intervalo)]

A análise do questionário revela que no grupo exposto, 5 indivíduos aplicam pesticidas apenas no interior de estufas, 4 exclusivamente ao ar livre e outros 4 indivíduos trabalham no armazém. A maioria dos indivíduos, 46, trabalha tanto dentro de estufas como ao ar livre, como se pode ver pela figura 10.

Quanto à preparação e aplicação do produto, tal como apresentado na figura 11: 5 indivíduos preparam o pesticida, 4 aplicam e 36 dos indivíduos fazem ambos os procedimentos.

No que se refere ao EPI nota-se uma não uniformização do seu uso, ou seja, entre os indivíduos que lidam directamente com os pesticidas, na sua preparação e/ou aplicação, 76% usa luvas, no entanto apenas 36%, utiliza o EPI máximo, como seja, máscara, luvas, fato de protecção, óculos, capacete e botas.

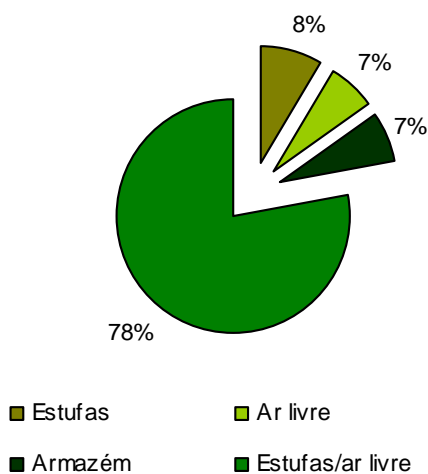


Figura 10: Percentagem de trabalhadores agrícolas distribuídos pelos locais de trabalho - estufas, ar livre e armazém.

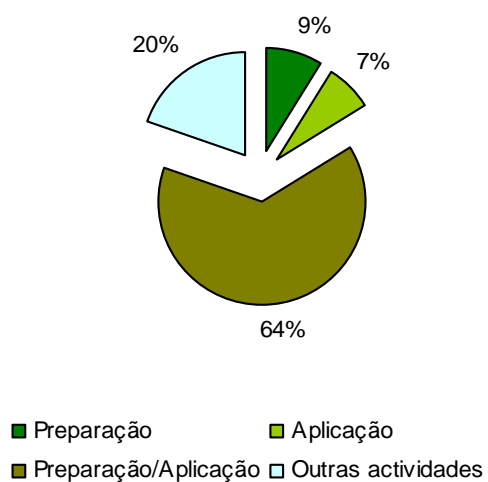


Figura 11: Percentagem de trabalhadores agrícolas distribuídos pela actividade que exercem – preparação e aplicação.

3.1.1 Dano genético nos grupos controlo e exposto

Na tabela 5 estão apresentados os valores das frequências de MN presentes em cada um dos grupos estudados. Através do teste Mann-Whitney, verificou-se um aumento significativo do número de MN no grupo exposto comparativamente ao grupo controlo, ($p < 0,001$). Os resultados estão representados graficamente na figura 12.

Tabela 5: Valores médios de MN nos grupos controlo e exposto.

Grupo	MN (%) ^a	N
Controlo	2,35±0,23 (0-9)	60
Exposto	8,30±0,50* (1-19)	60

^aMédia±SE (intervalo)

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

* $p < 0,001$

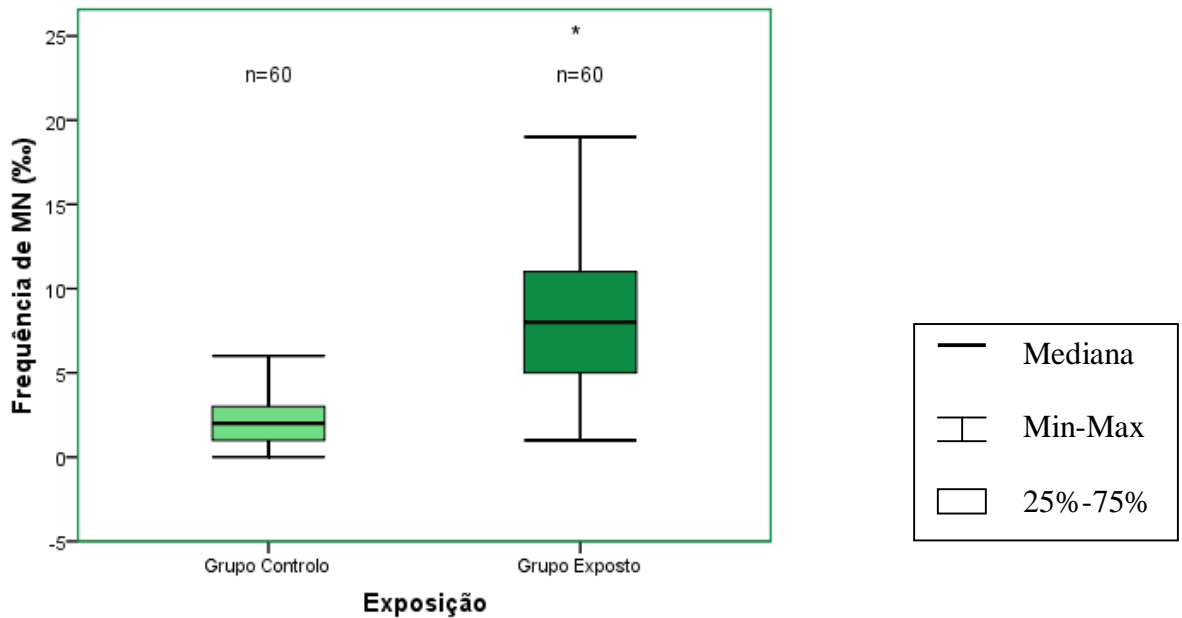


Figura 12: Distribuição das frequências de MN nos grupos controlo e exposto (* $p < 0,001$).

Na figura 13 apresenta-se a distribuição da frequência de MN categorizadas em 4 classes nos dois grupos para melhor interpretação de resultados. Estas classes foram definidas de forma a diminuir a variância intra-classes.

É possível notar que no grupo controlo a maior percentagem de indivíduos encontra-se nas classes mais baixas de MN, onde 40% dos indivíduos apresenta dano genético na classe de [0-3,5[. Esta distribuição no grupo controlo sofre uma tendência decrescente ao longo das classes apresentando na última classe uma ausência total de indivíduos.

Por outro lado, no grupo exposto o número de indivíduos com maior frequência de MN tende a aumentar com o aumento das classes de MN, apresentando o seu pico na classe [7,5-11,5[. De notar que na última classe de MN, [11,5-19[, a percentagem de indivíduos diminui.

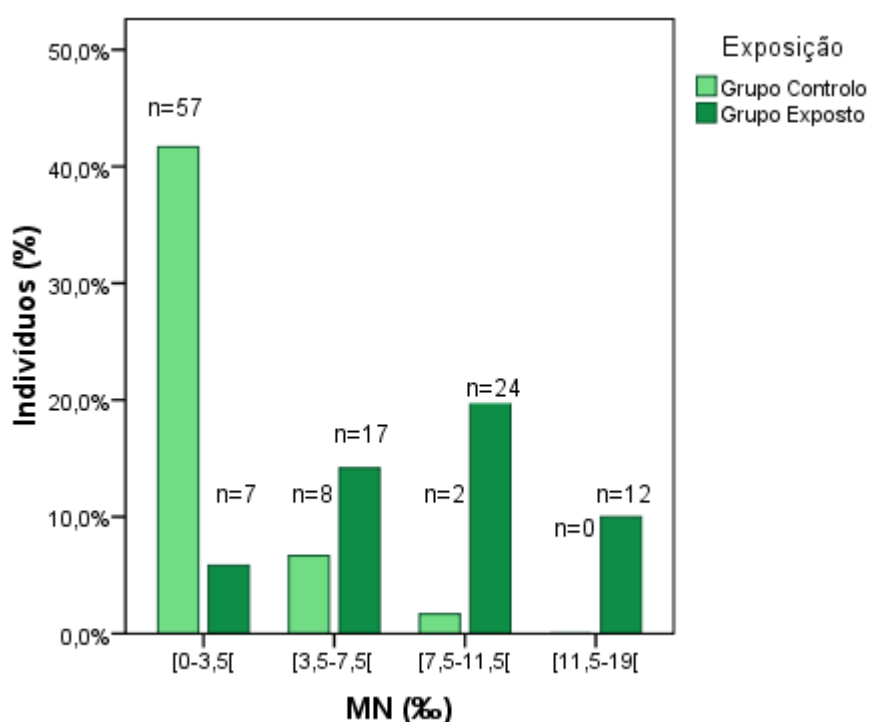


Figura 13: Distribuição das frequências de MN nos grupos controlo e exposto em diferentes classes de dano genético.

3.1.2 Influência do género

Na tabela 6 estão os resultados relativos à influência do género na frequência de MN. Apesar de não haver uma diferença significativa entre grupos e géneros, é possível notar um incremento no valor de MN no género feminino em comparação com o género masculino, quer no grupo exposto quer no grupo de controlo. Este aumento apresenta-se com um valor de significância de $p=0,07$. Como se pode ver na figura 14 este aumento de frequência de MN é mais visível no grupo exposto.

Tabela 6: Valores médios de MN nos grupos exposto e controlo segundo o género.

Grupo		MN (‰) ^a	N(%)
Controlo	Mulheres	2,62±0,37 (0-9)	34(57)
	Homens	2,00±0,23 (0-5)	26(43)
Exposto	Mulheres	9,19±0,80 (1-19)	31(52)
	Homens	7,34±0,56 (2-12)	29(48)

^aMédia±SE (intervalo)

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

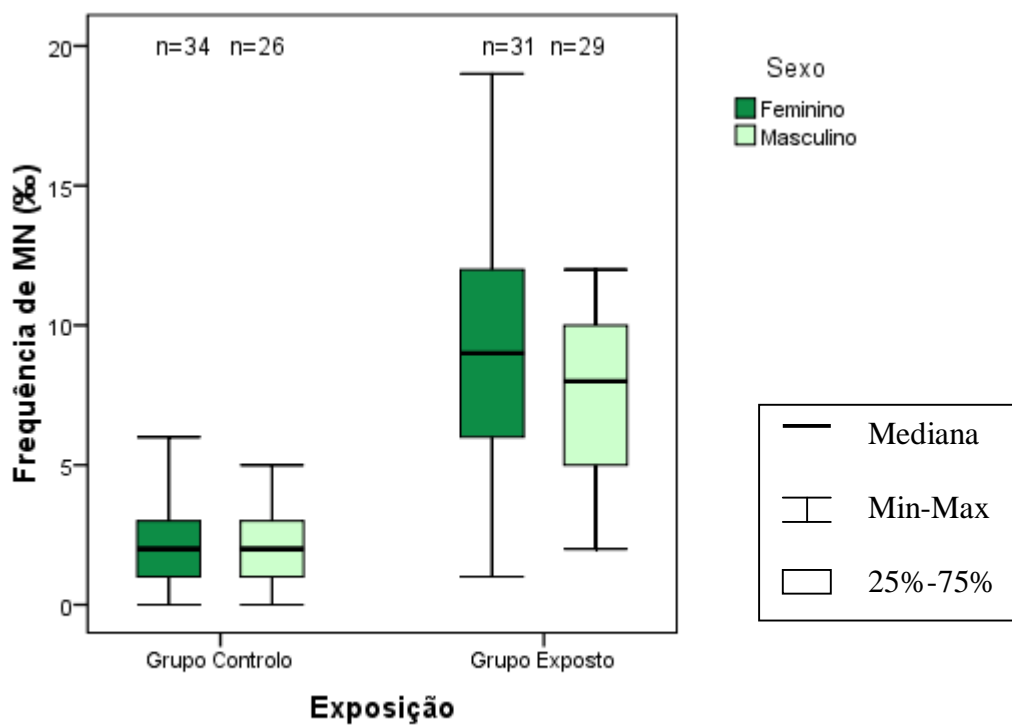


Figura 14: Distribuição das frequências de MN nos grupos controle e exposto de acordo com o género.

3.1.3 Influência da idade

Para avaliar o possível efeito da idade na frequência de MN, definiram-se 3 classes etárias: 18-32 anos; 32-45 anos e 45-62 anos, apresentadas na tabela 7. O número de classes e os seus limites foram igualmente definidos como em 3.1.1 na avaliação de dano genético nos grupos exposto e controlo, ou seja, de forma a diminuir a variância intra-classes.

Pela figura 15 é possível observar um ligeiro aumento no número de MN à medida que a idade aumenta nos indivíduos do grupo controlo. Este aumento, presente neste grupo, encontra-se no limite de significância, $p=0,05$. Por outro lado, no grupo exposto, observa-se um aumento de dano genético das duas primeiras classes etárias, [18-32[para [32-45[, seguido de um decréscimo no número de MN na última classe, correspondente ao intervalo [45-62[.

Tabela 7: Valores médios de MN nos grupos exposto e controlo segundo a idade.

Grupo		MN (%) ^a	N (%)
Controlo	[18-32[1,44±0,18 (0-3)	16(27)
	[32-45[2,62±0,36 (0-8)	26(43)
	[45-62[2,78±0,51 (0-9)	18(30)
Exposto	[18-32[7,53±0,81 (1-12)	19(32)
	[32-45[9,61±1,15 (3-19)	18(30)
	[45-62[7,91±0,65 (1-14)	23(38)

^aMédia±SE (intervalo)

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

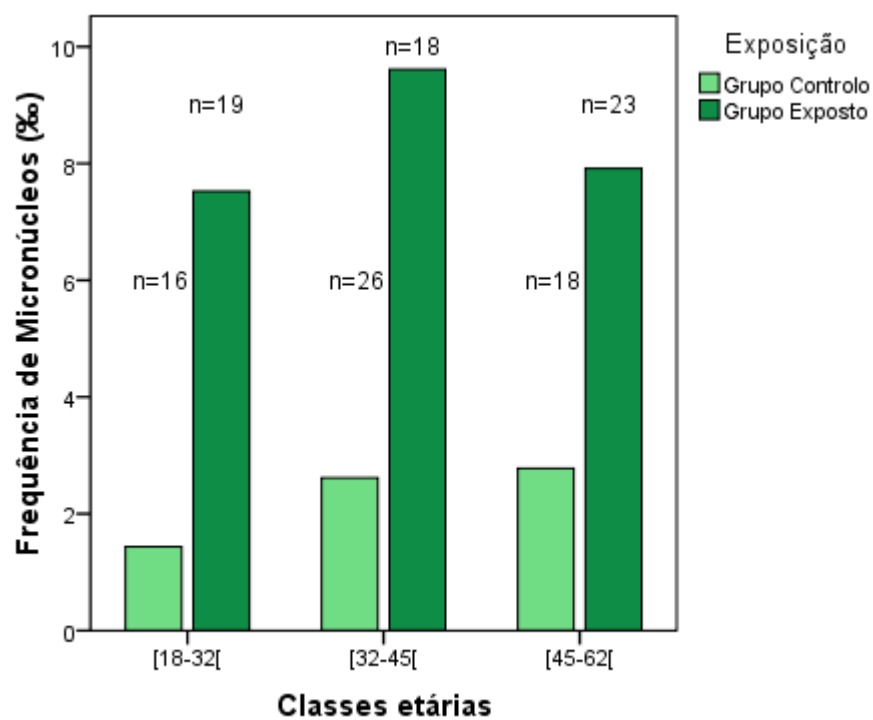


Figura 15: Distribuição da frequência de MN presentes nas populações controlo e exposta, segundo a faixa etária dos indivíduos.

3.1.4 Influência dos hábitos tabágicos

Os resultados obtidos para a influência dos hábitos tabágicos na frequência de MN estão presentes na tabela 8 e figura 16. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre fumadores e não fumadores. De referir que a percentagem de fumadores na população controlo e na população exposta é bastante baixa (12% e 7% respectivamente).

Tabela 8: Valores médios de MN nos grupos exposto e controlo segundo o efeito de hábitos tabágicos.

Grupo		MN (‰) ^a	N (%)
Controlo	Fumadores	1,71±0,36 (1-3)	7(12)
	Não fumadores	2,43±0,26 (0-9)	53(88)
Exposto	Fumadores	6,75±2,06 (3-12)	4(7)
	Não fumadores	8,41±0,52 (1-19)	56(93)

^aMédia±SE (intervalo)

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

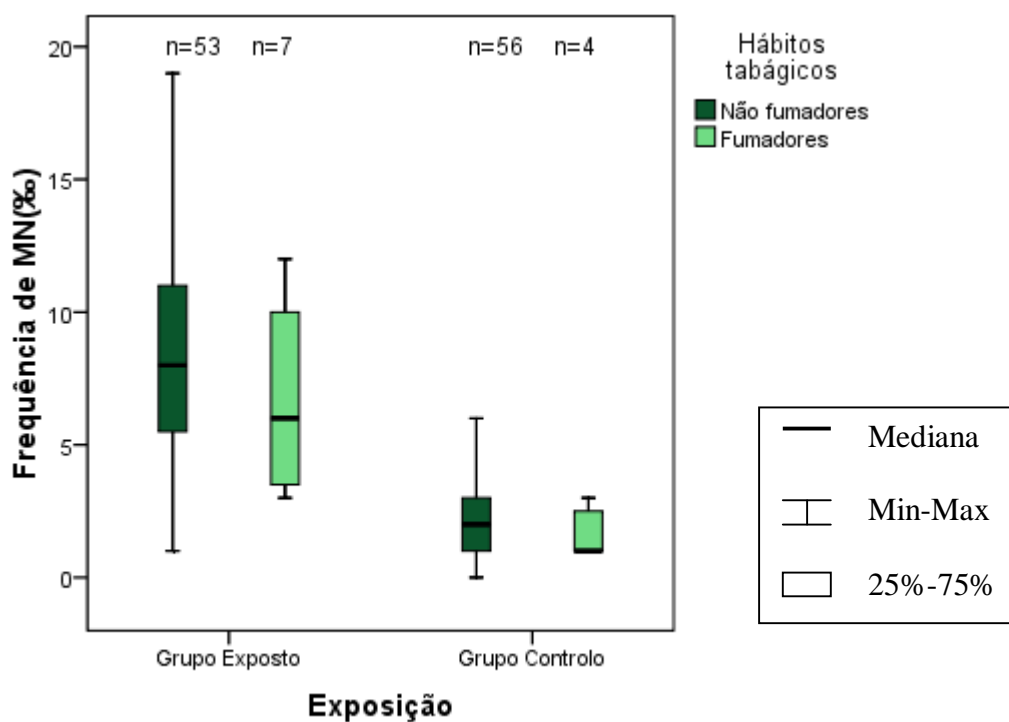


Figura 16: Distribuição das frequências de MN nos grupos controlo e exposto de acordo com os hábitos tabágicos.

3.2 Características do local e de hábitos de trabalho

3.2.1 Local de trabalho

Uma vez que os indivíduos do grupo exposto se dividem em locais de trabalho distintos, foi avaliada esta possível influência na frequência de MN. Os resultados obtidos, presentes na tabela 9, não foram estatisticamente significativos. Na figura 17 podemos observar um aumento de dano genético nos indivíduos que laboram ao ar livre quando comparados com os indivíduos que trabalham exclusivamente em estufas. De notar, também, que a grande maioria (n=46) dos indivíduos trabalham em ambos os locais, estufas e ar livre.

Tabela 9: Valores médios de MN no grupo exposto consoante o seu local de trabalho.

Grupo Exposto		MN (‰) ^a	N (%)
Local de trabalho	Estufas	4,20±0,97 (3-8)	5(8)
	Ar livre	9,75±0,86 (8-12)	4(7)
	Armazém	9,25±0,95 (8-12)	4(7)
	Estufas/Ar livre	8,30±0,56 (1-16)	46(78)

^aMédia±SE (intervalo)

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

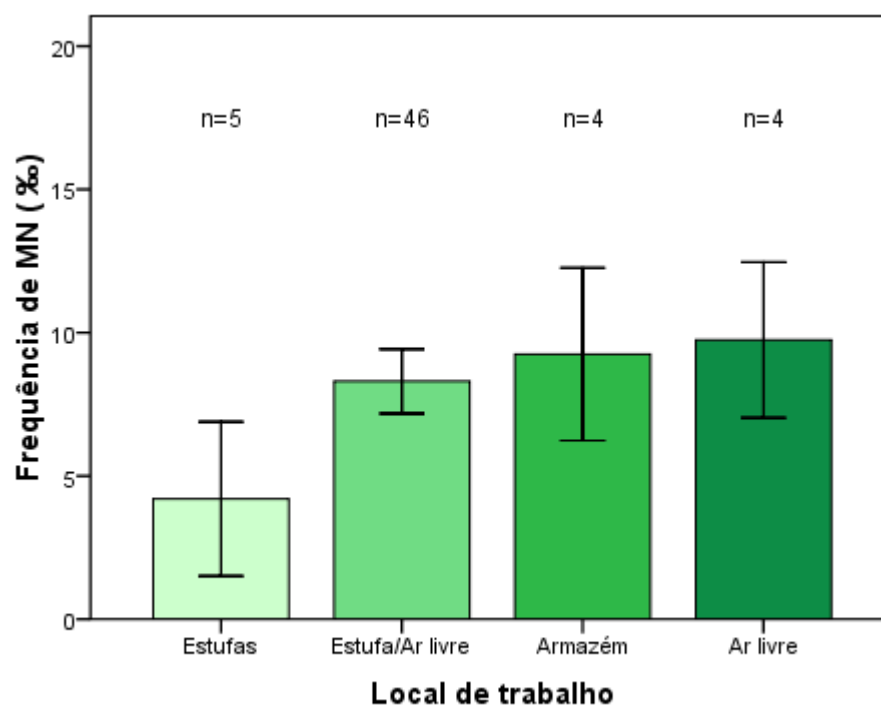


Figura 17: Distribuição da frequência de MN presentes na população exposta, segundo o local de trabalho, estufas, ar livre e armazém. (Barras de erro indicativas de SE).

3.2.2 Preparação e aplicação de pesticidas

Os resultados obtidos na frequência de MN tanto para os indivíduos que preparam a calda do pesticida como para os indivíduos que aplicam o pesticida, são similares. Estes dois grupos apresentam valores de dano genético superiores aos indivíduos que apenas assistem às actividades, não se envolvendo directamente, e também superiores aos indivíduos que realizam ambas as actividades, como se pode ver na figura 18.

As variações não são estatisticamente significativas e é de notar, na tabela 10, que a grande maioria da população está envolvida em ambas as actividades, 64%. Os indivíduos que realizam apenas uma das tarefas representam uma pequena percentagem, 16% do total. Os restantes 20% desempenham outras funções como manutenção ou descargas na exploração agrícola.

Tabela 10: Valores médios de MN no grupo exposto segundo o envolvimento dos indivíduos na preparação e/ou aplicação do pesticida.

Grupo Exposto		MN (‰) ^a	N (%)
Funções dos indivíduos	Preparadores	11,20±2,06 (6-16)	5(9)
	Aplicadores	11,25±0,63 (10-13)	4(7)
	Preparadores e aplicadores	7,19±0,56 (1-14)	36(64)
	Assistentes	8,55±1,23 (1-14)	11(20)

^aMédia±SE (intervalo)

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

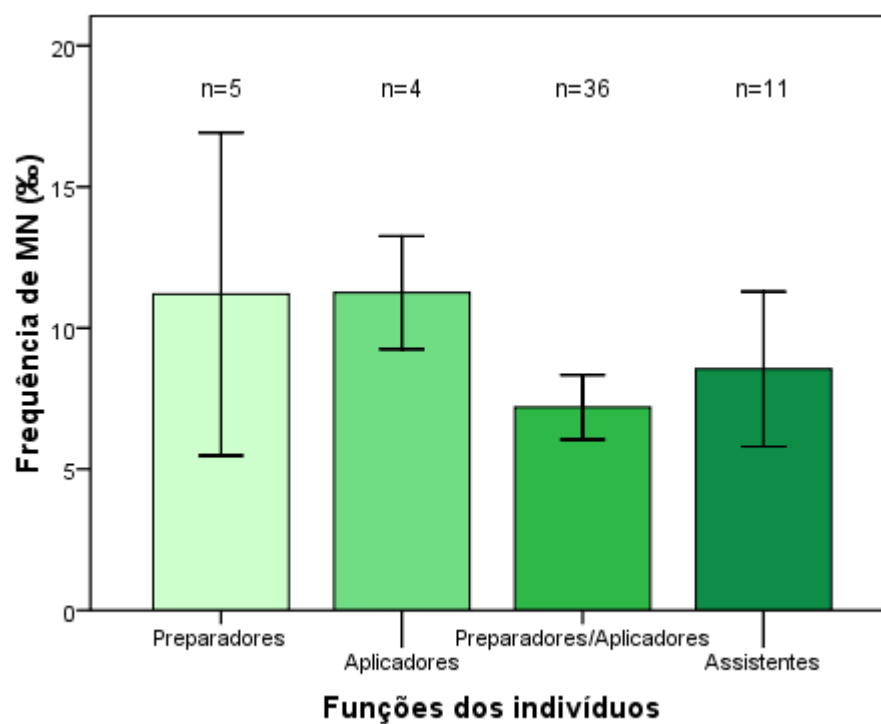


Figura 18: Distribuição da frequência de MN nos indivíduos do grupo exposto segundo as suas funções na exploração agrícola. (Barras de erro indicativas de SE).

3.2.3 Utilização de equipamento de protecção individual

A utilização de EPI no seu máximo de protecção está presente em apenas 36% da população exposta, como se pode verificar na tabela 11. A diferença na frequência de MN entre os indivíduos que usam este equipamento em comparação com os que não usam não é significativa apesar de ser possível verificar um aumento no dano genético nestes últimos (ver figura 19).

Tabela 11: Valores médios de MN no grupo exposto segundo a utilização de equipamento de protecção individual.

Grupo Exposto		MN (‰) ^a	N (%)
Equipamento de protecção individual	Utiliza	7,56±0,25 (2-14)	16(36)
	Não utiliza	8,24±0,12 (1-16)	29(65)

^aMédia±SE (intervalo)

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

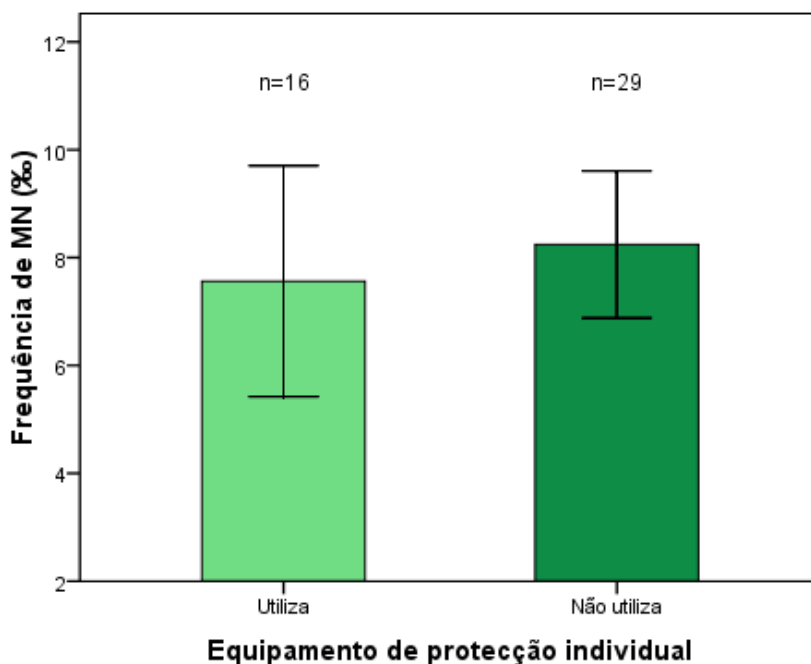


Figura 19: Distribuição da frequência de MN presentes na população exposta de acordo com a utilização de equipamento de protecção individual. (Barras de erro indicativas de SE).

3.3 Índice de toxicidade do pesticida

Os resultados obtidos demonstram um acréscimo de dano genético nos grupos de indivíduos pertencentes às três classes de toxicidade mais elevadas como se pode constatar na figura 20. Estes índices correspondem a fases de risco de toxicidade associadas à inalação. No entanto a frequência de MN mais elevada apresenta-se no índice 1.

A grande maioria dos indivíduos, 59%, utiliza compostos com índice de toxicidade 3 seguidos dos índices 1, 4 e 2 com representatividade de 20%, 12% e 10% respectivamente (ver tabela 12).

Tabela 12: Valores médios de MN no grupo exposto segundo o índice de toxicidade associado ao pesticida utilizado.

Grupo Exposto		MN (‰) ^a	N (%)
Índice de toxicidade	1	9,30±1,27 (4-16)	10(20)
	2	6,80±1,16 (4-10)	5(10)
	3	7,56±0,75 (1-16)	30(59)
	4	8,83±1,25 (5-14)	6(12)

^aMédia±SE (intervalo)

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

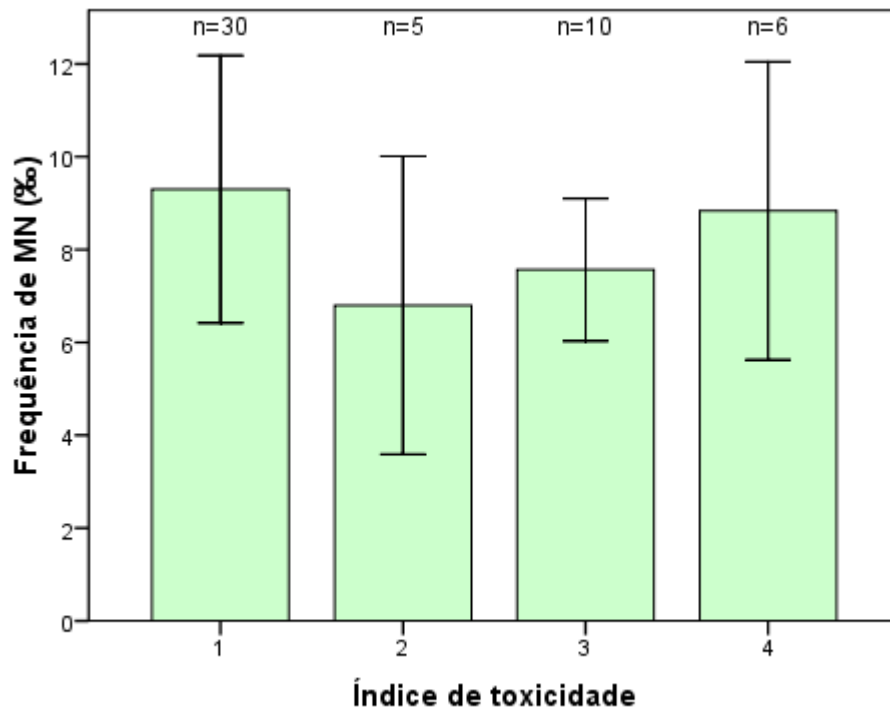


Figura 20: Associação entre a frequência de MN no grupo exposto e o índice de toxicidade do pesticida utilizado. (Barras de erro indicativas de SE).

3.4 Relação perfil de risco com a frequência de MN

Os perfis de risco associado às diferentes exposições a que estão sujeitos os indivíduos foram calculados através da fórmula, já mencionada e foram obtidos perfis de A a F, não obtendo qualquer sujeito, os níveis máximos de risco (G e H) como se vê na tabela 13.

A partir da figura 21 é possível notar um aumento na frequência de MN consoante o risco associado nos indivíduos identificados como B, C e D. Ocorre um ligeiro decréscimo no perfil E mas no F a tendência de aumento mantém-se com o valor mais elevado destes perfis. O perfil A, apesar de ser o de menor risco associado, apresentou aqui o valor mais elevado de número de MN.

Tabela 13: Valores médios de MN no grupo exposto segundo o perfil de risco associado a cada indivíduo.

Grupo Exposto		MN (%) ^a	N (%)
Perfil de risco	A	10,86±1,39 (4-16)	7 (14)
	B	5 -	1 (2)
	C	7,29±0,83 (1-14)	24(47)
	D	8,00±1,08 (3-14)	9 (18)
	E	7,71±2,60 (3-16)	7 (14)
	F	8,33±0,22 (8-9)	3 (6)

^aMédia±SE (intervalo)

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

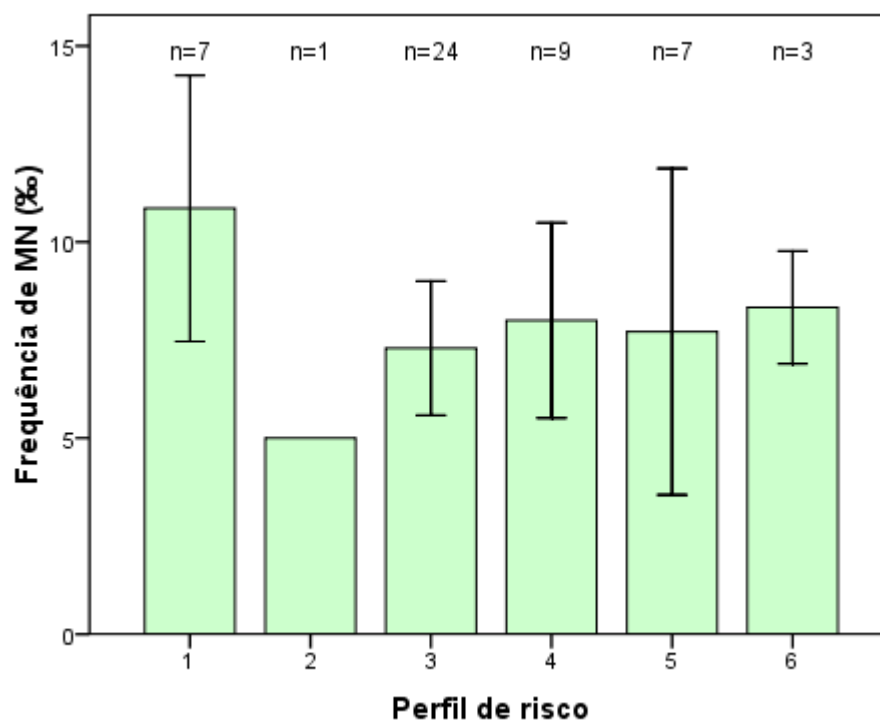


Figura 21: Associação entre a frequência de MN no grupo exposto e o perfil associado de risco. (Barras de erro indicativas de SE).

Discussão dos resultados

Nos anos mais recentes tem-se vindo a acentuar a preocupação quanto à exposição de determinados grupos da população a algumas substâncias químicas, como são exemplo os produtos fitofarmacêuticos em trabalhadores agrícolas, que poderão causar efeitos nocivos na saúde pública.

Diversos autores têm vindo a associar a estes compostos químicos, um carácter de genotoxicidade. Estes compostos por ligações covalentes ao ADN podem levar ao aparecimento de alterações cromossómicas que por sua vez promovem o início de um processo químico de carcinogénese (Keith e Dirheimer, 1995; Gebel *et al.*, 1997).

Os resultados obtidos neste trabalho permitem fazer uma associação entre o dano genotóxico, precursor de cancro e a exposição ocupacional a pesticidas.

A utilização do biomarcador de efeito, teste do MN, demonstrou um aumento significativo ($p < 0,001$) na frequência de MN no grupo exposto quando comparado com o grupo controlo.

Verifica-se na figura 13, correspondente à distribuição da frequência de MN por 4 classes distintas, que os indivíduos trabalhadores de explorações agrícolas apresentam valores de MN mais elevados que o grupo controlo e esse aumento é crescente ao longo das classes de MN.

Relativamente ao grupo controlo, denotam-se resultados similares aos obtidos noutros estudos, onde a maior percentagem de indivíduos encontra-se na classe mais baixa de MN (Bolognesi, 2003). A presença de MN na população controlo corresponde ao número basal de dano genético que ocorre naturalmente no organismo.

Esta associação entre a presença de MN e a manifestação de patologia oncológica é indicativa de que esta população poderá no futuro apresentar uma taxa de incidência de determinados cancros mais elevada que outra população não exposta a este tipo de produtos químicos. Esta inferência não é portanto aplicada ao indivíduo em si, uma vez que a ocorrência de cancro advém de diversos factores intrínsecos e extrínsecos ao indivíduo que influenciam o aparecimento de cancro, o seu tipo e também a forma de recuperação/combate à doença.

Os dados obtidos são concordantes com um estudo realizado em 2005 com um grupo de indivíduos do sexo feminino no Chile, onde se obteve resultados similares (Marquez *et al.*, 2005). As trabalhadoras neste estudo dedicavam-se ao cultivo e apanha de diferentes frutos, durante a Primavera e Verão, numa exploração agrícola e utilizavam

diferentes tipos de produtos fitofarmacêuticos nas culturas. De referir que não eram utilizados quaisquer tipos de equipamento de protecção individual durante as actividades laborais. Foram recolhidas amostras de sangue e aplicou-se o teste dos MN, a linfócitos, na população exposta (64 indivíduos) e população controlo (30 indivíduos). Nos resultados obtidos verifica-se uma diferença significativa entre grupo exposto e grupo controlo, 4 vezes superior no primeiro e com um grau de significância de $p < 0.001$.

Resultados semelhantes foram obtidos por Pasquini (1996) para uma população de 48 agricultores expostos a uma mistura de pesticidas que incluía insecticidas, fungicidas e herbicidas. A população exposta apresentava um aumento de MN quando comparado com a população controlo de 50 indivíduos. Neste estudo verificou-se dano genético assim como uma diminuição significativa do índice de proliferação celular nos linfócitos provocada pela exposição aos compostos químicos utilizados na agricultura.

Na Europa, existem numerosos estudos que avaliam a toxicidade de pesticidas, um exemplo é o projecto de Bolognesi (2002) com trabalhadores de culturas de flores e produtos hortícolas em Liguria na Itália. O grupo exposto (107 indivíduos) a diferentes misturas de pesticidas apresentou uma frequência de MN em linfócitos de sangue periférico quase 2 vezes superior ao grupo controlo (61 indivíduos), $p < 0,001$.

Existem também estudos com o intuito de avaliar o dano genético em trabalhadores da indústria produtora de pesticidas, nomeadamente um estudo realizado no Paquistão por Bhalli (2006). Este estudo pretendeu avaliar a frequência de MN em linfócitos, numa população constituída por 29 indivíduos do grupo exposto e 35 do grupo controlo.

A exposição destes indivíduos dá-se aquando da preparação da mistura de pesticidas (calda) constituída principalmente por organofosforados e piretróides.

Os resultados obtidos revelam a existência de efeito genotóxico devido à exposição a pesticidas. Este efeito revela-se com um aumento 2 vezes superior na frequência de MN do grupo exposto em comparação com o grupo controlo, $p < 0,001$.

Quanto aos outros biomarcadores utilizados, também os valores de colinesterase sérica (indicador da inibição da acetilcolinesterase em células nervosas) apresenta uma diminuição significativa, ao mesmo tempo que os níveis de determinadas enzimas hepáticas sofreram aumentos estatisticamente significativos.

Todavia, um estudo realizado na Grécia por Pastor (2001a), com o objectivo de avaliar a exposição de agricultores (50 indivíduos), numa região com um forte sector agrícola e com uma elevada densidade de estufas obteve resultados contrários. Os biomarcadores utilizados foram o teste de MN em linfócitos e também em células exfoliadas da mucosa bucal. O grupo controlo (66 indivíduos) pertencia igualmente à mesma zona de residência. A análise de dados revelou a ausência de uma diferença estatística para ambos os testes.

Também, em 2001 na Polónia, o mesmo grupo de investigação (Pastor *et al.*, 2001b) obteve resultados indicativos da ausência de dano genético em 49 indivíduos do sexo masculino expostos a uma mistura de pesticidas (maioritariamente insecticidas e fungicidas compostos por carbamatos, organofosforados e piretróides) durante a sua ocupação profissional quando em comparação com 50 indivíduos do grupo controlo. Os testes realizados foram o teste do MN tanto em células bucais como em linfócitos de sangue periférico e não se obtiveram diferenças significativas.

Por outro lado obteve resultados significativos no que diz respeito ao número de abortos espontâneos ocorridos nesta população exposta quando comparada com o grupo controlo. Os dados obtidos demonstraram haver uma correlação positiva para o aumento de abortos com a exposição a pesticidas, com uma probabilidade de 4% no controlo para 22% na população exposta. Estes resultados são também apoiados por outros estudos, (Abell *et al.*, 2000; Petrelli *et al.*, 2000)

Este tipo de estudos, de avaliação de possíveis efeitos de pesticidas sobre a saúde humana é comum na literatura, no entanto não existe ainda um consenso definitivo quanto à toxicidade dos pesticidas uma vez que os factores que promovem a variação de resultados são numerosos.

Como verificado por diferentes autores e já referido anteriormente, nos estudos de biomonitorização de populações expostas, características como sexo, idade, hábitos tabágicos e alimentares, são factores capazes de enviesar os parâmetros que se pretendem avaliar (Maluf, 2004; Iarmarcovai *et al.*, 2007).

Sexo:

A influência do género nas frequências de MN, neste estudo, demonstrou que o sexo feminino apresenta valores de dano genético superiores ao sexo masculino. Esta diferença, apesar de ligeira está presente em ambos os grupos em estudo.

Diversos estudos têm demonstrado esta associação entre género e MN. Sexo e idade são consideradas as variáveis demográficas que mais influenciam a frequência de MN em linfócitos humanos, apesar de neste estudo a diferença não ser significativa confirmando resultados obtidos por outros autores (Carbonell *et al.*, 1993; Gomez-Arroyo *et al.*, 2000).

Fenech (1998) apresenta resultados em que a frequência de MN em mulheres é 1,2 a 1,6 vezes mais elevada que a encontrada nos homens, aumentando significativamente e de forma gradual com a idade.

Uma possível explicação para justificar esta influência deve-se ao facto do cromossoma X aparecer mais frequentemente em MN do que seria expectável assumindo igual probabilidade para todos os cromossomas de surgir num MN (Catalan *et al.*, 1998; Bukvic *et al.*, 2001; Bolognesi *et al.*, 2002). Ou seja, parece haver uma maior probabilidade de eventos aneuploidogénicos ocorrerem associados ao cromossoma X (Barale *et al.*, 1998).

Idade:

Os resultados obtidos referentes à idade demonstram o efeito esperado, apesar de não significativo. O grupo controlo apresenta uma diferença perto do nível de significância onde a frequência de MN aumenta com a idade.

O grupo exposto apresenta um valor de MN mais elevado na classe intermédia. Isto deve-se provavelmente ao facto de se tratar de uma classe representativa de indivíduos cujo volume de trabalho é maior por apresentarem maior experiência e força de trabalho.

Estes resultados são similares aos obtidos por outros autores como Lucero (2000) num estudo realizado numa população de trabalhadores agrícolas de estufas, residentes em Espanha e expostos a pesticidas. Este autor apresenta uma correlação positiva, apesar de não significativa, entre a frequência de MN e a idade (Sailaja *et al.*, 2006; Remor *et al.*, 2009).

Segundo Bolognesi (1999) ocorre um aumento espontâneo da instabilidade cromossomal associado à idade que se reflecte com o aumento do número basal de MN. A formação de MN pode resultar de perturbações no fuso mitótico que levam a atrasos na ascensão aos pólos dos cromossomas durante a anafase (El-Khatib e Hammam, 2003). A acumulação de dano genético pode também advir da ocorrência de quebra de cadeias de ADN e à progressiva diminuição de reconhecimento de danos e fenómenos de reparação (Barnett e King, 1995).

Hábitos tabágicos:

Neste estudo não se verificou a influência dos hábitos tabágicos no biomarcador estudado.

Surpreendentemente verificou-se que os não fumadores em ambos os grupos apresentavam uma frequência de MN ligeiramente superior aos fumadores. Isto deve-se provavelmente ao baixo número de indivíduos fumadores presentes em ambas as populações em estudo o que poderá ter provocado o enviesamento dos resultados.

Resultados semelhantes foram obtidos por Costa (2006) num estudo de uma população agrícola em Portugal e uma população controlo, ambas com 33 indivíduos. Neste estudo a frequência de MN não foi influenciada pelos hábitos tabágicos, no entanto outros marcadores utilizados como AC e identificação de células aneuplóides (células cujo número de cromossomas encontra-se alterado) apresentaram resultados estatisticamente significativos, onde os fumadores de ambos os grupos apresentaram dano genético elevado.

Bonassi (2003), recorrendo a resultados obtidos no projecto HUMN referentes ao efeito dos hábitos tabágicos na frequência de MN, justifica a fraca ou inexistente correlação com o facto de os químicos presentes no fumo do cigarro apresentarem uma concentração mais baixa no sangue do que nos outros órgãos, como os pulmões. Assim, os danos provocados em células sanguíneas não são passíveis de serem analisados com recurso ao teste do MN.

Local de trabalho:

O local de trabalho nas explorações agrícolas tem elevada importância porque corresponde a uma maior ou menor exposição por parte dos indivíduos. Grande parte dos estudos indica uma maior predominância de dano genético em indivíduos que trabalham exclusivamente em estufas quando comparados com trabalhadores que exercem as mesmas funções ao ar livre (Gómez-Arroyo *et al.*, 2000; Bolognesi *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2007). Esta diferença deve-se principalmente ao tipo de ambiente gerado nas estufas onde altas temperaturas e elevados índices de humidade promovem uma maior concentração do ar respirado (que contém o pesticida aplicado). Por outro lado, ao ar livre ocorre maior dispersão do produto estando assim os indivíduos menos expostos.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram uma maior frequência de MN nos indivíduos que trabalham exclusivamente ao ar livre quando comparados com os trabalhadores de estufas. Apesar de os resultados não serem estatisticamente significativos, estas diferenças devem-se provavelmente à fraca distribuição da amostra presente pelos locais de trabalho.

É também possível que tenha ocorrido enviesamento dos resultados uma vez que a população referente ao ar livre apresenta características vistas como potenciais indutoras de maior frequência de MN. Assim, este grupo é maioritariamente constituído por indivíduos de uma faixa etária mais elevada que não utilizam, com excepção de um indivíduo, o EPI e também executam tarefas como preparação e aplicação do produto. A população que trabalha em estufas pertence a uma faixa etária mais baixa, é constituída maioritariamente por elementos do sexo masculino e nem todos participam na aplicação e/ou preparação do pesticida.

Os elevados valores na frequência de MN presentes nos trabalhadores de armazém podem ser explicados na medida em que estes poderão apresentar um falso sentimento de segurança que os leva a um manuseamento directo do produto em ambiente fechado sem utilização de EPI.

Tarefas laborais:

No que se refere às tarefas exercidas pelos trabalhadores, os resultados não demonstraram diferenças significativas ao mesmo tempo que denotam uma maior frequência de MN nos grupos de indivíduos que levam a cabo apenas uma das tarefas: preparação da calda ou aplicação. Resultados similares foram descritos por outros autores (Barbosa e Bonin, 1994; Titenko-Holland *et al.*, 1997).

Os indivíduos pertencentes ao grupo que apenas assistem às tarefas, não estando directamente envolvidos nelas, aparecem como um terceiro grupo com maior frequência de MN, tal pode dever-se à falsa concepção de segurança, por parte destes trabalhadores, que uma vez não envolvidos nas actividades descaram o uso de EPI, acabando por estar muito expostos ao produto.

O valor mais baixo de frequência de MN apresentado pelo grupo de indivíduos que praticam ambas as tarefas pode ser explicado com base no número de indivíduos desta amostra. Como a distribuição não é homogénea pode ter ocorrido o enviesamento dos resultados, uma vez que os aplicadores são apenas 5, os preparadores 4 enquanto que os indivíduos em ambas as actividades representam 64% do total com 36 indivíduos.

A maioria dos estudos presentes na literatura refere os aplicadores de pesticidas como o grupo mais exposto (Pasquini *et al.*, 1996; Gordana *et al.*, 1997). Numa revisão realizada por Bolognesi (2003) refere que 18 em 27 estudos de biomonitorização de agricultores aplicadores de misturas de pesticidas os resultados são positivos e apenas 2 em 10 obtiveram resultados negativos.

A aplicação do produto é feita normalmente através de spray acabando por envolver o indivíduo numa nuvem de produtos tóxicos, aumentando assim a probabilidade de contacto dérmico e inalação do produto. Gordana (1997) realizou um

estudo com 15 indivíduos trabalhadores numa exploração agrícola. Amostras de sangue foram colhidas em três momentos: antes da aplicação, um mês após e no fim da época de aplicação. O teste do MN foi aplicado a linfócitos e os resultados obtidos demonstram um aumento de dano genético após as aplicações e outro aumento significativo no fim da época de aplicação.

Utilização de EPI:

O uso de EPI é considerado por diversos autores como um factor determinante na protecção do indivíduo à exposição a produtos fitofarmacêuticos (Lander *et al.*, 2000; Shaham *et al.*, 2001; Bolognesi *et al.*, 2002). Estes resultados enfatizam a importância do uso de medidas de protecção de forma a prevenir o contacto directo com o pesticida durante as diferentes actividades agrícolas como a preparação da calda e sua aplicação mas também durante a manutenção da cultura e sua colheita.

Os resultados obtidos neste estudo mostram um aumento (não significativo) do dano genético em indivíduos que não utilizam o EPI durante a sua actividade laboral. Esta falta de uso de equipamento pode também traduzir-se numa falta de outras medidas de segurança e higiene no trabalho, como troca de roupa e lavagem de mãos após o trabalho, ingestão de alimentos e bebidas durante o trabalho, entre outras.

Índice de toxicidade do pesticida e perfil de risco associado:

A avaliação do índice de toxicidade do pesticida e a sua influência nos indivíduos revelou-se como esperado nos três índices mais altos. Assim, maior dano genético foi observado numa ordem crescente com os índices 2, 3 e 4.

Uma possível justificação para o valor de MN representado no índice 1 resultará de um agrupamento ao acaso de indivíduos na sua grande maioria com idades pertencentes à faixa etária de maior frequência de MN, [32,45[.

Uma análise aos resultados anteriores e ao perfil de risco permite verificar uma forte relação entre o índice de toxicidade atribuído ao produto fitofarmacêutico e o perfil associado ao indivíduo.

Assim, é plausível inferir uma sobrevalorização do índice de toxicidade do pesticida na fórmula aplicada para atribuição de perfil de risco, uma vez que os resultados obtidos permitem relacionar o índice 1 com o perfil A, ambos representativos do nível mais baixo de exposição e no entanto com a frequência de MN mais alta.

Também, é de notar uma tendência crescente de dano genético, nos restantes perfis de risco associados a um aumento de toxicidade do produto utilizado.

Este modelo está ainda em fase de validação, como já referido e pode ser utilizado em casos em que a monitorização biológica, por razões técnicas ou económicas,

não possa realizar-se mas também como complemento de estudos, como este, de forma a relacionar de forma mais precisa o grau de exposição com o risco associado.

De qualquer das formas, é possível referir que para além da possível sobrevalorização da toxicidade do pesticida, o grau de formação do indivíduo é também incluído na fórmula de cálculo na mesma grandeza que os outros factores, muitas vezes não correspondendo à realidade. Ou seja, uma maior formação não implica obrigatoriamente um crescente cuidado nas actividades laborais de forma a diminuir o risco/exposição.

A variação no grau de exposição, diferentes atribuições de perfis de risco e o uso comum de diferentes misturas de químicos, por parte dos trabalhadores, levam muitas vezes à obtenção de resultados distintos entre estudos e resultam muitas vezes na publicação de resultados distintos.

Conclusão

A exposição ocupacional a produtos fitofarmacêuticos tem sido associada a um aumento de dano genético. Existem numerosos estudos epidemiológicos para determinar a relação entre a exposição a pesticidas e o aparecimento de efeitos nefastos na saúde. No entanto, grande parte destes estudos apresentam falhas na componente de avaliação de risco e em termos de fornecimento de dados comparáveis (Barr e Needham, 2002).

Estas falhas advêm do facto de cada exposição ser por si só bastante distinta e característica da população. Assim, cada população tem diferentes estilos de vida, diferentes hábitos sociais e laborais que se traduzem na forma de cultivo, tipo e forma de aplicação do pesticida.

É de referir que o uso comum de diversas misturas de pesticidas dificulta também a associação entre o efeito e o composto ou classe química. Desta forma, as estratégias de biomonitorização utilizadas para avaliar a exposição de determinados grupos populacionais devem ser cautelosas para evitar comparações directas entre diferentes grupos, exposições similares e resultados citogenéticos.

Torna-se portanto evidente a importância deste tipo de estudos focados em populações distintas com base em indicadores simples e de rápida informação sobre o sector e hábitos laborais.

Neste projecto, os resultados indicam a influência destes produtos na formação de MN, indicadores de dano genético. O grupo de agricultores apresenta valores de MN quatro vezes superiores aos indivíduos do grupo controlo, demonstrando uma diferença significativa ($p < 0,001$).

Os factores demográficos como sexo e idade não denotaram diferenças estatísticas, apesar de indivíduos do sexo feminino e indivíduos pertencentes a classes etárias correspondentes a maior carga de trabalho apresentarem frequências de MN mais elevadas.

Os hábitos tabágicos não induziram alterações significativas, contudo é de notar o reduzido número de fumadores que pode questionar o significado estatístico deste resultado.

Os dados relativos ao local e hábitos de trabalho como preparação e aplicação do produto e uso de EPI também não revelaram diferença significativas, notando-se, no entanto, frequências de MN mais elevadas em indivíduos aplicadores de pesticidas quando comparados com indivíduos preparadores e assistentes e também um incremento de MN em sujeitos que descuram o uso de EPI.

A aplicação de um modelo de avaliação de risco, foi realizada numa tentativa de ir de encontro ao pressuposto de que a avaliação de risco químico é obrigatória desde

1998 (Directiva 98/24/EC)⁵, no entanto, e no que se refere ao sector agrícola esta avaliação está ainda em fase de desenvolvimento e a sua aplicação ainda não é utilizada em grande escala.

Os resultados obtidos demonstram, numa forma geral, um aumento do risco associado ao perfil atribuído aos indivíduos. Contudo, nota-se uma forte associação entre o índice de toxicidade do produto e o perfil de risco o que poderá levar a interpretações erróneas uma vez que, como já referido, há uma possível sobrevalorização deste índice assim como há que ter em conta também que a aquisição de práticas de segurança laborais são de extrema importância na prevenção de danos na saúde.

Em suma, é possível referir que as condições no local de trabalho e os hábitos laborais devem ser melhorados de forma a minimizar possíveis danos na saúde de trabalhadores agrícolas. Também, estudos realizados em populações expostas devem ter em atenção a descrição das condições inerentes ao local, às características dos indivíduos e aos resultados obtidos de forma a permitir uma comparação de resultados e desta forma inferir sobre possíveis medidas de redução de riscos.

⁵ Directiva 98/24/EC do Conselho, de 7 de Abril de 1998, relativa à protecção da saúde e segurança de trabalhadores exposto a químicos no local de trabalho. Jornal Oficial nº L 131 de 05/05/1998 p.11–23.

Bibliografia

- Abell, A., Juul, S. e Bonde, J.P. (2000). "Time to pregnancy among female greenhouse workers." Scandinavian Journal of Work, Environment & Health **26**: 131-36.
- Abrantes, N., Pereira, R.e Gonçalves, F. (2006). "First step for an ecological risk assessment to evaluate the impact of diffuse pollution in Lake Vela (Portugal)." Environment Monitoring and Assessment **117**(1-3): 411-31.
- Aitio, A.e Kallio, A. (1999). "Exposure effect monitoring: a critical appraisal of their practical application." Toxicology Letters **108**(2-3): 137-47.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D.e Aitio, A. (2000). "IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety." mutation Research **463**(2): 111-72.
- Albertini Rj, Anderson D, Douglas Gr, Hagmar L, Hemminki Ke Merlo F (2000). "IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety." Mutat Res **463**: 111-72.
- Amaro, P. (2009). É indispensável e urgente reduzir os elevados riscos de mortalidade das abelhas pelos pesticidas. Fórum Nacional de Apicultura, Ourém.
- Amorim, L. C. A. (2003). "Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação dos agentes químicos ambientais." Revista Brasileira de Epidemiologia **6**(1): 1-13.
- Angerer, J., Ewers, U.e Wilhelm, M. (2007). "Human biomonitoring: State of the art." International Journal of Hygiene and Environmental Health **210**(3-4): 201-28.
- Arbuckle, T. E., Lin, Z.e Mery, L. S. (2001). "An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population." Environmental Health Perspectives **109**(8): 851-57.
- Barale, R., Chelotti, L., Davini, T., Del Ry, S., Andreassi, M. G., Ballardini, M., Bulleri, M., He, J. L., Baldacci, S., Di Pede, F., Gemignani, F.e Landi, S. (1998). "Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle." Environmental and Molecular Mutagenesis **31**(3): 228-42.
- Barbosa, A. e Bonin, A.M. (1994). "Evaluation of phosphine genotoxicity at occupational levels of exposure in New South Wales, Australia." Journal of Occupational and Environmental Medicine **51**: 700-05.
- Barnett, Y. A.e King, C. M. (1995). "An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans." Mutation Research/DNAging **338**(1-6): 115-28.
- Barr, D. B.e Needham, L. L. (2002). "Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review." Journal of Chromatography B **778**(1-2): 5-29.
- Barthel, E. (1981). "Increased risk of lung cancer in pesticide-exposed male agricultural workers." Journal of Toxicology Environmental Health **8**: 1027-40.
- Blair, A. (1990). "Herbicides and non-Hodgkin's lymphoma: new evidence from a study of Saskatchewan farmers." Journal of The National Cancer Institute **82**: 544-45.
- Blair, A.e Zahm, S. H. (1995). "Agricultural exposures and cancer." Environmental Health Perspectives **103**: 205-08.
- Blair, A.e Zahm, S.H. (1990). "Herbicides and cancer: a review and discussion of methodologic issues. Recent Results." Cancer Research **120**: 132-45.

- Blount, Bc., Mack, Mm. , Wehr, Cm. , Macgregor, Jt., Hiatt, Ra.e Wang, G. (1997). "Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**: 3290-95.
- Bocker, W., Muller, W.U. e Streffer, C. (1995). "Image processing algorithms for the automated micronucleus assay in binucleated human lymphocytes." Cytometry **19**: 283-94.
- Bolognesi, C, Lando, C, Forni, A, Landini, E., Scarpato, R., Migliore, Le Bonassi, S (1999). "Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes." Age and Ageing **28**(4): 393-97.
- Bolognesi, C. (2003). "Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies." Mutation Research/Reviews in Mutation Research **543**(3): 251-72.
- Bolognesi, C., Perrone, E.e Landini, E. (2002). "Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy " Mutagenesis **17**(5): 391-97.
- Bonassi, Se Au, Ww (2002). "Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction." mutation Research **511**: 73-86.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska- Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliori, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H.e Fenech, M. (2007). "An increase in micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans." Carcinogenesis **28**(3): 625-31.
- Bonassi, Stefano, Neri, Monica, Lando, Cecilia, Ceppi, Marcello, Lin, Yi-Ping, Chang, Wushou P., Holland, Nina, Kirsch-Volders, Micheline, Zeiger, Errole Fenech, Michael (2003). "Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project." Mutation Research/Reviews in Mutation Research **543**(2): 155-66.
- Bukvic, N., Gentile, M., Susca, F., Fanelli, M., Serio, G., Buonadonna, L., Capurso, A.e Guanti, G. (2001). "Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians." Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **498**(1-2): 159-67.
- Calderbank, A. (1989). "The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil." Reviews of Environmental Contamination and Toxicology **108**: 71-103.
- Carbonell, E. , Xamena, N. , Creus, A. e Marcos, R. (1993). "Cytogenetic biomonitoring in a Spanish group of agricultural workers exposed to pesticides." Mutagenesis **8**: 511-17.
- Caria, H., Chaveca, T., Laires, A.e Rueff, J. (1995). "Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes." Mutation Research/Genetic Toxicology **343**(2-3): 85-94.
- Catalan, J., Autio, K., Kuosma, E.e Norppa, H. (1998). "Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man." American Journal of Human Genetics **63**(5): 1464-72.
- Cecchine, G., Golomb, B. A., Hilborne, L. H., Spektor, D. M.e Anthony, C. R. (2000). Pesticides. A review of the scientific literature as it pertains to Gulf War illnesses, Rand Corp Santa Monica CA. **8**.

- Costa, C. (2008). The Portuguese Pesticide Scenario. Pesticide Research Trends. A. B. Tennefy, Nova Science Publishers, Inc: 211-39.
- Costa, C., Teixeira, J.P.e Mayan, O. (2008). Pesticides as genetic damage inducers. Progress in DNA damage research. S. M. a. S. Nakano, Nova Science Publishers: 111-63.
- Costa, Carla , Teixeira, João P. , Silva, Susana , Roma-Torres, Joana , Coelho, Patrícia , Gaspar, Jorge , Alves, Maria , Laffon, Blanca , Rueff, José Mayan, Olga (2006). "Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides." Mutagenesis **21**(5): 343-50.
- Costa, Carla, Silva, Susana, Coelho, Patrícia, Roma-Torres, Joana, Teixeira, João Pauloe Mayan, Olga (2007). "Micronucleus analysis in a Portuguese population exposed to pesticides: Preliminary survey." International Journal of Hygiene and Environmental Health **210**(3-4): 415-18.
- Costa, S. (2008). Avaliação do efeito genotóxico do formaldeído em profissionais do serviço de anatomia patológica. Escola Superior de Biotecnologia. Porto, Universidade Católica Portuguesa. **Tese de Mestrado: 105.**
- Countryman, P.I. e Heddle, J.A. (1976). "The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes." mutation Research **41**: 321-32.
- Cunha, Arlindo (1996). A agricultura europeia na encruzilhada, Edições ASA.
- Decordier, I. , Papine, A. , Plas, G. , Roesems, S. , Vande Loock, K. , Moreno-Palomo, J. , Cemeli, E. , Anderson, D. , Fucic, A. , Marcos, R. , Soussaline, F. e Kirsch-Volders, M. (2009). "Automated image analysis of cytokinesis-blocked micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring." Mutagenesis **24**: 85-93.
- Decordier, I., Dillen, L., Cundari, E.e Kirsch-Volders, M. (2002). "Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules." Mutagenesis **17**: 337-44.
- Delft, J. H. M., Baan, R. A.e Roza, L. (1998). "Biological effect markers for exposure to carcinogenic compound and their relevance for risk assessment." Critical Reviews in Toxicology **28**(5): 477-510.
- Direcção Geral Do Ambiente, Dga (2000). Relatório do Estado do Ambiente. Lisboa, Direcção Geral do Ambiente: 460 pp.
- Duffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, Al., Volot, F.e Favre, R. (1997). "Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients." Mutagenesis **12**: 227-31.
- Eaton, D. L.e Klaassen, C. D (2001). Chapter 2: Principles of toxicology. In Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill Companies: 11-34.
- Edwards, Clive A. (1993). The Impact of Pesticides on the Environment. The Pesticide Question. Lehman, Springer US: 13-45.
- El-Khatib, H. e Hammam, F. (2003). Cytogenetic biomonitoring of Egyptian workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes. Human Monitoring for Genetic Effects, NATO Science Series. A. In Cebulska-Wasilewska, Au,W.W. and Srám,R.J: 142-50.
- Emans, H.J.B., Beek, M.A.e Linders, J. (1992). Evaluation system for pesticides (ESPE) I. Agricultural pesticides. National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM). Bilthoven, Netherlands.
- Eurostat (2001). Environment pressure indicators for the EU: data 1985-98., European comission. Statistical Office of the European Commission: 165pp.

- Evans, H.J., Neary, G.J.e Williamson, F.S. (1959). "The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei." International Journal of Radiation Biology **1**: 216-29.
- Falck, G.C.M.e Norppa, H. (2003). "Review What do human micronuclei contain?" Mutagenesis **18**(3): 221-33.
- Farmer, P.B. e Emeny, J.M. (2006). Biomarkers of carcinogen exposure and early effects Lodz, Nofer Institute of Occupational Medicine.
- Farmer, Peter B.e Emeny, J. (2006). Biomarkers of carcinogen exposure and early effects. Poland, Nofer Institute of Occupational Medicine: 163pp.
- Fenech, M. (1997). "The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method." mutation Research **392**: 11-18.
- Fenech, M. (1998). "Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes - a biomarker for DNA damage in human populations." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **404**(1-2): 155-65.
- Fenech, M. (2005). "The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis." Mutagenesis **20**: 255-69.
- Fenech, M., Aitken, C.e Rinaldi, J. (1998). "Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults." Carcinogenesis **19**: 1163-71.
- Fenech, M., Chang, W.P. , Kirsch-Volders, M. , Holland, N. , Bonassi, S. e Zeiger, E. (2003). "HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures." mutation Research **534**: 65-75.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, P. W., Zeiger, E.e Bonassi, S. (1999). "The HUMAN MicroNucleus Project-An International collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans." mutation Research **428**: 271-83.
- Fenech, M.e Morley, Aa. (1985). "Measurement of micronuclei in lymphocytes." mutation Research **147**: 29-36.
- Fenech, M.e Rinaldi, Ja. (1995). "Comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians." Carcinogenesis **16**: 223-30.
- Fenech, Mf., Dreosti, Ie.e Rinaldi, Jr. (1997). "Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men." Carcinogenesis **18**: 1329-36.
- Fishel, F. (1991). "Pesticides and the Environment." University Extension University of Missouri-Columbia: 6pp.
- Garaj-Vrhovac, V.e Zeljezic, D. (2001). "Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides." Toxicology **165**(2-3): 153-62.
- Garry, Vincent F , Harkins, Mary E , Erickson, Leanna L , Long-Simpson, Leslie K , Holland, Seth E e Burroughs, Barbara L (2002). "Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA." Environmental Health Perspectives **110**(Suppl 3): 441-49.
- Gauthier, E., Forthier, I., Gourchesne, F., Pepin, P., Mortimer, J.e Gauvreau, D. (2001). "Environmental pesticide exposure as a risk for Alzheimer's disease: a case control study." Enviromental Research **86**: 37-45.

- Gebel, T., Kevekordes, S., Pav, K., Edenharder, R.e Dunkelberg, H. (1997). "In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test." Arch Toxicol **71**: 193-97.
- Gomes, J., Lloyd, O.L.e Revitt, D.M. (1999). "The influence of personal protection, environmental hygiene and exposure to pesticide on the health of immigrant farm workers in a desert country." International Archives of Occupational and Environmental Health **72**: 40-45.
- Gomez-Arroyo, S., Diaz-Sanchez, Y., Meneses-Perez, M. A., Villalobos-Pietrini, R.e Leon-Rodriguez, J. (2000). "Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides." mutation Research **466**: 117-24.
- Gómez-Arroyo, Sandra, Díaz-Sánchez, Yooko, Meneses-Pérez, M. Angel, Villalobos-Pietrini, Rafaele De León-Rodríguez, Jorge (2000). "Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **466**(1): 117-24.
- Gordana, J., Vidakovic, A.e Spasojevic-Tisma, V. (1997). "Cytogenetic Monitoring of Pesticide Sprayers." Environmental Research **75**: 113-18.
- Hagmar, L. , Bonassi, S., Strömberg, U., Mikoczy, Z., Lando, C.e Hansteen, I-L. (1998b). "Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health." mutation Research **405**: 171-78.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brøgger, A. Knudsene Ls Norppa, H. (1998a). "Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH)." Cancer Research **58**: 4117-21.
- Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I-L., Heim, S., Högstedt, B.e Knudsen, L. (1994). "Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage." Cancer Research **54**: 2919-22.
- Hayes, W.J. (1991). Dosage and other factors influencing toxicity. Handbook of pesticides toxicology. L. E. Hayes. San Diego, Academic Press. **1**: 39-105.
- Hoppin, Ja. (2006). "Pesticides and adult respiratory outcomes in the agricultural health study." Ann. New York Academy of Sciences **1076**: 343-54.
- Hutter, K.J.e Stohr, M. (1982). "Rapid detection of mutagen induced micronucleated erythrocytes by flow cytometry." Histochemistry **75**(3): 353-62
- Iarmarcovai, G. , Bonassi, S. , Sari-Minodier, I., Baciuchka-Palmaro, M., A., Bottae T., Orsière (2007). "Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: A pooled re-analysis." mutation Research **615**: 18-27.
- Institute for Environment and Health, Ieh (2005). Pesticides and Parkinson´s disease - a critical review (Web report W21), MRC Institute for Enviromental and Health: 127pp.
- Institute for Environment and Health, Ieh (1996). "Report R5: The use of biomarkers in environmental exposure assessment." IEH, Leicester: 114pp.
- Instituto Nacional De Estadística, I.P (2009a). Indicadores Agro-Ambientais 1989-2007: 1-11.
- Instituto Nacional De Estadística, I.P (2009b). Estatísticas Agrícolas 2008, Instituto Nacional de Estadística, I.P.

- Ipcs (2001). "Biomarkers in risk assessment: Validity and validation." Environmental Health **10**: 222pp.
- Javed A. Bhalli, Q.M. Khan, M.A. Haq, A.M. Khalide Nasim, A. (2006). "Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry." Mutagenesis **21**(2): 143-48.
- Ji, B., Silverman, D., Stewart, P., Blair, A., Swanson, G., Baris, D., Greenberg, R., Hayes, R., Brown, L., Lillemoe, K., Schoenberg, J., Pottern, L., Schwartz, A.e Hoover, R. (2001). "Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer." American Journal of Industrial Medicine **39**: 92-99.
- Kamel, F.e Hoppin, Ja. (2004). "Association of pesticides exposure with neurologic dysfunction and disease." Environmental Health Perspectives **112**(9).
- Keifer, Matthew C. (2000). "Effectiveness of interventions in reducing pesticide overexposure and poisonings." American Journal of Preventive Medicine **18**(4, Suplemento 1): 80-89.
- Keith, G.e Dirheimer, G. (1995). "Postlabeling: a sensitive method for studying DNA adducts and their role in carcinogenesis." Current Opinion on Biotechnology **6**: 3-11.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E.e Van Hummelen, P. (1997). "The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction." mutation Research **392**: 19-30.
- Kirsch-Volders, M.e Fenech, M. (2001). "Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes." Mutagenesis **16**: 51-58.
- Lander, F., Knudsen, L. E., Gamborg, M. O., Jarventaus, H.e Norppa, H. (2000). "Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers." Scandinavian Journal of Work Environment & Health **26**(5): 436-42.
- Lanphear, B. P., Burgoon, D. A., Rust, S. W., Eberly, S.e Galke, W. (1998). "Environmental Exposures to Lead and Urban Children's Blood Lead Levels." Environmental Research **76**(2): 120-30.
- Leach, Nt.e Jackson-Cook, C. (2004). "Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei? ." mutation Research **554**: 89-94.
- Lifshitz, M., Shahak, E., Bolotin, A.e Sofer, S. (1999). "Carbamate and organophosphate poisoning in young children." Pediatric Emergency Care **15**(2): 102-03.
- Lucero, L., Pastor, S., Suárez, S., Durbán, R., Gómez, C., Parrón, T., Creus, A.e Marcos, R. (2000). "Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **464**(2): 255-62.
- Maluf, S.W. (2004). "Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis." Clinica Chimica Acta **347**(1-2): 15-24.
- Marquer, P., Pop, I., Olsen, O., Cardoso, F., Ollier, C., Dias, A.e Baudouin, L. (2009). Agricultural statistics: Main results: 2007–08, EUROSTAT.
- Marquez, C., Villalobos, C., Poblete, S., Villalobos, E., Garcia, M. A.e Duk, S. (2005). "Cytogenetic damage in female Chilean agricultural workers exposed to mixtures of pesticides." Environmental and Molecular Mutagenesis **45**: 1-7.

- Meinert, R., Schuz, J., Kaletsch, U., Kaatsch, P.e Michaelis, J. (2000). "Leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register-based case-control study in Germany." American Journal of Epidemiology **151**: 639-46.
- Mendes, Américo M. S. Carvalho (2002). "Questões sobre a agricultura "industrial"." Ambiente 21 - Sociedade e Desenvolvimento **3**: 14-23.
- Monteiro, G., Oliveira, N. G., Rodrigues, A. S, Laires, A., Ferreira, T. C, Limbert, E., Léonard, A., Gerber, G.e Rueff, J. (2000). "Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy " Mutagenesis **15**(1): 69-75.
- Moretto, A.e Lotti, M. (2004). Toxicity of pesticides. Occupational toxicology. C. Press: 344-71.
- Morgan, D. R. (1992). "Pesticides and public health - A case for scientific and medical concern?" Pesticide Outlook **3**: 24-29.
- Newman, James R. (1979). "Effects of industrial air pollution on wildlife." Biological Conservation **15**(3): 181-90.
- O'Malley, M.A. (2007). "Skin reactions to pesticides." Occupational Medicine State Art Review **12**(2): 327-45.
- Ocde (2009). OECD Environmental data. Donées Compendium 2008, OECD.
- Oliva, A., Giami, A.e Multigner, L. (2002). "Environmental Agents and Erectile Dysfunction: A Study in a Consulting Population." Journal of Andrology **23**(4).
- Pasquini, R., Scassellati-Sforzolini, G., Angeli, G., Fatigoni, C., Monarca, S., Beneventi, L., Digiulio, A.M.e Bauleo, F. A. (1996). "Cytogenetic biomonitoring of pesticide exposed farmers in central Italy." Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology **15**: 29-39.
- Pastor, S., Creus, A., Parro N, Tesifo N, Cebulska-Wasilewska, A., Siffel, C., S., Piperakise Marcos, S. (2003). "Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers." Mutagenesis **18**(3): 249-58.
- Pastor, S., Gutiérrez, S., Creus, A., Cebulska-Wasilewska, A.e Marcos, R. (2001b). "Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **495**(1-2): 147-56.
- Pastor, S., Gutiérrez, S., Creus, A., Xamena, N., Piperakis, S.e Marcos, R. (2001a). "Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells." Mutagenesis **16**(6): 539-45.
- Paterson, S., Mackay, D., Tam, D.e Shiu, W.Y. (1990). "Uptake of organic chemicals by plants: a review of processes, correlations and model." Chemosphere **21**: 297-331.
- Perera, Frederica P. (1997). "Environment and Cancer: Who Are Susceptible? ." Science **278**(5340): 1068 - 73.
- Petrelli, G. , Figa-Talamanca, I. , Tropeano, R. , Tangucci, M. , Cini, C. , Aquilani, S. , Gasperini, L. e Meli, P. (2000). "Reproductive male-mediated risk: spontaneous abortion among wives of pesticide applications." European Journal of Epidemiology **16**: 391-93.
- Pimentel, D. (1995). "Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics." Journal of Agricultural and Environmental Ethics **8**: 17-29.
- Prista, J.e Uva, A. S. (2006). "A utilização de indicadores biológicos em Saúde Ocupacional." Revista Portuguesa de Saúde Pública **6**: 45-54.

- Pritha, Ghosh, Arindam, Basu, Keshav, K Singhe Ashok, K Giri (2008). "Evaluation of cell types for assessment of cytogenetic damage in arsenic exposed population." Molecular Cancer **7**: 45pp.
- Queiroz, C. (2005). DDT e Outras Histórias de Horror. Fórum Alternativa para a Mudança, Faculdade de Letras da Universidade de Lisboa.
- Ramalho, A.T., Curado, M.P.e Natarajan, A.T. (1995). "Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil." mutation Research **331**: 47-54.
- Remor, Aline Pértile, Totti, Carla Caprini, Moreira, Dariele Alves, Dutra, Gustavo Pimentel, Heuser, Vanina Dahlströme Boeira, Jane Marlei (2009). "Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity." Environment International **35**(2): 273-78.
- Rose, F., Gargano, N.e Saez, R. (2003). Situação da Agricultura em Portugal, Comissão Europeia: Direcção-Geral de Agricultura: 1-78.
- Rosin, Mpe German, J. (1985). "Evidence for chromosome instability in vivo in Bloom syndrome: increased numbers of micronuclei in exfoliated cells." Human Genetics **71**: 187-91.
- Rossnerova, A., Spatova, M., Rossner, P., Solansky, I.e Sram, R. J. (2009). "The impact of air pollution on the levels of micronuclei measured by automated image analysis." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **669**(1-2): 42-47.
- Rudd, Nl., Hoar, Di., Greentree, Cl., Dimnik, Ls.e Hennig, Ug. (1988). "Micronucleus assay in human fibroblasts: a measure of spontaneous chromosomal instability and mutagen hypersensitivity." Environmental and Molecular Mutagenesis **12**: 3-13.
- Sailaja, N., Chandrasekhar, M., Rekhadevi, P. V., Mahboob, M., Rahman, M. F., Vuyyuri, S. B., Danadevi, K., Hussain, S. A.e Paramjit, G. (2006). "Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **609**(1): 74-80.
- Sanborn, M. , Kerr, K.J., Sanin, L.H. , Cole, D.C. , Bassil, K.L. e Vakil, C. (2007). "Non-cancer health effects of pesticides: Systematic review and implications for family doctors " Canadian Family Physician **53**(10): 1712-20.
- Sanborn, M., Cole, D., Kerr, K., Vakil, C., Sanin, Lh.e Bassil, K. (2004). "Pesticides Literature Review
" The Ontario College of Family Physicians: 188pp.
- Sanches, S., Silva, C.H., Campos, S.e Vieira, E. (2003). "Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água." Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente **13**: 53-58.
- Scarpato, R., Migliore, L., Hirvonen, A., Falck, G.e Norppa, H. (1996). "Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides: characterization of GSTM1, GSTT1 and NAT2 genotypes." Environmental and Molecular Mutagenesis **27**: 263-69.
- Sever, L. E., Arbuckle, T. E.e Sweeney, A. (1997). "Reproductive and developmental effects of occupational pesticide exposure: the epidemiologic evidence." Occupational Medicine **12**: 305-25.
- Shaham, J., Kaufman, Z., Gurvich, R.e Levi, Z. (2001). "Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides." Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **491**(1-2): 71-80.

- Shore, R.E. (1995). "Epidemiologic data in risk assessment - imperfect but valuable." American Journal of Public Health **85**(4): 474-76.
- Stallones, Loranne Beseler, Cheryl (2002). "Pesticide Poisoning and Depressive Symptoms among Farm Residents." Annals of Epidemiology **12**(6): 389-94.
- Tates, A.D. , Van Welie, M.T. e Ploem, J.S. (1990). "The present state of the automated micronucleus test for lymphocytes." International Journal of Radiation Biology **58** 813-25.
- Taylor, A.W.e Spencer, W.F. (1990). Volatilization and vapor transport processes. Pesticides in the Soil Environment., Soil Science Society of America. **2**: 213-69.
- Thomas, P., Umegaki, K.e Fenech, M. (2003). "Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay." Mutagenesis **18**: 187-94.
- Tilson, H. A. (1998). "Developmental neurotoxicology of endocrine disruptors and pesticides: identification of information gaps and research needs." Environmental Health Perspectives **106**: 807-11.
- Titenko-Holland, N. , Windham, G. , Kolachana, P. , Reinish, F. , Parvatham, S. , Osorio, A.M. e Smith, M.T. (1997). "Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers." Mutation Research **388**: 85-95.
- Varga, D. , Johannes, T. , Jainta, S. , Schuster, S. , Schwarz-Boeger, U. , Kiechle, M. , Patino Garcia, B. e Vogel, W. (2004). "An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis." Mutagenesis **19**: 391-97.
- Viel, J.F.e Challier, B. (1995). "Bladder cancer among French farmers: does exposure to pesticides in vineyards play a part?" Occupational and Environmental Medicine **52**: 587-92.
- Werf, V. D.e Hayo, M. G. (1996). "Assessing the impact of pesticides on the environment." Agriculture, Ecosystems & Environment **60**(2-3): 81-96.
- Winder, C. (2004). Occupational toxicology, CRC Press.
- Wong, K.T.e Ng, T. (1984). "Alleged paraquat poisoning in Perak." Medical journal of Malaysia **39**: 52-55.
- World Health Organization, Unep (1990). Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva, World Health Organization.
- Zahm, S. H.e Blair, A. (1992). "Pesticides and non-Hodgkin's lymphoma." Cancer Research **52**: 5485-88.

14. 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 |

15. Há quanto foi o seu último contacto com pesticidas?

16. Já sofreu alguma intoxicação por pesticidas? Sim Não

Há quanto tempo?

Foi hospitalizado?

17. Já se sentiu mal durante a aplicação de pesticidas? Sim Não

Quais os sintomas?

18. Tem actividades fora do local de trabalho onde contacta com produtos químicos?

Sim Não

Que actividade e quanto tempo despende por semana nessa actividade

Hábitos tabágicos

19. É actualmente fumador? Sim Não

20. Alguma vez fumou? Sim Não

21. Se é ex-fumador

Com que idade começou a fumar?

Com que idade deixou de fumar?

22. Se é fumador

Com que idade começou a fumar?

Quantos cigarros fuma por dia?

23. Se é fumador passivo

Tem contacto regular durante duas ou mais horas com fumadores?

Sim Não

Consumo de álcool

24. 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

25. Tem alguma doença crónica? Sim Não

26. Recebeu alguma transfusão de sangue nos últimos 12 meses? Sim Não

27. Foi submetido a alguma cirurgia nos últimos 12 meses? Sim Não

Especifique:

28. Alguma vez fez um tratamento de quimioterapia ou radioterapia?

Sim Não

Se sim, há quanto tempo?

29. A quantos raios X foi submetido nos últimos três anos?

30. Toma habitualmente alguma medicação?

Sim Não

Se sim, qual?

Anexo II

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