



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA

SERGIO AROUCA

ENSP

*Exposição Ocupacional e Ambiental a Agrotóxicos e Nicotina na Cultura  
de Fumo do Município de Arapiraca / Al*

*por*

*Alan Ferreira Inácio*

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em  
Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.*

*Orientador Prof. Dr. Frederico Peres da Costa*

*Co-orientador prof. Dr. Josino Costa Moreira*

*Rio de Janeiro – Fevereiro de 2011*



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

Fundação Oswaldo Cruz

Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

*Esta dissertação, intitulada*

*Exposição Ocupacional e Ambiental a Agrotóxicos e Nicotina na Cultura  
de Fumo do Município de Arapiraca / Al*

*apresentada por*

*Alan Ferreira Inácio*

*foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula de Novaes Sarcinelli

Prof. Dr. Sergio Rabello Alves

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cheila Nataly Garlindo Bedor

Prof. Dr. Frederico Peres da Costa - orientador

*Dissertação defendida e aprovada em 21 de fevereiro de 2011.*

Inácio, Alan Ferreira

Exposição Ocupacional e Ambiental a Agrotóxicos e Nicotina na  
Cultura de Fumo do Município de Arapiraca/AL/ Alan Ferreira  
Inácio. -- 2011

100 f. : il. ; tab. graf. ; mapas

Orientador: Costa, Frederico Peres da  
Moreira, Josino Costa

Dissertação (Doutorado) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio  
Arouca, Rio de Janeiro, 2011

1. Acetilcolinesterase. 2. Cotinina. 3. Agrotóxicos. 4. Tabaco. 5.  
Exposição Ocupacional. 6. Exposição Ambiental. I. Título.

CDD – 22.ed. -616.865

## *Epígrafe*

*O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos, como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação, e o alicerce de nossa segurança interior.*

*Albert Einstein*

### *Agradecimentos*

Primeiramente agradeço a Deus por todas as oportunidades que me permitiram alcançar este objetivo. Aos meus pais, Paulo (*in memoriam*) e Amália, que lutaram para me oferecer uma vida digna e que sempre me apoiaram em minhas decisões.

Agradeço minha esposa Lucineide que sempre me incentivou, desejando que eu alcançasse esta etapa em minha vida.

Agradeço ao meu amigo e orientador Frederico Peres que aceitou a me orientar neste projeto ajudando-me a chegar nesta etapa final. Aos meus amigos Josino e Armando que sugeriram e confiaram a mim a realização desta etapa do projeto, permitindo a elaboração desta tese.

Agradeço a minha ex-orientadora Ana Rosa, pois através dela, dei o primeiro passo para ingressar nesta pós-graduação.

Aos amigos Emiliano e Tiago que me proporcionaram toda a sua infra estrutura laboratorial para a realização dos experimentos. Aos companheiros Sandra, Karol, Léo, Cristiane, Francisca, e alunos de enfermagem da UFAL que não pouparam esforços para que este trabalho fosse desenvolvido, atuando nas entrevistas, recrutamento dos agricultores, coleta de sangue e ajudando nos experimentos analíticos. Tenho a certeza de que sem eles, este trabalho jamais seria concluído.

Aos amigos do laboratório de agrotóxicos do CESTEJ, Paula, Sérgio, Ana Cristina, Mario e Juliana, companheiros de longas jornadas, que desde 1998, acompanham a minha vida científica. Aos amigos e companheiros de bancada, Tatiane, Beatriz, Arthur e Carla, que dividiram comigo os momentos experimentais deste trabalho.

Aos amigos de turma Maria Lúcia, Jairo e Jane, que dividiram comigo as experiências nas salas de aula ao longo desses quatro anos.

E a mim, sem modéstia ou vaidade, mas, o maior obstáculo que enfrentei para chegar até o final, fui eu mesmo. E se cheguei, sou grato aos meus esforços.

***Lista de Siglas e Abreviaturas***

AChE – Acetilcolinesterase.

AL – Alagoas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BChE – Butirilcolinesterase.

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa.

CESTEH - Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana.

DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano

DTNB – Ácido ditio- bis- nitrobenzóico.

OP – Organofosforado.

OMS – Organização Mundial de Saúde.

EIA – Enzimatic Imuno Assay.

EPI – Equipamento de proteção individual.

EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural.

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública.

G – gravidades.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico.

kU/L – milimoles/ minuto/ litro.

M – molar.

N – normal.

mM – milimolar.

mL – mililitro.

μL – microlitro.

μg – micrograma.

mg – miligrama.

NaOH – Hidróxido de sódio.

nm – nanômetros.

ppm – parte por milhão.

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

UFAL – Universidade Federal de Alagoas.

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria.

**Lista de Tabelas.**

Tabela 1 - Principais países produtores de fumo, área cultivada e exportações de fumo em folha, 2005.....	Pág. 3
Tabela 2: Produção de fumo no Nordeste (Bahia +Alagoas) – 2006.....	Pág 5
Tabela 3 - Número de participantes por sexo e distribuição etária da amostra de 72 agricultores participantes do estudo. ....	Pág. 39
Tabela 4 - Número de participantes fumantes e não fumante e consumo diário de cigarros.....	Pág 40
Tabela 5 – Relação dos agrotóxicos utilizados pela população de agricultores.....	Pág. 45
Tabela 6 – Percentual de agricultores que relatam sobre o motivo da não utilização dos equipamentos de proteção.....	Pág. 45
Tabela 7 – Perfil do contato dos agricultores com fumo.....	Pág. 47
Tabela 8 - Prevalência dos sintomas entre fumantes e não-fumantes.....	Pág. 48
Tabela 9 - Prevalência em relação ao número de sintomas relatados entre fumantes e não-fumantes.....	Pág. 49



**Lista de Figuras.**

Figura 1 – Esquema do efeito da exposição a agrotóxico e nicotina.....	Pág. 8
Figura 2 – Localização geográfica do município de Arapiraca.....	Pág. 28
Figura 3 – Montagem do varal para a secagem das folhas de fumo.....	Pág. 30
Figura 4 – Colocação das folhas de fumo no varal.....	Pág. 31
Figura 5 – Distribuição percentual do grau de escolaridade dos agricultores.....	Pág. 40
Figura 6 – Você aplica agrotóxicos?.....	Pág. 42
Figura 7 – Que tipo de equipamento você usa para aplicar a substância?.....	Pág. 43
Figura 8 – Sua pele entra em contato com o agrotóxico?.....	Pág. 43
Figura 9 – Histograma do número de horas gastos na aplicação de agrotóxicos.....	Pág. 44
Figura 10 – Distribuição percentual dos sintomas durante ou após a aplicação de agrotóxicos. .....	Pág. 46
Figura 11 – Distribuição percentual dos sintomas durante a colheita do fumo.....	Pág. 48
Figura 12 – Curva de contaminação de AChE em sangue total com nicotina e etil paroxon.....	Pág. 50
Figura 13 – Percentuais de inibição da AChE eritrocitária humana <i>in vitro</i> por nicotina.....	Pág. 51
Figura 14 – Atividade de AChE entre homens e mulheres do grupo controle.....	Pág. 52
Figura 15 – Atividade de AChE na população de agricultores no período de cultivo (coleta 1), entre safra (coleta 2) e grupo controle.....	Pág. 53
Figura 16 – Percentual de inibição individual da atividade de AChE na população de agricultores entre período de cultivo (coleta 1) e período entre safra (coleta 2).....	Pág. 54
Figura 17 – Concentração plasmática de cotinina entre indivíduos fumantes e não fumantes.....	Pág. 55
Figura 18 – Correlação entre concentração plasmática de cotinina e atividade de AChE.....	Pág. 56

**Sumário**

I. Introdução.....	01
I.1. Aspectos gerais.....	02
II. Objetivo .....	09
II.1 Objetivo geral.....	10
II. 2. Objetivos específicos.....	10
III. Justificativa.....	11
IV. Revisão de Literatura.....	13
IV.1. Agrotóxicos - aspectos históricos e conceitos.....	14
IV. 1.2. Agrotóxicos - sistema de classificação.....	16
IV. 1.3. Os compostos OPs e seu mecanismo de ação tóxica.....	17
IV.2. Tabaco e nicotina.....	19
IV. 2.1. A exposição à nicotina em cultura de tabaco - A doença da folha verde do tabaco ou “bebedeira do fumo”.....	21
IV. 3. Avaliação da exposição.....	22
IV. 3. 1. Biomarcadores na avaliação da exposição a agrotóxicos OPs e a nicotina.....	24
V. Metodologia.....	26
V. 1. Área de estudo - Município de Arapiraca – Estado de Alagoas.....	27
V. 2. Amostragem.....	28
V. 3. Fase exploratória de campo.....	30
V. 4. Aplicação de questionário.....	31
V. 5. Reagentes.....	32
V. 6. Equipamentos.....	32
V. 7. Avaliação do efeito in vitro da nicotina sobre a atividade da AChE eritrocitária humana.....	32
V. 8. Estudo do efeito in vitro da nicotina e OP sobre a atividade das AChE eritrocitária.....	34
V. 9. Avaliação da exposição ocupacional e ambiental a agrotóxicos anticolinesterásicos e a nicotina.....	34
V. 10. Análise da atividade da AChE e dos níveis cotinina plasmático na população de agricultores e grupo controle.....	35
V. 10. 1. Coleta e processamento das amostras de sangue.....	35
V. 10. 2. Determinação da atividade da AChE.....	35
V. 10. 3. Determinação dos níveis de cotinina.....	36

---

V. 11. Análise de dados.....	36
V. 12. Aspectos éticos da pesquisa.....	37
VI. Resultados.....	38
VI. 1. Perfil socioeconômico da população estudada.....	39
VI. 2. Perfil do processo de aplicação de agrotóxicos na lavoura.....	41
VI. 3. Perfil do processo de colheita do tabaco na lavoura.....	46
VI. 4. Efeito in vitro da nicotina e do etil paroxon sobre a atividade da AChE eritrocitária humana em sangue total.....	49
VI. 5. Efeito in vitro da nicotina sobre a atividade da AChE em membrana de hemácias humanas.....	50
VI. 6. Análise da atividade da AChE e dos níveis cotinina plasmático na população de agricultores e grupo controle.....	51
VI. 6. 1. Atividade de AChE no grupo controle.....	51
VI. 6. 2. Atividade de AChE na população de agricultores.....	52
VI. 6. 3. Concentração de cotinina plasmática na população de agricultores e sua correlação com a atividade da AChE.....	54
VII. Discussão .....	57
VIII. Conclusão e Perspectivas.....	68
IX. Bibliografia.....	71
X. Anexos	

### **Resumo**

No Brasil, o cultivo do tabaco é associado a graves problemas de saúde entre os agricultores, e que podem evoluir para um quadro de depressão e suicídio. A exposição de trabalhadores rurais a agrotóxicos em culturas de tabaco é, na maioria das vezes, tratada como um evento isolado, desconsiderando-se a exposição concomitante a outras substâncias, como a nicotina, presente nas folhas de tabaco. O presente trabalho tem como objetivo analisar as exposições ocupacionais e ambientais a agrotóxicos e nicotina na cultura de tabaco do município de Arapiraca/AL, com ênfase nos efeitos dessas exposições sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). A partir do conhecimento do processo de trabalho local, um grupo de 72 fumicultores do município foram avaliados com relação exposição a agrotóxicos organofosforados (OP) e carbamatos e à nicotina nos períodos de cultivo e entressafra do tabaco. A exposição a agentes anticolinesterásicos foi avaliada através da análise da atividade da AChE eritrocitária, enquanto a exposição à nicotina foi avaliada através dos níveis plasmáticos de cotinina. Um grupo composto por 45 indivíduos foi utilizado como controle na comparação da atividade da AChE. Complementarmente, avaliou-se o efeito *in vitro* da exposição à nicotina e a OP sobre a atividade da AChE. A análise dos resultados mostrou que, nos testes *in vitro*, a nicotina somente inibiu a AChE em concentrações iguais ou superiores a 0,5mM. A nicotina não apresentou efeito aditivo nas inibições da AChE por etil paroxon *in vitro*. No período de cultivo, foi observada redução significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade da AChE ( $4,52 \pm 0,57$  kU/L) comparado ao período entre safra ( $4,92 \pm 0,59$  kU/L) e ao grupo controle, ( $4,72 \pm 0,37$  kU/L), caracterizando uma exposição ocupacional e/ou ambiental a agrotóxicos anticolinesterásicos. Maiores níveis plasmáticos de cotinina foram observados em agricultores fumantes ( $151,9 \pm 64,1$  ng/mL), quando comparado aos não fumantes ( $29,2 \pm 46,7$  ng/mL). Seis indivíduos não fumantes apresentaram valores de cotinina entre 50 e 200 ng/mL, caracterizando uma exposição ocupacional a nicotina. A análise dos resultados *in vivo* mostrou que os níveis de cotinina plasmático apresentado pelos agricultores não têm correlação com a atividade da AChE. Isto aponta para a possibilidade da não ocorrência de um efeito aditivo da exposição à nicotina e agrotóxicos sobre a atividade da AChE, fator que pode ser utilizado para um diagnóstico diferencial entre a exposição a agrotóxicos e à nicotina entre trabalhadores da cultura fumageira.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase, cotinina, agrotóxicos, tabaco, exposição.

### ***Abstract***

Farmworkers exposure to pesticides in tobacco production is most often treated as an isolated event, ignoring concomitant exposure to other substances such as nicotine, present in tobacco leaves. This study aims to analyze occupational and environmental exposures to pesticides and nicotine in tobacco production at Arapiraca, Alagoas State, Northeast Brazil, emphasizing the effects of these exposures on acetylcholinesterase (AChE) activity. After characterizing local work processes, it was analyzed the activities of AChE in group of 72 rural workers in relation to organophosphate pesticides (OP) and nicotine exposure in harvest and between-harvests periods. In addition, it was evaluate the *in vitro* effect of nicotine and OP exposure on AChE activity. *In vitro* tests' results showed that nicotine only inhibited AChE at concentrations equal to or greater than 0.5 mM. Nicotine showed no *in vitro* additive effect on AChE inhibition by ethyl-paroxon. During harvest period, it was observed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in AChE activity ( $4.52 \pm 0.57$  kU / L) compared to between-harvests period ( $4,92 \pm 0.59$  kU / L) and the control group ( $4.72 \pm 0.37$  kU / L), determining an occupational exposure to OPs. Farmers who smoke had higher cotinine levels ( $151.9 \pm 64.1$  ng / mL) compared to non-smokers ( $29.2 \pm 46.7$  ng / mL). Six non-smokers had cotinine values between 50 and 200 ng / mL, featuring an occupational exposure to nicotine. The results *in vivo* showed that levels of cotinine in plasma had no correlation with AChE activity. It points to the possibility of the absence of additive effect of simultaneous exposure to nicotine and OP on AChE activity, a factor that can be used for differential diagnosis between pesticides and nicotine exposures among farmworkers enrolled at tobacco production.

Key-words: Acetylcholinesterase, cotinine, pesticides, tobacco, exposure.

## ***Capítulo I - Introdução***

### ***I. 1 Aspectos gerais.***

As atividades de produção e comercialização de tabaco e seus derivados se estendem por mais de 50 países. Para aumentar e melhorar a produção do tabaco com vista a atender aos mercados em outros países e obter custos de produção cada vez menores, a indústria do tabaco tem encorajado países e agricultores a cultivarem o tabaco, sobretudo em países em desenvolvimento. Com esta estratégia, a produção de tabaco no mundo cresceu 59% entre 1975 e 1997. A maior parte desse aumento aconteceu em países em desenvolvimento, cuja produção aumentou em cerca de 128% entre 1975 e 1998, ao passo que a produção em países desenvolvidos caiu 31%. Entre 1975 e 1997, a produção de tabaco nos Estados Unidos caiu 18% e, em países como Brasil, China, Malawi, Vietnã e Zimbábue, ocorreu o contrário. Em 2000, quatro países responderam pela metade da produção global de tabaco: China (34%), Índia (10%), Brasil (8%) e Estados Unidos (7%). Vale salientar que, até 1997, os Estados Unidos eram o segundo maior produtor mundial <sup>1</sup>.

Atualmente, por ordem de magnitude da produção, os principais produtores de tabaco no mundo são a China, o Brasil, a Índia, os EUA e a Indonésia (tabela 1). Somente esses países são responsáveis por aproximadamente 70% da produção mundial de tabaco <sup>2</sup>. No entanto, as principais empresas da indústria são transnacionais, o que faz com que os lucros auferidos nos países onde se localizam suas subsidiárias sejam enviados às suas matrizes, localizadas em países desenvolvidos, como é o caso da Souza Cruz que remete seu lucro para o Reino Unido e a Philip Morris para os EUA <sup>1</sup>.

No Brasil, existe um grande clima de euforia por parte de alguns segmentos ligados à cadeia produtiva do tabaco, porque o país está ocupando um lugar de destaque no mercado mundial de folhas de tabaco: é o segundo maior produtor e o maior exportador desta *commodity* <sup>2;3</sup>.

A posição alcançada pelo Brasil no mercado mundial de folhas de tabaco se deve a diferentes fatores como: os reduzidos custos internos de sua produção, devido ao emprego de fumicultores e suas famílias na produção resultando em menores gastos com salários, a não mecanização da lavoura que fornece uma melhor qualidade ao produto, pois recebe maiores cuidados manuais que o tabaco produzido no processo mecanizado.

**Tabela 1: Principais países produtores de tabaco, área cultivada e exportações de fumo em folha, 2005.**

	Produção toneladas	Participação no volume total mundial	Área cultivada (Ha)	Participação na área total mundial
Mundo	6.565.250	100,0%	3.981.233	100,0%
<b>Países Desenvolvidos</b>	<b>971.737</b>	<b>14,8%</b>	<b>447.222</b>	<b>11,2%</b>
Países em Desenvolvimento	5.593.513	85,2%	3.534.011	88,8%
Países de Baixa Renda	1.233.178	18,8%	989.300	24,8%
China	2.685.500	40,9%	1.402.200	35,2%
Brasil	<b>878.651</b>	<b>13,4%</b>	<b>492.889</b>	<b>12,4%</b>
Índia	598.000	9,1%	438.000	11,0%
Estados Unidos	290.100	4,4%	124.240	3,1%
Indonésia	141.000	2,1%	145.000	3,6%
Turquia	140.716	2,1%	190.000	4,8%
Grécia	123.000	1,9%	56.000	1,4%
Argentina	118.000	1,8%	66.000	1,7%
Itália	110.000	1,7%	38.000	1,0%
Paquistão	84.400	1,3%	45.100	1,1%
Tailândia	70.000	1,1%	40.000	1,0%
Malauí	69.500	1,1%	150.000	3,8%
Coréia, Democr. Popular da	65.400	1,0%	46.000	1,2%
Zimbábue	65.000	1,0%	40.000	1,0%
Bulgária	62.000	0,9%	43.004	1,1%
Japão	49.000	0,7%	19.448	0,5%
Filipinas	47.800	0,7%	33.771	0,8%
Canadá	43.000	0,7%	16.000	0,4%
Espanha	40.192	0,6%	13.747	0,3%
Bangladesh	39.000	0,6%	30.352	0,8%
Colômbia	35.760	0,5%	17.684	0,4%
Coréia, Republica da	35.666	0,5%	18.000	0,5%

Fonte: FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat.fao.org>; UNCTAD (2005); 4

No âmbito das oportunidades para o fumo brasileiro no mercado internacional, fatores conjunturais, tais como a redução dos estoques mundiais e da produção do tabaco no Zimbábue e nos EUA, têm ajudado a manutenção do Brasil na posição de maior exportador mundial<sup>2</sup>.

A região Sul concentra a maior produção de tabaco nacional: na safra de 2007, a região produziu 880 mil toneladas de fumo, representando 96,9% do total da produção brasileira. Todos os estados do Sul são produtores, destacando-se o Rio Grande do Sul (RS), responsável por 52,2% do total produzido no Brasil naquela safra. Santa Catarina (SC) ocupa o segundo lugar na produção brasileira e respondeu com 27,4% do total produzido e, finalmente, o Paraná (PR) que respondeu com 17,2% do total produzido.



Os demais estados brasileiros (Alagoas, Bahia, Sergipe, localizados na região Nordeste e outros) produziram 27 mil toneladas, o equivalente a 3,0% do total produzido no Brasil<sup>5</sup>.

O cultivo de tabaco na região sul no que se refere à assistência técnica e extensão rural, sofre influências tanto pública quanto privada. No campo público observa-se a interferência pública por intermédio da EMATER e das universidades UFRGS e UFSM.

Quanto ao campo privado, visualiza-se a influência das empresas fumageiras e das integradoras (vertical), dentre as quais se destacam a Souza Cruz, Universal, Intable e a Cosuel. O sistema de integração vertical é muito presente no cultivo de tabaco na região sul. A lógica do sistema de integração é passar a previsibilidade e segurança ao produtor, e a integradora, com seu pacote tecnológico, têm a função de comercializar e financiar os insumos<sup>6</sup>.

Na região nordeste a situação é diferente. A fumicultura alagoana caracteriza-se pela forte presença e participação de grandes produtores, porém, todos os produtores são independentes e somente alguns têm acordos com empresas pela parte do fumo que negociam em folha. Em Alagoas, mais de 21 mil empregos são relacionados ao setor e 39 mil são induzidos por ele. Quase 132 mil pessoas vivem do cultivo do tabaco e 172 mil se beneficiam dele. Totalizam-se 60.371 empregos e 303.305 pessoas que representam quase 80% da população dos municípios fumageiros. Quem vive na região de Arapiraca não estranha essa percentagem, pois todo mundo tem um vínculo, mesmo que ténue, com a atividade fumageira<sup>7</sup>.

Em Alagoas também são produzidos fumos escuros. Parte da produção é destinada ao uso como capa de charuto, nos mercados interno e externo, ou para compor o *blend* de outros fumos destinados à exportação. Outra parte da produção é destinada à fabricação do fumo de corda, comercializado em todo o território nacional (tabela 2)<sup>8</sup>.

A região fumageira de Arapiraca constitui a micro região de Arapiraca. Acredita-se que foi formada pela passagem progressiva da cultura para o município de Arapiraca que se tornou o núcleo central ao redor do qual se espalhou a lavoura. A região de Arapiraca é a principal produtora e compreende os municípios de Arapiraca, Campo Grande, Coité do Nóia, Craíbas, Feira Grande, Girau do Ponciano, Lagoa da Canoa, Limoeiro de Anadia, São Sebastião, Taquarana. Em 1982, a área plantada chegou a 60 mil ha, reduzindo-se para pouco mais de 20 mil ha no final dos anos 80. Em 2003, a área cultivada foi de 9,4 mil ha, com uma produção de 8,7 mil toneladas<sup>8;9</sup>.

Em Arapiraca, todos os fumicultores são produtores de fumo em corda. Nunca foram interessados no fumo em folha. Somente alguns deles vendem (ou vendiam) uma pequena parte da produção em folha às empresas exportadoras. Esse fumo é recolhido nos 10 municípios ao redor de Arapiraca <sup>7</sup>.

Em toda lógica das condições do mercado, a maior parte do tabaco nordestino é consumido no país. Em Alagoas, só o fumo em folha é exportado, mas não a totalidade da produção. Cerca de 97 % da produção são consumidos nacionalmente <sup>7</sup>.

**Tabela 2: Produção de tabaco no Nordeste (Bahia +Alagoas) – 2006.**

	<b>Bahia</b>	<b>Alagoas</b>	<b>Total</b>
Fumo em folha (t.)	10.760	1.165	11.925
Fumo de corda (t.)	898	13.402	14.300
Total	11.658	14.567	26.225
% Folha	92,3	8,00	45,5
% Corda	7,7	92,0	54,5

Fonte: Nardi, 2007.<sup>7</sup>

Na região nordeste, o tabaco é semeado em junho, e colhido no período de agosto/setembro. Nesse período, o fumicultor monitora o crescimento e realiza o controle integrado de pragas e doenças. Após a colheita, as folhas ou as plantas são amarradas em varas e levadas para secar. Após o processo de cura, as folhas são agrupadas em maços com um número determinado de folhas agrupado conforme a classificação. O tabaco é armazenado em paióis, onde aguarda a comercialização <sup>2</sup>.

Estudos sobre exposição e contaminação por agrotóxicos na fumicultura indicam que grande parte dos agricultores sofre ou já sofreu algum episódio de intoxicação, crônica ou aguda pela exposição a essas substâncias <sup>10; 11</sup>. Então, quando passamos a focalizar o plano dos riscos que enfrentam os produtores com os agrotóxicos utilizados no cultivo e tratamento das folhas de tabaco, devemos observar que se trata de uma questão de saúde pública <sup>11; 12; 13</sup>.

A utilização de agrotóxicos no cultivo do tabaco torna esta tarefa uma das mais perigosas ocupações na atualidade. Dentre os vários riscos ocupacionais, destacam-se as intoxicações agudas, doenças crônicas, problemas reprodutivos e danos ambientais <sup>14</sup>.

Uma das principais causas de insatisfação e de busca por alternativas entre os fumicultores refere-se à percepção que possuem dos riscos a que se submetem devido à intoxicação por uso de agrotóxicos. Para garantir uma folha de boa qualidade, a produção de tabaco requer o uso intensivo de agrotóxicos, o que tem provocado danos à saúde dos agricultores e de suas famílias, como intoxicações agudas e incapacidade para o trabalho.

Estudos realizados nas regiões fumicultoras do Brasil têm demonstrado uma forte associação entre o aparecimento de problemas de saúde em agricultores e cultivo de tabaco, gerados pela utilização de agrotóxicos e pelas condições de trabalho que influenciam negativamente o estado biopsíquico dos fumicultores e de suas famílias <sup>1; 15; 16; 17</sup>.

No início dos anos 90, os produtores de tabaco brasileiros aplicavam entre 5,5 a 6 kg de agrotóxicos por hectare. Atualmente, a média é de 2,2 kg/ha. Apesar de se verificar tal redução, a quantidade de produtos disponíveis para a comercialização é ainda elevada <sup>2</sup>.

Um total de 65 produtos entre inseticidas, herbicidas e fungicidas está liberado para comercialização e uso na cultura do tabaco <sup>2</sup>. A maior parte desses produtos pertence às classes toxicológicas I e II e são considerados extremamente tóxicos e altamente tóxicos, respectivamente, podendo trazer sérios danos à saúde. A maioria desses agrotóxicos pertence a três grupos químicos: Organofosforados (OPs), carbamatos e piretróides. Os OPs e os carbamatos são poderosos inibidores das colinesterases (enzimas fundamentais para o sistema nervoso), podendo ser absorvidos pela pele, por ingestão ou inalação <sup>18</sup>.

Nas regiões fumicultoras do Brasil, o cultivo do tabaco é associado ao aparecimento de graves problemas de saúde entre os agricultores, os quais possuem um maior risco em desenvolver alterações neurocomportamentais que podem evoluir para um quadro de depressão e suicídio <sup>19</sup>. Agricultores do município de Arapiraca apresentam um risco de morte por suicídio de aproximadamente 6 vezes maior em comparação com a população do estado de Alagoas <sup>20</sup>.

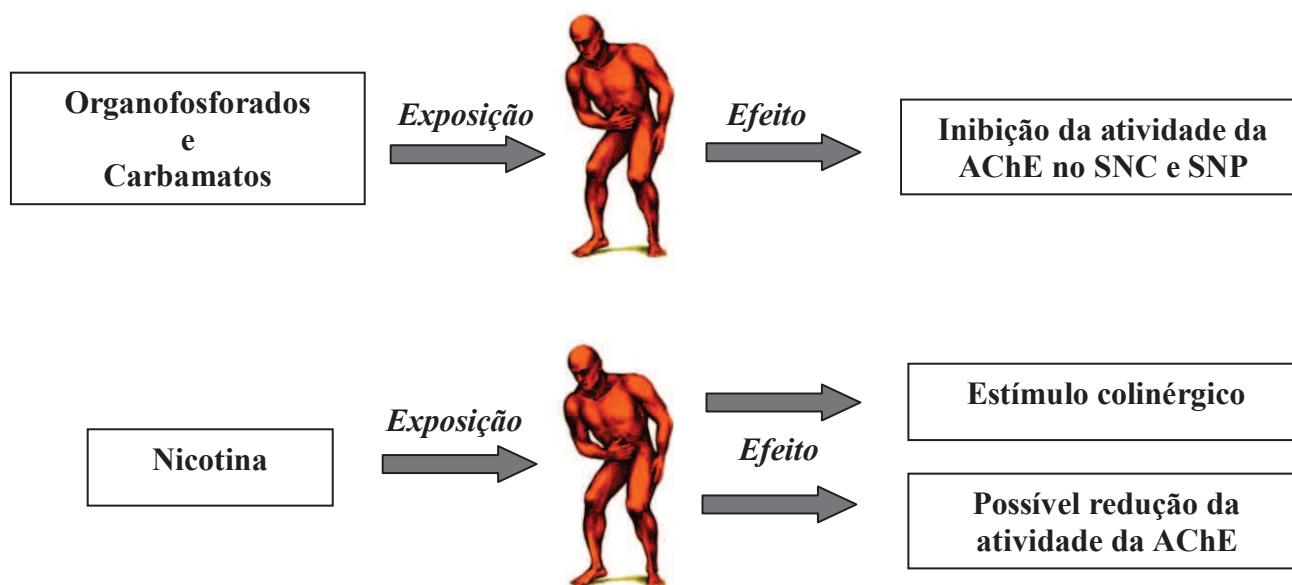
Os sintomas mais apontados pelos agricultores que cultivam tabaco são dores de cabeça, tonturas, mal-estar, abalos musculares, vômitos, salivação e perda de apetite <sup>9</sup>;

<sup>10; 11</sup>. Porém, toda esta sintomatologia é característica de uma doença bem conhecida entre fumicultores que é a "doença da folha verde". A doença da folha verde é uma doença ocupacional encontrada entre trabalhadores que lidam com tabaco, causada pela absorção, através da pele, da nicotina proveniente do contato com as folhas. Esta intoxicação pela nicotina se dá pela estimulação colinérgica dos receptores nicotínicos ocasionadas pelo alcalóide. A doença é caracterizada por sintomas que incluem náusea, vômito, fraqueza, dor de cabeça, tonteira, dores abdominais e dificuldade para respirar, assim como flutuações na pressão sanguínea <sup>1</sup>. Pode também exercer uma condição autolimitante da qual os trabalhadores se recuperam em dois ou três dias. Porém, os sintomas podem ser severos, resultando em desidratação e necessidade de atendimento médico emergencial <sup>21</sup>.

A toxicidade causada ao sistema cardiovascular e efeitos carcinogênicos por exposição dérmica crônica à nicotina são possíveis de existir em plantadores não-fumantes de tabaco, pois esses mostram níveis similares de cotinina e nicotina a fumantes ativos da população em geral <sup>22</sup>.

Toda esta sintomatologia descrita pela exposição à nicotina é semelhante àquela descrita pela exposição aos agrotóxicos OPs, cujo mecanismo de toxicidade está relacionado com a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) no sistema nervoso central e periférico. A AChE hidrolisa a acetilcolina, um neurotransmissor presente nas sinapses nervosas, e sua inibição ocasiona o acúmulo do neurotransmissor nas fendas sinápticas e conseqüente superestimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos <sup>23</sup>.

Os eventos de intoxicação ocorridos em cultura de tabaco quase sempre são tratados como um evento relacionado somente ao agrotóxico. Também, a prevalência de altas sintomatologias associadas à exposição a agrotóxicos OPs entre fumicultores é fator de risco ligado à atividade, e que pode estar ligado à elevada incidência de morbidade auto-referida e casos de depressão nas regiões fumicultoras <sup>24</sup>.



**Figura 1 – Esquema do efeito da exposição a agrotóxico e nicotina.**

Fonte: elaboração própria

A exposição simultânea a duas ou mais substâncias químicas, bem como seus efeitos combinados sobre o organismo, são muitas vezes desconsiderados ou subestimados nos processos de monitoramento biológico. Assim, a exposição e/ou intoxicação por agrotóxicos OPs em culturas de tabaco é tratada como um evento isolado, cujos efeitos tóxicos estariam a princípio relacionados somente ao agrotóxico, desconsiderando-se a exposição concomitante a outras substâncias químicas, como a nicotina, de modo que os efeitos de toxicidade combinados de exposição simultânea a dois agonistas colinérgicos são confundidos ou ignorados<sup>10; 11; 25</sup>. Isto posto, o objeto da presente tese é a exposição de trabalhadores rurais a agrotóxicos e nicotina no cultivo do tabaco em Arapiraca/AL, com ênfase nos efeitos dessas exposições a um importante biomarcador, a enzima acetilcolinesterase”.

## ***Capítulo II - Objetivo***

### ***II. 1 Objetivo geral.***

Analisar as exposições ocupacionais e ambientais a agrotóxicos e nicotina na cultura do tabaco do município de Arapiraca/AL, a partir do conhecimento do processo de trabalho local e da avaliação dos efeitos dessas exposições sobre a enzima acetilcolinesterase.

### ***II. 2. Objetivos específicos.***

- ✓ Conhecer o processo de trabalho local, dando ênfase às exposições ocupacionais aos agrotóxicos e à nicotina;
- ✓ Avaliar *in vitro* os efeitos da exposição à nicotina sobre a atividade da enzima AChE;
- ✓ Avaliar *in vitro* os efeitos da exposição simultânea à nicotina e a OP sobre a atividade da enzima AChE;
- ✓ Avaliar *in vivo* os efeitos da exposição agrotóxicos OPs utilizando a enzima AChE como biomarcador;
- ✓ Avaliar *in vivo* os efeitos da exposição à nicotina sobre a atividade da enzima AChE;

### ***Capítulo III - Justificativa***



Existe considerável evidência de que agricultores que cultivam o tabaco sofrem de doenças associadas à exposição aos agrotóxicos, entre as quais depressão, ansiedade, disfunções neurológicas, dores musculares e tremores além de vômitos, dores de cabeça, insônia, etc. Eles também sofrem com a exposição a altos níveis de nicotina e apresentam um rol de doenças anuais que coincidem com o calendário do cultivo do tabaco. Alguns especialistas em agrotóxicos se preocupam com a possibilidade da nicotina e os inseticidas organofosforados, que atuam na mesma área do sistema nervoso, apresentarem, juntos, maior risco aos agricultores. E o mais grave é que são comuns os casos e as tentativas de suicídio nas pequenas propriedades em que há cultivo do tabaco <sup>1; 15; 16; 17; 26; 27; 28</sup>.

Para especialistas em saúde, o número é alarmante: a média brasileira é de 3,8 suicídios por 100 mil pessoas. No Brasil, maioria dos casos relatados ocorre em duas regiões brasileiras: Sul e Nordeste; regiões onde ocorre o cultivo do tabaco com utilização de agrotóxicos OPs <sup>19; 29; 30</sup>.

Na região Nordeste, o município de Arapiraca e demais cidades da região produtora de tabaco, enfrentam crise de intoxicação causada pelo manuseio da folha de fumo. Durante o período de cultivo do tabaco há um aumento no número de casos registrados nos hospitais da região provocados por intoxicação. O mal-estar é provocado pela nicotina e principalmente por resíduos de agrotóxicos. Em 2008, no período da plantação e colheita do fumo, a coordenadoria de Vigilância à Saúde notificou 200 casos de intoxicação de agricultores <sup>31</sup>.

Um estudo realizado por Chang em 1973 mostrou que a nicotina pode exercer um efeito sobre a atividade da AChE <sup>32</sup>. Posteriormente, José e colaboradores, 2003, Figueiró, 2005 e Silva, 2006 realizaram estudos laboratoriais sobre o efeito *in vitro* da nicotina sobre as colinesterases e demonstraram que a atividade da AChE eritrocitária é significativamente inibida pelo alcalóide <sup>33; 34; 35</sup>. Assim, se a exposição à nicotina e ao agrotóxico em culturas de tabaco pode ocorrer em um mesmo momento, torna-se difícil somente pela descrição dos efeitos tóxicos diferenciar se a intoxicação se dá por um ou por outro agente, ou ambos. E ainda, se a exposição de agricultores à nicotina em cultura de tabaco pode ter algum efeito sobre a atividade da AChE.

***Capítulo IV - Revisão de Literatura***

#### ***IV. 1. Agrotóxicos - aspectos históricos e conceitos.***

Há muitos séculos o homem vem se valendo do uso de substâncias químicas para o controle de pragas que ameaçam seu suprimento de alimentos e sua saúde <sup>36</sup>.

Desde 1940, os agrotóxicos vêm ocupando um lugar importante entre as mais de 100.000 substâncias químicas que se encontram atualmente no mercado, tornando-se a principal estratégia para o combate e prevenção de pragas agrícolas <sup>37; 38</sup>.

A intensificação na produção dos agrotóxicos ocorreu principalmente após a Segunda Guerra Mundial, devido a um excedente de armas químicas e uma necessidade do aumento da produção agrícola devido uma crise no abastecimento de alimentos que se sucedeu no período pós-guerra <sup>36</sup>.

Um agrotóxico pode ser definido como qualquer substância ou mistura de substâncias utilizadas com a finalidade de prevenir, controlar ou destruir qualquer praga, entre elas, vetores de doenças animais ou humanas, espécies indesejáveis de plantas ou animais que causem dano ou que, de alguma forma interfiram durante a produção, processamento, estocagem, transporte ou comercialização de alimentos, produtos relacionados à agricultura, madeira e seus derivados, rações ou ainda substâncias que possam ser administradas em animais para o controle de insetos, aracnídeos ou outras pragas dentro ou sobre seus corpos. O termo inclui ainda substâncias utilizadas como reguladores do crescimento de plantas, desfolhantes, dessecadores, ou ainda agentes para prevenir a queda prematura de frutas e substâncias aplicadas à plantação, antes ou depois da colheita, para prevenir a deterioração durante a estocagem ou o transporte <sup>39</sup>.

A descoberta das propriedades inseticidas do dicloro-difenil-tricloroetano, popularmente conhecido como DDT representa um marco na utilização de substâncias sintéticas utilizadas como agrotóxicos, determinando o estabelecimento de um novo paradigma no controle das pragas baseado no uso destas substâncias <sup>40</sup>.

É clássica a história do DDT descoberto em 1873 como um produto de síntese orgânica surgindo como o maior representante das substâncias denominadas agrotóxicos 65 anos após sua descoberta. Este agente sintético, além de apresentar um maior poder inseticida, era também mais estável no meio ambiente, o que acarretou a substituição, quase que absoluta, do uso dos agrotóxicos naturais como a rotenona e piretrina <sup>41</sup>.

O DDT foi, sem dúvida, a substância mais utilizada com propósito inseticida naquele período, sendo ainda hoje possível encontrá-la em regiões tão inusitadas como o Ártico <sup>41</sup>. Entretanto, o uso descontrolado deste composto provocou uma redução em

sua eficiência, porque além de erradicar as espécies alvo também eliminava seus predadores e competidores naturais. Acrescenta-se a este o fato de que alguns indivíduos são mais resistentes e sobrevivem, restando assim indivíduos com genótipo mais resistente. O cruzamento desses indivíduos, em adição a uma menor competição por alimento e espaço promove um aumento substancial na população, fazendo com que a praga volte mais resistente e a níveis populacionais ainda maiores do que antes da aplicação<sup>42</sup>. Este fenômeno em associação a sua alta estabilidade no meio ambiente e as suas propriedades físico-químicas, que permitem a biomagnificação e bioacumulação nos organismos e nas cadeias alimentares, geraram graves problemas ambientais, determinando assim uma diminuição drástica na sua utilização, inclusive sua proibição para uso agrícola em 1972. Neste momento, inicia-se o uso dos agrotóxicos anticolinesterásicos, representados pelos OPs e carbamatos que, até hoje, dividem o mercado com os agrotóxicos sintéticos da classe dos piretróides<sup>43</sup>.

Os piretróides foram descobertos a partir de estudos que procuravam modificar a estrutura química das piretrinas naturais, uma vez que apresentavam maior capacidade letal para os insetos, maior estabilidade à luz e calor e menor volatilidade. Por suas vantagens, os piretros foram sintetizados e denominados piretróides e, o ácido crisantêmico foi o primeiro dos cinco componentes do éster natural a ser sintetizado. A síntese do ácido crisantêmico abriu novos caminhos para a obtenção de piretróides sintéticos, sendo a aletrina o principal piretróide sintético produzido comercialmente<sup>43</sup>.

Os inseticidas piretróides surgiram no início dos anos 80 como uma alternativa àqueles de maior potencial tóxico, já que apresentam baixa toxicidade aguda em mamíferos, não se acumulam nos tecidos adiposos e não são persistentes no ambiente. Ainda que sejam mais caros por unidade de peso em relação aos outros agrotóxicos, os piretróides têm sido bastante empregados na área da saúde, utilizados como domissanitários e em programas de saúde pública no combate de insetos vetores de doenças, e na agricultura, onde são utilizados em uma grande variedade de culturas. Isto ocorre devido à alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, resultando em menor contaminação nas aplicações. Com isso, vêm ocupando rapidamente o lugar dos organofosforados. Porém, apesar de suas inúmeras vantagens podem causar intoxicações em indivíduos potencialmente expostos<sup>43</sup>.

#### ***IV. 1.2. Agrotóxicos - sistema de classificação.***

A toxicidade dos agrotóxicos depende de sua estrutura química e propriedades físico-químicas, sendo responsáveis por intoxicações agudas, bem como por efeitos em longo prazo da saúde, incluindo câncer e efeitos adversos na reprodução <sup>44</sup>.

Os agrotóxicos, definição adotada por sua ampla utilização agrícola, são mais bem caracterizados pela sua função que por suas características químicas. O que transforma uma determinada substância em um agrotóxico não tem correlação direta com sua estrutura e suas propriedades físico-químicas, e sim com sua ação tóxica potencial sobre determinada(s) espécie(s) e sua aplicação. Isto explica as diferentes denominações usadas para estas substâncias <sup>45</sup>.

De acordo com a espécie de praga que se pretende controlar, podemos classificá-los em inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, carrapaticidas e assim por diante <sup>45</sup>.

Sob a perspectiva analítica, destaca-se a classificação baseada na classe química a que pertencem. Neste caso, podemos destacar os organoclorados, OPs, carbamatos, piretróides, os compostos bupiridílicos, ácido ariloxialcanóico e triazinas.

Outro parâmetro de classificação, menos usual e recomendado pela OMS e pela ANVISA, considera o grau de toxicidade exibido por esses compostos, e são baseados na toxicidade aguda oral e dérmica verificada em ratos.

Segundo a OMS, de acordo com essa classificação, os agrotóxicos podem ser descritos como extremamente tóxicos (classe IA), altamente tóxicos (classe IB), medianamente tóxicos (classe II), discretamente tóxicos (classe III) e pouco tóxicos (classe IV) e, segundo a ANVISA, são considerados extremamente tóxicos (Classe I), altamente tóxicos (Classe II), medianamente tóxicos (Classe III) e pouco tóxicos (Classe IV) <sup>46</sup>.

Um sistema de classificação baseado no mecanismo de ação desses compostos tem sido muito útil na atenção à saúde das populações exposta <sup>47</sup>. Isto porque este parâmetro de classificação preconiza a toxicodinâmica dos agrotóxicos, sendo por este sistema classificados em anticoagulantes, anticolinesterásicos, etc. Esta sistemática é muito importante do ponto de vista da toxicologia ocupacional, pois relaciona os mecanismos de ação e a dose de exposição aos efeitos tóxicos no organismo humano. Segundo esta classificação, os anticolinesterásicos, que englobam os compostos do grupo químico dos OPs e carbamatos, destacam-se devido a sua grande utilização e alta toxicidade quando comparados a outros agrotóxicos <sup>18</sup>.

#### ***IV. 1.3. Os compostos OPs e seu mecanismo de ação tóxica.***

Os compostos OPs foram desenvolvidos inicialmente com intuítos bélicos pela Alemanha nazista durante a segunda grande guerra. Estes agentes, conhecidos como gases dos nervos, exerciam um enorme poder homicida. Posteriormente, com o intuito de reduzir sua toxicidade ao homem, foram feitas modificações nas estruturas destas substâncias para que pudessem então ser utilizadas como inseticidas <sup>48</sup>. Atualmente há mais de 20 mil compostos OPs que são usados como agrotóxicos e produtos químicos industriais. Os OPs são a classe de maior interesse comercial e toxicológico e todo este crescente interesse na síntese de novos OPs, particularmente os derivados pentavalentes tipo fosforoamidatos e fosforotioatos, é devido à sua aplicabilidade como agrotóxico. A principal razão para o sucesso dos compostos OPs como inseticidas é sua forte atividade biológica acoplada com sua relativa instabilidade na biosfera, que se traduz em uma meia-vida em plantas da ordem de dois até 10 dias <sup>49; 50</sup>.

Devido à fácil disponibilidade, os OPs são comumente usados para o suicídio, e os casos de envenenamento por sua larga utilização como inseticida na agricultura constituem um importante problema clínico nas regiões rurais dos países em desenvolvimento, onde são responsáveis por cerca de 200.000 mortes a cada ano. O primeiro relatório médico de intoxicação por OPs foi a partir de Pune, no qual 25 casos de intoxicação e dois óbitos foram notificados. A partir deste momento, um grande número de relatórios surgiram na literatura médica <sup>50; 51</sup>.

Em 1965, Rao e colaboradores relataram alterações na atividade da enzima AChE seguida pela exposição ao diazinon. Desde então, as correlações entre AChE e os sinais clínicos como um marcador de envenenamento por OPs passaram a ser avaliados <sup>50</sup>.

Hoje se sabe que os OPs exercem seu efeito tóxico sobre o sistema nervoso, através da inibição da atividade algumas enzimas como AChE e esterase neurotóxica, e também interagindo diretamente com receptores nicotínicos. Porém, os efeitos mais imediatos produzidos no organismo pela intoxicação por OPs, resultam da sua ligação a AChE no sistema nervoso central e periférico <sup>51</sup>.

A AChE faz parte de um grupo de enzimas, as serino-esterases, e sua função no sistema nervoso é hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses nervosas. A enzima é encontrada nos neurônios colinérgicos, e em concentrações elevadas na junção neuromuscular. Está amplamente distribuída no sistema nervoso central e também é encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos <sup>52; 53</sup>. A sua inibição

ocasiona o acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas refletindo uma crise colinérgica com manifestações nervosas centrais e periféricas<sup>23; 51</sup>.

A neurotransmissão mediada pela acetilcolina é fundamental para o correto funcionamento do sistema nervoso central, e representa o sistema neurotransmissor mais antigo do ponto de vista filogenético<sup>54</sup>. Os neurônios colinérgicos inervam a musculatura voluntária do sistema somático e também são encontrados no sistema nervoso central<sup>55</sup>.

Baseando-se em suas diferentes afinidades por agentes que mimetizam a ação da acetilcolina, os receptores colinérgicos são divididos em duas classes distintas: receptores muscarínicos e receptores nicotínicos<sup>56</sup>. Os receptores muscarínicos ligam-se à acetilcolina e à muscarina, um alcalóide presente em certos cogumelos venenosos<sup>57</sup>. Estes receptores são encontrados em gânglios do sistema nervoso periférico e nos órgãos efetadores autonômicos, como o coração, o músculo liso, o cérebro e glândulas exócrinas<sup>58</sup>. Os receptores nicotínicos reconhecem a acetilcolina e a nicotina<sup>59</sup>. Esses se localizam no sistema nervoso central, na medula adrenal, nos gânglios autonômicos e na junção neuromuscular<sup>58</sup>. Uma vez liberada nas sinapses, a acetilcolina é degradada pela enzima AChE em acetato e colina, sendo esta última recaptada pelo neurônio<sup>60</sup>. Na presença de OPs, a acetilcolina é impedida de interagir com o sítio catalítico da enzima, ocorrendo um acúmulo do neurotransmissor nas fendas sinápticas, resultando em toda a sintomatologia da intoxicação<sup>23</sup>.

A inibição da AChE após a exposição OP é responsável pela manifestação clínica, de modo que uma redução em 50% de sua atividade está associada a disfunções autonômicas e em 80% está associada com fraqueza neuromuscular.

A síndrome colinérgica aguda devido à inibição da atividade da AChE ocorre dentro de minutos ou horas após exposição. A síndrome intermediária, que geralmente inicia-se entre 24 a 96 horas após a síndrome aguda é caracterizada por parestesia respiratória, fraqueza, diminuição dos reflexos e sintomas extrapiramidais transitórios, e não responde ao tratamento com antagonista colinérgico<sup>26</sup>.

O quadro sintomatológico da intoxicação por OPs devido à superestimulação de receptores muscarínicos no sistema parassimpático é caracterizada por broncoespasmo, broncorréia, miose, lacrimejamento, diarreia, hipotensão, bradicardia, vômito e salivação, enquanto que as manifestações nicotínicas no sistema simpático causam taquicardia, midríase, hipertensão e sudorese.

No sistema nervoso central, a estimulação de receptores nicotínicos e muscarínicos levam a um quadro de agitação, confusão mental, coma e parada respiratória. E na junção neuromuscular, pode causar fraqueza muscular, paralisia e fasciculação<sup>51</sup>.

Os compostos OPs apresentam uma estrutura geral caracterizada pela presença de um átomo de fósforo associado por dupla ligação a um átomo de enxofre ou oxigênio. Porém, somente OPs que possuem o átomo de fósforo ligado ao oxigênio (P = O) podem interagir diretamente com a AChE. Aqueles que possuem o átomo de fósforo associado ao enxofre (P = S), como o paration, por exemplo, necessitam ser bioativados *in vivo* a seus análogos “oxon” para se tornarem tóxicos. Esta bioativação se dá por ação das isoenzimas hepáticas do citocromo P450 que catalisam reações de dessulfuração desses compostos gerando metabólitos tóxicos como diazoxon, paroxon e clorpirifós oxon que são inibidores diretos da AChE<sup>23</sup>.

Os OPs causam basicamente três tipos de seqüelas neurológicas após uma intoxicação aguda ou devido às exposições crônicas: polineuropatia retardada, síndrome intermediária e efeitos comportamentais. A polineuropatia inclui fraqueza progressiva, perda de coordenação nas pernas, podendo evoluir até a paralisia. Os principais sintomas da síndrome intermediária são a diarreia intensa e a paralisia dos músculos do pescoço, das pernas e da respiração que ocorrem de forma aguda, podendo levar ao óbito. Dentre os efeitos comportamentais destacam-se: insônia, sono conturbado, ansiedade, retardo de reações, dificuldade de concentração e uma variedade de seqüelas psiquiátricas como apatia, irritabilidade, depressão e esquizofrenia<sup>23</sup>.

#### **IV. 2. Tabaco e nicotina.**

O tabaco é uma planta da família das solenáceas, sendo a espécie *Nicotiniana tabacum* a espécie mais utilizada. A planta nasceu provavelmente nos vales orientais dos Andes bolivianos e se difundiu no atual território brasileiro através das migrações indígenas, sobretudo Tupi-Guarani. Havia vários tipos de fumo, mas apenas duas plantas eram usadas e cultivadas: a *Nicotiana tabacum* e a *Nicotiana rústica*. O fumo, para os índios brasileiros, tinha caráter sagrado semelhante à mandioca, o milho e muitas outras plantas de origem mística. O fumo era geralmente limitado aos ritos mágico-religiosos e como planta medicinal, reservado unicamente aos pajés<sup>61; 62; 63 64</sup>.

A planta possui um alcalóide de ocorrência natural proveniente de suas folhas, a nicotina. A nicotina foi assim denominada por Jean Nicot, um diplomata e estudioso



francês, que enviou sementes de tabaco de Portugal para Paris em 1550, e promoveu seu uso medicinal. Em 1571 a nicotina já era conhecida em estado bruto, mas somente em 1828 foi isolada da planta do tabaco pelos químicos germânicos Posselt e Riemann. Sua fórmula empírica foi descrita por Melsens em 1843, e foi inicialmente sintetizada por Pictet e Crepieux em 1893 <sup>65</sup>.

A nicotina é um líquido incolor e inodoro, oleoso, que quando exposto ao ar ou à luz, adquire uma coloração marrom e um odor característico do tabaco. Sua biossíntese ocorre nas raízes, sendo posteriormente armazenada nas folhas onde seus níveis atingem entre 2 a 7% em peso da planta. Pode ser encontrada também em concentrações menores em outras plantas da família Solanaceae, como por exemplo, no tomate, na batata e no pimentão verde <sup>66</sup>.

A nicotina age ligando-se aos receptores colinérgicos nicotínicos, encontrados no cérebro, gânglios autônomos e na junção neuromuscular <sup>67</sup>. Os receptores nicotínicos neurais são compostos por subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Uma variedade de combinações dessas subunidades já foi identificada e é esta variedade que confere propriedades estruturais e funcionais distintas a diferentes subtipos de receptores nicotínicos <sup>68</sup>.

Estes diferentes receptores nicotínicos variam em relação à afinidade de ligação e a resposta à estimulação por seus agonistas, o que explica a diversidade de efeitos ocasionados pela nicotina. A ativação dos receptores nicotínicos ocasiona a liberação de neurotransmissores, como por exemplo: acetilcolina, norepinefrina, dopamina, serotonina, beta-endorfina, glutamato, entre outros <sup>69</sup>.

Em doses baixas a nicotina causa uma ativação simpática através da ativação de receptores periféricos ou através de um efeito direto no cérebro, com conseqüente aumento nos batimentos cardíacos e pressão sanguínea. Já em doses elevadas, ela age diretamente no sistema nervoso periférico, produzindo estimulação ganglionar e liberação de catecolaminas pelas adrenais. Em doses extremamente altas, causa hipotensão e bradicardia <sup>69</sup>.

No sistema nervoso autônomo, a nicotina pode atingir todos os gânglios autonômicos, simpáticos e parassimpáticos. Além disso, ainda estimula a medula da supra-renal provocando a liberação de epinefrina e norepinefrina, que ativam receptores viscerais e provocam ações reflexas. No sistema respiratório, a nicotina inicialmente exerce estimulação, já em elevadas doses observa-se depressão deste sistema. A nicotina pode paralisar os músculos respiratórios pela sua ação direta sobre as junções neuromusculares. No sistema cardiovascular provoca aumento da frequência cardíaca e

elevação da pressão arterial. Também ocasiona redução do apetite. Na pele observa-se queda da temperatura devido à vasoconstrição provocada por mecanismo central. No sistema urinário há diurese pela inibição da vasopressina<sup>53</sup>.

#### ***IV. 2.1. A exposição à nicotina em cultura de tabaco - A doença da folha verde do tabaco ou “bebedeira do fumo”.***

O primeiro relato médico sobre a doença foi publicado em 1970 baseado em casos ocorridos na Flórida. Relatos sobre a doença ainda têm sido publicados descrevendo a sua ocorrência em agricultores em diferentes regiões dos Estados Unidos como na Carolina do Norte, Kentucky, Tennessee, Flórida, Connecticut, e ainda em países como Índia, Japão e Itália, e também na América Latina<sup>21</sup>.

A doença da folha verde do tabaco é uma forma de intoxicação pela nicotina e que afeta agricultores que têm contato com a planta do tabaco durante o processo de cultivo. Os sintomas são similares aos ocasionados pela exposição a agrotóxicos ou exaustão pelo calor. Porém, vários sintomas da intoxicação por OPs, incluindo lacrimação e miose, não têm sido associados à doença<sup>21</sup>.

A distinção sintomatológica entre a intoxicação por OPs e nicotina é difícil na grande maioria dos casos. Entretanto, a observação cuidadosa do início dos sintomas relacionada à atividade anteriormente realizada pode auxiliar na distinção da intoxicação. Geralmente, no cultivo do tabaco, a aplicação de agrotóxicos ocorre alguns dias antes da colheita. Então, a probabilidade de que os sintomas da doença da folha verde sejam ocasionados por OPs torna-se menor quando se observa que a aplicação do agrotóxico ocorreu semanas antes do momento da colheita.

O contato direto através do manuseio da folha durante o plantio das mudas, colheita e cura do tabaco, possibilita a absorção dérmica da nicotina, fazendo com que as tarefas de colheita e armazenamento sejam possivelmente os principais fatores que estão associados à doença<sup>70</sup>.

O início da doença ocorre entre três a dezessete horas após exposição e a duração dos sintomas pode variar de um a três dias<sup>70</sup>. Os sintomas característicos incluem tontura, dor de cabeça, náusea, vômito, além de dor e desconforto abdominal, prostração, dificuldade respiratória, diarreia e ocasionalmente, flutuações na pressão sanguínea<sup>21</sup>.

A doença da folha verde é uma ameaça para aqueles que cultivam o tabaco, pois a nicotina, sendo solúvel em água, pode ser eluída do tabaco pela chuva ou orvalho, e

subseqüentemente ser absorvida através da pele. Cerca de 9mg de nicotina pode estar contido em 100mL de orvalho <sup>71</sup>.

Embora a doença seja amplamente conhecida, poucos estudos têm mostrado sua incidência, prevalência ou fatores de risco. Sabe-se que sua incidência e riscos podem ser aumentados quando há uma lesão na integridade da pele, como pruridos, cortes e ferimentos, que podem facilitar a absorção da nicotina <sup>21</sup>.

#### ***IV. 3. Avaliação da exposição.***

A avaliação da exposição aos agentes químicos constitui um importante aspecto para a saúde pública, tendo em vista a possibilidade de se prevenir ou minimizar a incidência de mortes ou doenças decorrentes da interação das substâncias químicas com o organismo humano.

A detecção precoce de uma exposição perigosa pode diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos na saúde. As informações provenientes da monitorização da exposição ambiental ou ocupacional possibilitam a implantação de medidas de prevenção <sup>72</sup>.

A monitorização da exposição é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais, com a finalidade de detectar os possíveis riscos à saúde. A exposição pode ser avaliada por medida da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar (monitorização ambiental), ou através da medida de parâmetros biológicos (monitorização biológica), denominados indicadores biológicos ou biomarcadores <sup>72</sup>.

A avaliação biológica da exposição às substâncias químicas só é possível quando estiverem disponíveis suficientes informações toxicológicas referentes ao mecanismo de ação e/ou à toxicocinética dos agentes químicos aos quais os indivíduos estão expostos.

Quando a monitorização biológica está baseada na determinação da substância química ou do seu metabólito no meio biológico, torna-se essencial o conhecimento de como a substância é absorvida pelas diferentes vias; posteriormente, de como é distribuída para os diferentes compartimentos do organismo; de como é biotransformada; e, finalmente, de como é eliminada. Além de ser necessário saber também se a substância se acumula ou não no organismo <sup>73</sup>. Da mesma forma, se a monitorização biológica estiver baseada na medida de uma alteração biológica do organismo, causada pelo agente químico, é necessário conhecer o processo da toxicodinâmica, ou seja, é preciso conhecer o mecanismo de ação da substância química

para identificar quais são os efeitos não adversos decorrentes daquela ação. Isso se faz necessário porque só a identificação e a medida de um efeito precoce, não adverso, podem ser usadas para fins de prevenção <sup>74</sup>.

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo; entretanto, a determinação quantitativa destes parâmetros usados como biomarcadores, só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância. Desta forma, o biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde. Os biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e do tipo da exposição química. Podem ter como objetivos avaliar a exposição (quantidade absorvida ou dose interna), avaliar os efeitos das substâncias químicas e avaliar a suscetibilidade individual. Além disso, podem ser utilizados independentemente da fonte de exposição, seja através da dieta, do meio ambiente geral ou ocupacional. A utilização destes biomarcadores pode ter como finalidade elucidar a relação causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco à saúde; para fins de diagnóstico clínico; e para fins de monitorização biológica, realizada de maneira sistemática e periódica <sup>75; 76; 77</sup>.

O uso dos biomarcadores na avaliação de risco fornece uma ligação crítica entre a exposição à substância química, dose interna e prejuízo à saúde, e eles são valiosos na avaliação de risco. O processo de seleção e validação dos indicadores biológicos requer cuidado em relação à especificidade e sensibilidade, assim como a medida da exposição e a manifestação dos efeitos observados. A validação é um processo utilizado para estabelecer a relação quantitativa e qualitativa do biomarcador com a exposição, em função da substância química e do objetivo selecionado <sup>72</sup>.

Uma outra questão no que se refere à avaliação da exposição é que a contaminação e a mistura de substâncias é situação muito presente na realidade do trabalho agrícola, seja por causa das impurezas presentes nos agrotóxicos, dos inertes, seja pela aquisição de produtos associados ou pelo contato com diferentes substâncias no processo de cultivo agrícola <sup>78</sup>.

A maioria dos estudos não considera a interação que os diversos compostos químicos podem estabelecer entre si e sistemas biológicos orgânicos, sendo que essa

interação pode até mesmo modificar o comportamento tóxico de um determinado produto, acarretando efeitos diversos sobre a saúde do grupo de trabalhadores expostos.

Os conhecimentos atuais são muito incompletos no que se refere aos efeitos para a saúde produzidos por exposição combinada a vários fatores biológicos, químicos, físicos e psicossociais. Estes aspectos são relevantes, tendo em vista que os agricultores em geral desenvolvem as atividades de preparo e aplicação dos agrotóxicos numa situação em que estão presentes, ao mesmo tempo, misturas de agrotóxicos e outras substâncias.

A exposição combinada às substâncias químicas pode causar três tipos de efeitos sobre a saúde humana: independentes, sinérgicos (aditivos ou potencializados) e antagônicos<sup>78</sup>.

#### ***IV. 3. 1. Biomarcadores na avaliação da exposição a agrotóxicos OPs e a nicotina.***

São bem conhecidos os biomarcadores utilizados para avaliar as exposições a agrotóxicos OPs e nicotina. Sabe-se que ação anticolinesterásica dos compostos OPs não está restrita a inibição da AChE do tecido nervoso central e periférico, ocorrendo de forma paralela à inibição das colinesterases sanguíneas, a AChE eritrocitária e a BChE plasmática<sup>79</sup>. Assim, a avaliação da redução da atividade dessas enzimas funcionam como biomarcadores da exposição a compostos anticolinesterásicos, como os agrotóxicos pertencentes à classe dos OPs e dos carbamatos<sup>80</sup>.

A avaliação da exposição à nicotina é geralmente realizada pela determinação dos níveis de cotinina em fluidos biológicos. A cotinina é o principal metabólito da nicotina. Cerca de 80% da nicotina em humanos é transformada em cotinina, e é o marcador mais fidedigno da exposição crônica ao tabaco<sup>81;82</sup>. Assim, por estar presente no sangue em maior concentração e por mais tempo que a nicotina, e ainda por ser específica a exposição do tabaco, além de ter uma distribuição pelos fluidos corpóreos mais delimitada, a cotinina vem sendo utilizada para ser um marcador de exposição ao tabaco, e também para o controle da abstinência do tabagismo<sup>83</sup>. Este metabólito pode ser detectado em vários fluidos corporais, como: urina, saliva e soro, onde se tem alcançado valores relativos entre eles<sup>81</sup>. Por ser mais polar e lipofílica que a nicotina, a cotinina possui volume de distribuição mais restrito comparando com a nicotina. Por causa da baixa taxa de seu metabolismo e excreção renal, sua meia vida na corrente

circulatória é de aproximadamente 10 vezes maior que a nicotina, com cerca de 19 horas, possuindo uma estabilidade durante o dia todo em paciente fumante <sup>83</sup>.

A cotinina na saliva, plasma, urina, etc., é de especificidade idêntica para a exposição à nicotina, porém os níveis séricos mostram-se com maior tempo de estabilidade do que os outros fluidos <sup>84</sup>.

## ***Capítulo V - Metodologia***

### ***V. 1. Área de estudo - Município de Arapiraca – Estado de Alagoas.***

A área de estudo está inserida na região central do agreste Alagoano. Atualmente é a segunda cidade mais populosa do estado, posicionando-se logo depois de Maceió (figura 2). O município de Arapiraca faz divisa a norte com o município de Igaci, ao sul com o de São Sebastião, a leste com Coité do Nóia, Limoeiro de Anadia e Junqueiro, e por oeste com Craíbas, Lagoa da Canoa e Feira Grande. É um dos municípios mais importantes do Estado de Alagoas e conhecida como a Capital Brasileira do Fumo possuindo uma extensa área destinada ao cultivo do tabaco, sua principal fonte de renda ao longo da sua história <sup>77</sup>. O município de Arapiraca e localidades vizinhas destacam-se como principais produtores de tabaco, representando um importante papel sócio-econômico.

A cidade tem uma população de aproximadamente 214.000 habitantes, dos quais 15%, ou seja, aproximadamente 32.000 representam a população rural <sup>78</sup>. A etnia da população é composta por 29,7% de brancos, 5,6% de negros, 64,5% parda, 0,1% amarelos e 0,1% indígena <sup>20</sup>.

Cerca de 72,5% dos lares desse município recebe água da rede de abastecimento público, 5,4% tem rede de esgotamento sanitário (83,5% usa fossas rudimentares) e cerca de 33,3% da população é analfabeta <sup>20</sup>.





**Figura 2 – Localização geográfica do município de Arapiraca.**

Fonte: [www.pral.mpf.gov](http://www.pral.mpf.gov)

## V. 2. Amostragem.

Esse estudo englobou uma população de trabalhadores rurais envolvidos no cultivo do tabaco, residentes no município de Arapiraca / AL, maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos, que moram próximo e / ou trabalham em lavouras de cultivo de tabaco atuando nos processos de preparação, manejo e aplicação de agrotóxicos e/ou atividades relacionadas ao cultivo e manipulação da folha do tabaco para produção do fumo. Para coleta dos dados, elaborou-se um questionário estruturado (anexo I), a fim de obter informações sobre as características sócio-ambientais e de morbidade das pessoas envolvidas com o processo produtivo do fumo, com perguntas sobre o regime de uso de agrotóxicos no cultivo do tabaco, as formas de exposição à nicotina (ocupacional ou não), e a frequência da exposição a esta substância. O questionário aplicado na pesquisa é utilizado pelo Laboratório de Toxicologia do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) - FIOCRUZ para avaliação da exposição ocupacional e ambiental a agrotóxicos. Obedecendo ao padrão, foram acrescentadas perguntas referentes à exposição à nicotina no cultivo do tabaco.

Foi abordado um total de 85 trabalhadores para participar do estudo. A forma de amostragem utilizada foi qualitativa do tipo “bola de neve” ou “cascata”. Partiu-se de informantes-chave identificados pela equipe de saúde local. A partir da visita às propriedades desses informantes-chave, buscava-se novos participantes a partir da indicação dos inicialmente entrevistados. O critério utilizado para definir o tamanho da amostra foi o de recorrências de respostas a questões-chave, também chamado de critério de exaustão. Este processo de abordagem foi o que possibilitou recrutar um maior número de trabalhadores, pois as tentativas de reuni-los em locais determinados para apresentá-los à pesquisa a ser desenvolvida não foram bem sucedidas.

A amostragem utilizada neste estudo foi inicialmente avaliada em um projeto integrado sendo submetida a avaliações qualitativas do processo de trabalho. Assim, optou-se por fazer a avaliação quantitativa da exposição a agrotóxicos e nicotina deste grupo de trabalhadores sem a seleção de um número amostral baseada em cálculos estatísticos.

A seleção dos agricultores foi baseada em critérios de exclusão como: não ser residente no município de Arapiraca, ser menor de 18 anos, não residir em área de cultivo e não concordar em participar do estudo. De acordo com estes critérios foram selecionados 72 trabalhadores, os quais receberam o questionário concordando em participar do estudo mediante assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo II).

Um grupo controle foi constituído com 45 indivíduos residentes no município de Arapiraca / AL, maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos, não fumantes, não agricultores. Os indivíduos deste grupo foram selecionados na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), mediante a concordância em participar do estudo com a assinatura do termo de consentimento.

Os dados quantitativos foram processados utilizando-se o programa SPSS.

### ***V. 3. Fase exploratória de campo.***

A fase exploratória de campo foi feita através de visita às lavouras de tabaco durante o período de cultivo do tabaco com o objetivo de conhecer o processo de trabalho na lavoura. Foram visitadas duas propriedades, onde se pôde observar as tarefas desempenhadas pelos agricultores no processo de cultivo do tabaco, como, o manuseio da folha e regime de uso de agrotóxicos local (figuras 3 e 4).



**Figura 3 – Montagem do varal para a secagem das folhas de tabaco.**

Fonte: Elaboração própria



**Figura 4 – Colocação das folhas de tabaco no varal.**

Fonte: Elaboração própria

#### ***V. 4. Aplicação de questionário.***

Professores da UFAL, com a colaboração voluntária dos agentes comunitários foram em domicílio dos trabalhadores e nas propriedades rurais de cultivo de tabaco para realizar as entrevistas com cada agricultor participante do estudo.

Os questionários foram aplicados aos trabalhadores após os mesmos estarem cientes da proposta do estudo e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, concordando em participar da pesquisa.

### ***V. 5. Reagentes.***

- Iodeto de acetiltiocolina (Sigma).
- TRIS-Hidroximetil aminometano (Merck).
- Ácido ditio-bis-nitrobenzólico (DTNB) (Sigma-Aldrich Co)
- Albumina bovina (Sigma-Aldrich Co)
- Etil-paraoxon (Chem. Serv. Co)
- Iodeto de acetiltiocolina (Sigma-Aldrich Co)
- Reagente de Folin (Sigma-Aldrich Co)
- Sulfato de quinidina (Sigma-Aldrich Co)
- Nicotina (Sigma-Aldrich Co)
- Os demais reagentes foram de grau analítico.

### ***V. 6. Equipamentos.***

- Espectrofotômetro Thermo Scientific, modelo: BioMate 6;
- Leitora de microplacas Termoplate, modelo TP-READER.
- Centrífuga Refrigerada HITACHI – CR21E.
- E demais equipamentos de uso laboratorial comum.

### ***V. 7. Avaliação do efeito in vitro da nicotina sobre a atividade da AChE eritrocitária humana.***

Foram convidados a participar do estudo indivíduos voluntários do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) para doarem amostras de sangue. Participaram deste estudo indivíduos não fumantes e sem contato com agentes inibidores da atividade da AChE, como agrotóxicos.

Para avaliação do efeito da nicotina sobre a atividade da AChE eritrocitária foram realizados dois ensaios. No primeiro ensaio foram testadas três concentrações de nicotina, 0,1mM, 0,5mM e 1,0mM em solução salina 0,9%. Amostras de sangue de cinco voluntários foram coletadas por punção venosa em tubos heparinizados do tipo vacunteiner. Um pool dessas cinco amostras foi centrifugado a 3000 rpm por 5min. para separação da fração eritrocitária. Em seguida, um volume de 500µL desta fração foi ressuspenso na proporção de 1:10 em tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,6 e armazenado a -20<sup>0</sup>C por 24h. Após esta etapa de congelamento, as hemácias foram submetidas a três processos de centrifugação a 4000G. durante 15min. a 8°C em



centrífuga refrigerada para retirar hemoglobina. Ao final de cada processo foi desprezado o sobrenadante e as membranas de hemácias sedimentadas foram novamente ressuspensas em tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,6 na mesma relação supracitada. Após a terceira centrifugação, foi retirado o sobrenadante acrescentando-se 500 $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,12M, pH 7,6, obtendo-se uma suspensão de membranas de hemácias<sup>80</sup>.

Para determinação da atividade da AChE, foram adicionados em tubos de análise 2,0mL de tampão fosfato de sódio [0,12M, pH 7,6] e 0,5mL de solução de DTNB [2mM] em tampão fosfato de sódio [0,12M, pH 7,6]. No momento da análise foram adicionados, 25 $\mu$ L de suspensão de membranas de hemácias e 0,5mL de solução de iodeto de acetilcolina 9,0mM (tubo controle)<sup>80</sup>. Nos demais foram adicionados 30, 150 e 300 $\mu$ L de solução de nicotina 10mM, obtendo-se respectivamente as concentrações finais de 0,1, 0,5 e 1,0mM<sup>35</sup>. A determinação da atividade enzimática foi medida cineticamente em 412nm sendo esta expressa em  $\mu$ moles/min./mL). Para a conversão das absorvâncias em atividade enzimática foi utilizada uma curva padrão de L-cisteína<sup>85</sup>. A atividade enzimática da AChE eritrocitária foi corrigida pela concentração de proteína das amostras. Para determinação da concentração de proteína, em tubos de análise foram adicionados H<sub>2</sub>O destilada, 200 $\mu$ L de solução de NaOH a 20% e solução de albumina (1mg/mL) construindo uma curva padrão contendo 100, 200, 300, 400, e 500  $\mu$ g de albumina.

Nos tubos relativo às amostras foram pipetados 50 $\mu$ L da suspensão de membranas de hemácias. No primeiro tubo (branco) foram adicionados 300 $\mu$ L de reagente de Folin levando-se ao vórtex por 30 seg. O mesmo procedimento foi repetido para os demais tubos durante um período de 5min. Transcorrido este tempo, foi iniciada a leitura no espectrofotômetro. A análise foi realizada fotometricamente em comprimento de onda de 660 nm, determinando-se a concentração de proteína em mg/mL<sup>86</sup>.

No segundo ensaio, solução inicial de nicotina 10mM em salina 0,9% foi diluída em 1:10 e 1:100. Um pool de 5 amostras de sangue total coletadas em tubos heparinizados foi separado em nove alíquotas de 1,8mL. As alíquotas foram contaminadas com as soluções de nicotina (0,1, 1,0 e 10mM) obtendo-se concentrações finais de 300, 500, 1000, 1500, 3000, 6000, 12000 e 24000ng/mL de sangue, completando-se o volume final para 2mL de sangue total com solução salina 0,9%. Após 30 minutos de incubação<sup>35</sup>, a atividade da AChE foi determinada utilizando-se de

400µL de solução Tris [0,1M] – triton 1%, 10µL de amostra de sangue total. A reação enzimática foi disparada pela adição de 4,0mL de solução de acetilcolina [0,97mM] em tampão de fosfato de sódio [59mM], pH 7,5, ácido ditio-bis-nitrobenzóico (DTNB) [0,038mM] e sulfato de quinidina [0,024mM]. As análises foram feitas com todos os reagentes e soluções à temperatura ambiente. A determinação da atividade enzimática foi realizada cineticamente em 440nm sendo esta expressa em kU/L (mmoles/min/L). Para a conversão das absorvâncias em atividade enzimática foi utilizada uma curva padrão de L-cisteína <sup>85</sup>.

#### ***V. 8. Estudo do efeito in vitro da nicotina e OP sobre a atividade das AChE eritrocitária.***

Para avaliar um possível efeito da nicotina sobre o efeito inibidor de um OP na atividade da AChE *in vitro*, as mesmas nove alíquotas de sangue total, acima citadas, já contaminadas com nicotina, foram também contaminadas com solução de etil paroxon em metanol. O etil paroxon foi utilizado por ser um OP de ação direta não necessitando de metabolização prévia para produzir efeito inibidor sobre a AChE.

Solução de etil paroxon [1000µg/mL] foi diluída em 1:10 em salina 0,9%. Posteriormente um volume de 12,5µL desta solução foi adicionado em todas as alíquotas obtendo-se uma concentração final de 0,062µg/mL de sangue. Após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, a atividade da AChE foi novamente determinada <sup>80</sup>.

#### ***V. 9. Avaliação da exposição ocupacional e ambiental a agrotóxicos anticolinesterásicos e a nicotina.***

A atividade da AChE foi utilizada como biomarcador na avaliação da exposição a agrotóxicos OPs e carbamatos. A atividade da enzima na população de agricultores foi analisada em dois momentos distintos, ou seja, em um período considerado de exposição a agrotóxicos e nicotina (entre agosto e setembro – ano de 2009) e outro período considerado de não exposição (entre maio e junho – ano de 2010). No período entre agosto e setembro (coleta 1) foram analisados 72 agricultores com relação a exposição a agrotóxicos OPs e carbamatos e à nicotina. No período entre maio e junho (coleta 2), um total de 38 agricultores que já haviam sido analisados na coleta 1, realizaram nova coleta de sangue, para que se pudesse fazer uma comparação da atividade da AChE desses agricultores em relação ao período considerado de exposição

e o de não exposição. A atividade da AChE dos agricultores na coleta 1 (N= 72) e na coleta 2 (N= 38) foi comparada ao grupo controle. Além disso, a atividade enzimática de cada agricultor que realizou as duas coletas, foi comparada individualmente entre os dois períodos, de modo que cada indivíduo pôde ser utilizado como seu próprio controle.

A exposição ocupacional ou não a nicotina foi avaliada pela determinação dos níveis de cotinina em amostras de soro.

#### ***V. 10. Análise da atividade da AChE e dos níveis cotinina plasmático na população de agricultores e grupo controle.***

##### ***VI. 10. 1. Coleta e processamento das amostras de sangue.***

As amostras de sangue para dosagem de AChE foram coletadas por punção venosa com seringa ou vacunteiner em tubos heparinizados<sup>85</sup>. Para determinação dos níveis de cotinina, as amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante. Após serem coletadas, as amostras de sangue para a dosagem de cotinina foram centrifugadas a 500 G para a obtenção do soro.

##### ***V. 10. 2. Determinação da atividade da AChE.***

Para a determinação da atividade enzimática da AChE eritrocitária, foi utilizado de 400µL de solução Tris [0,1M] – triton 1%, 10µL de amostra de sangue total. A reação enzimática foi disparada pela adição de 4,0mL de solução de acetiltiocolina [0,97mM] em tampão de fosfato de sódio [59mM], pH 7,5, ácido ditio-bis-nitrobenzólico (DTNB) [0,038mM] e sulfato de quinidina [0,024mM]. As análises foram feitas com todos os reagentes e soluções à temperatura ambiente. A determinação da atividade enzimática foi realizada cineticamente em 440nm sendo esta expressa em kU/L (mmoles/min/L). Para a conversão das absorvâncias em atividade enzimática foi utilizada uma curva padrão de L-cisteína<sup>85</sup>.



### **V. 10. 3. Determinação dos níveis de cotinina.**

A cotinina é o principal metabólito da nicotina, e é o analito de escolha por sua especificidade e meia-vida (18–20 h) sendo detectáveis em várias matrizes (plasma, saliva, urina) <sup>87</sup>.

Os níveis de cotinina foram determinados em amostras de soro por método de imunoenensaio competitivo em microplacas de poliestireno contendo anticorpo imobilizado, utilizando-se um kit, *cotinine serum micro-plate EIA*, da OraSure Technologies.

Para análise foram adicionados 10µL de amostra de soro e 100µL de enzima conjugada em cada poço, em duplicata. Após adição da amostra e da enzima conjugada, a placa foi incubada por 30 min. em câmara escura a temperatura ambiente (15 a 27 °C). Em seguida a placa foi lavada seis vezes com 300µL de H<sub>2</sub>O destilada. Então foram adicionados 100µL de substrato tetrametilbenzidina, incubando-se novamente por 30 min. em câmara escura à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 100µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) 2N para paralisar a reação. As absorvâncias foram medidas em leitor de microplacas em comprimentos de onda de 450nm com filtro de referência de 630nm após 30 min. da paralisação da reação. Uma curva de calibração foi utilizada para quantificação dos níveis de cotinina.

### **V. 11. Análise de dados.**

Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS Statistics 17.0. As informações contidas no questionário foram tabuladas e os dados foram submetidos inicialmente a análises descritivas univariadas, analisando por frequência as variáveis sexo, faixa etária, escolaridade e processo de trabalho.

Análises bivariadas para avaliar as diferenças na atividade da AChE entre o sexo masculino e feminino e entre os grupos analisados, bem como os níveis de cotinina plasmáticos entre fumantes e não fumantes na população estudada foram feitas utilizando teste t de Student e ANOVA.

Diferenças entre os grupos foram consideradas quando P valor < 0,05.

A influência da nicotina na atividade da AChE na população foi avaliada por regressão linear múltipla utilizando o teste de correlação de Pearson, para avaliar a correlação entre os níveis de cotinina e atividade da AChE.

***V. 12. Aspectos éticos da pesquisa.***

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) - nº 0004.0.031.000-07, a saber, que todo o trabalhador participou voluntariamente da pesquisa, assinando um TCLE.

## ***Capítulo VI - Resultados***

### **VI. 1. Perfil socioeconômico da população estudada.**

A amostragem deste estudo foi composta por um grupo de 72 agricultores, cuja participação foi voluntária. Como critério de inclusão foi utilizado o fato de ter no mínimo 18 anos de idade, ser residente no município de Arapiraca, morar próximo e/ou trabalhar em lavouras de cultivo de tabaco atuando nos processos de manejo e aplicação de agrotóxicos, e nas atividades que envolvem a manipulação da folha do tabaco. A média de idade dos participantes foi de 41,49 anos, variando de 18 a 88 anos. O sexo masculino apresentou média de idade de  $44,08 \pm 16,8$  anos, enquanto a média de idade do sexo feminino foi de  $38,59 \pm 12,9$  anos.

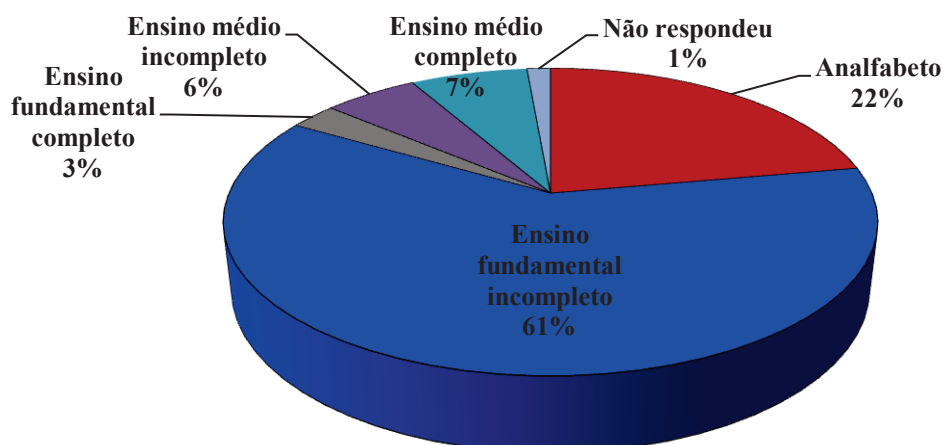
No grupo controle, composto por 23 homens e 22 mulheres, a média de idade do sexo masculino foi de  $27,42 \pm 6,04$  anos variando de 20 a 47 anos e no sexo feminino, a média de idade foi de  $29,16 \pm 8,57$ , variando de 21 a 45 anos. A distribuição da população estudada por faixa etária é mostrada na tabela 3.

**Tabela 3 – Número de participantes por sexo e distribuição etária da amostra de 72 agricultores participantes do estudo.**

<b>População de Agricultores</b>									
<b>Sexo</b>			<b>Faixa etária</b>						
	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	<b>18 – 28</b>	<b>29 – 39</b>	<b>40 – 50</b>	<b>51 – 61</b>	<b>62 – 72</b>	<b>73 – 83</b>	<b>84 – 90</b>
<b>N</b>	38	34	16	17	20	13	4	0	2
<b>Percentual</b>	52,8%	47,2%	22,2%	23,6%	27,8%	18,0%	5,6%	0%	2,8%

Fonte: Elaboração própria.

Informação sobre o grau de escolaridade dos participantes é mostrado no gráfico da Figura 2. Verificou-se que apenas 5 indivíduos possuíam o ensino médio completo, maior nível de escolaridade observado no grupo. Dos 72 participantes, 44 não tinham o ensino fundamental completo e 16 eram analfabetos. Apenas 2 indivíduos completaram o ensino fundamental. Quatro indivíduos possuíam o ensino médio incompleto, e apenas um participante não respondeu a esta pergunta. A distribuição percentual do grau de escolaridade dos 72 agricultores participantes do estudo é mostrada no gráfico da figura 5.



**Figura 5 - Distribuição percentual do grau de escolaridade dos agricultores.**

Fonte: Elaboração própria.

O hábito de fumar dos participantes foi verificado, assim como o consumo diário de cigarros por cada participante. Observou-se que o grupo de 72 agricultores era constituído de indivíduos fumantes e não fumantes. Quando questionados sobre o hábito de fumar, 28 responderam que tinham o hábito de fumar e 43 participantes declararam-se não fumantes. Apenas 1 participante não respondeu a esta pergunta. Dos 28 fumantes, 26 relataram a quantidade de cigarros que fumavam por dia, que em média foi de 11,46 cigarros, variando de 1 a 40 (tabela 4).

**Tabela 4 – Número de participantes fumantes e não fumante e consumo diário de cigarros.**

Hábito de fumar				Quantidade de cigarros consumidos diariamente			
	Sim	Não	Não respondeu	1 - 10	11 - 20	21 - 30	31 - 40
<b>N</b>	28	43	1	18	6	0	2
<b>Percentual</b>	38,9%	59,7%	1,4%	69,2%	23,1%	0%	7,7%

Fonte: Elaboração própria.

## ***VI. 2. Perfil do processo de aplicação de agrotóxicos na lavoura.***

Os 72 participantes do estudo foram questionados sobre a aplicação de agrotóxicos na lavoura, o tipo de equipamento que utilizavam para fazer a aplicação, carga horária de trabalho, sobre a utilização de equipamentos de proteção e quais os agrotóxicos que utilizavam. Também foi perguntado se o agrotóxico entrava em contato direto com a pele e, se em algum momento, durante ou após aplicação, haviam se sentido mal. Neste aspecto, buscou-se avaliar a exposição ocupacional, que pode ocorrer tanto no processo de formulação (mistura e/ou diluição dos agrotóxicos para uso), quanto no processo de utilização (pulverização, auxílio na condução das mangueiras dos pulverizadores, descarte de resíduos e embalagens contaminadas, etc.) e na colheita onde os trabalhadores manipulam/entram em contato com o produto contaminado. Dos 72 participantes, 43 (29 homens e 14 mulheres) afirmaram que aplicam agrotóxicos. Porém, 23 participantes disseram que não aplicam, e seis indivíduos não responderam a esta pergunta (figura 6).

Foi verificado que o equipamento mais utilizado na aplicação de agrotóxicos é o pulverizador costal manual (figura 7). Em um total de 49 participantes que responderam sobre qual o equipamento que utilizavam na lavoura para aplicar agrotóxicos, 35 afirmaram utilizar o pulverizador costal manual. Apenas 1 (um) agricultor relatou utilizar o pulverizador costal motorizado. Além dos pulverizadores, foi verificada a utilização da “canequinha” como equipamento de aplicação, relatada por 13 indivíduos para aplicação do agrotóxico no “olho do fumo”.

Em relação ao contato, dos 61 agricultores que responderam a esta pergunta, 47 indivíduos disseram que a substância entra em contato com a pele e 14 responderam que não (figura 8).

Um total de 50 agricultores respondeu sobre o número de horas gastos na aplicação de agrotóxicos na lavoura. Em média foi verificado que o tempo gasto nesta atividade é de aproximadamente 5 horas, variando de 1 a 12 horas (figura 9).

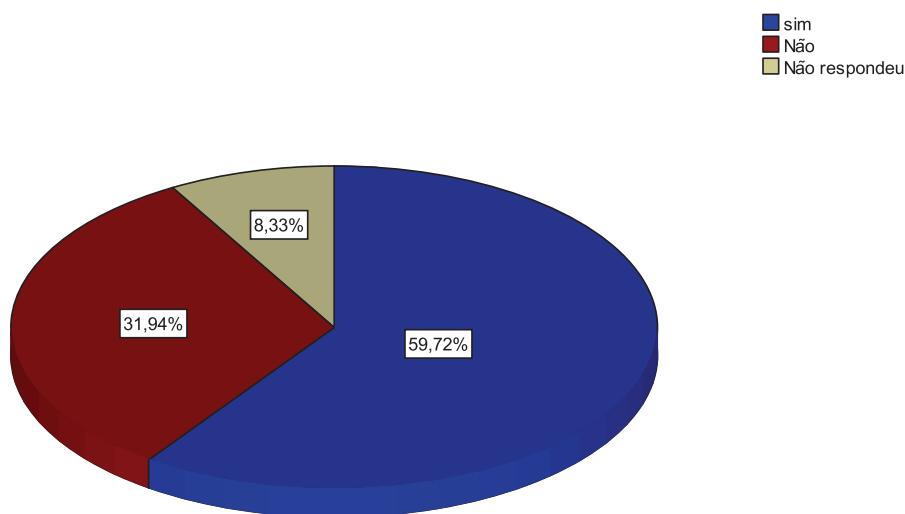
Sobre os agrotóxicos utilizados verificou-se que o Confidor, um inseticida neonicotinóide, é o mais utilizado, sendo relatado por 15 agricultores. Compostos como o Dithane (carbamato), Karatê (piretróide), Decis (piretróide) e Tamarom (OP) também foram relatados (tabela 5).

Quando questionados sobre a utilização de EPIs no processo de aplicação de agrotóxicos e o motivo pelo qual os mesmos não são utilizados, foi verificado que o fato de serem desconfortáveis, com 58,4% dos relatos, é o principal motivo que leva os

agricultores a não utilizar tais equipamentos. O segundo motivo seria o custo elevado dos mesmos, com 26,4% dos relatos (tabela 6). Um total de 44 participantes que responderam a esta pergunta.

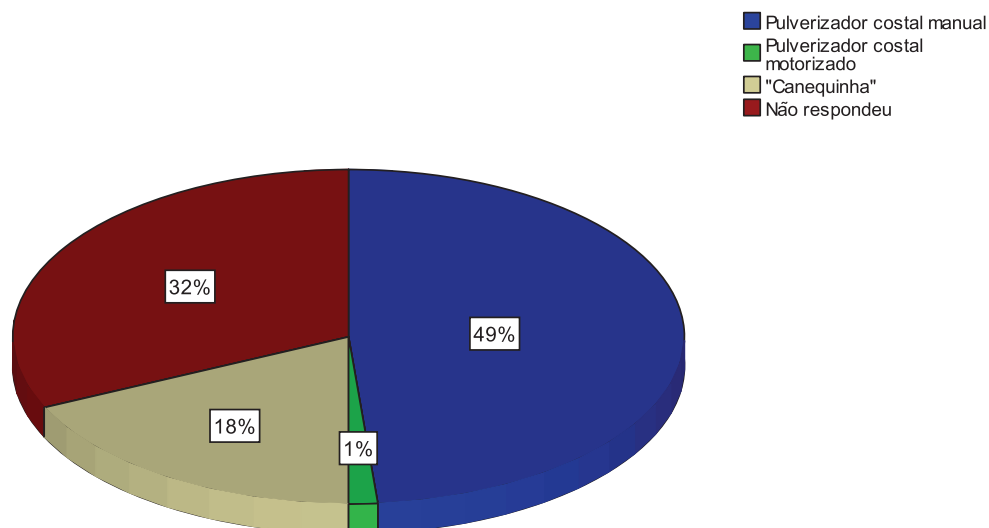
Sobre os sintomas, 58 agricultores relataram que durante ou após aplicação de agrotóxicos haviam se sentido mal. Entre os sintomas relatados estavam náusea, dor de cabeça, vômito, vertigem, diminuição da visão, diarreia, dor no peito, tremor e irritação na pele. A distribuição percentual dos sintomas relatados pelos agricultores é mostrada no gráfico da figura 10.

Embora tenha sido verificado que 23 agricultores relataram não aplicar agrotóxicos, considerou-se o risco de uma exposição ambiental pelo fato de residirem próximo às áreas de cultivo, estando vulneráveis ao contato com os agrotóxicos, seja pela sua dispersão/distribuição atmosférica, resultante da dispersão de partículas durante o processo de pulverização, ou pelo contato com matrizes ambientais contaminadas como água e solo.



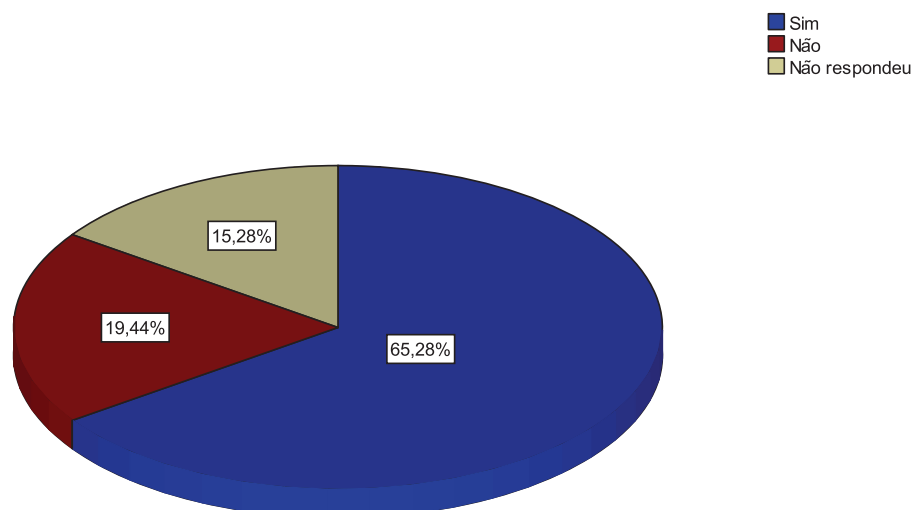
**Figura 6 – Você aplica agrotóxicos?**

Fonte: Elaboração própria.



**Figura 7 – Que tipo de equipamento você usa para aplicar a substância?**

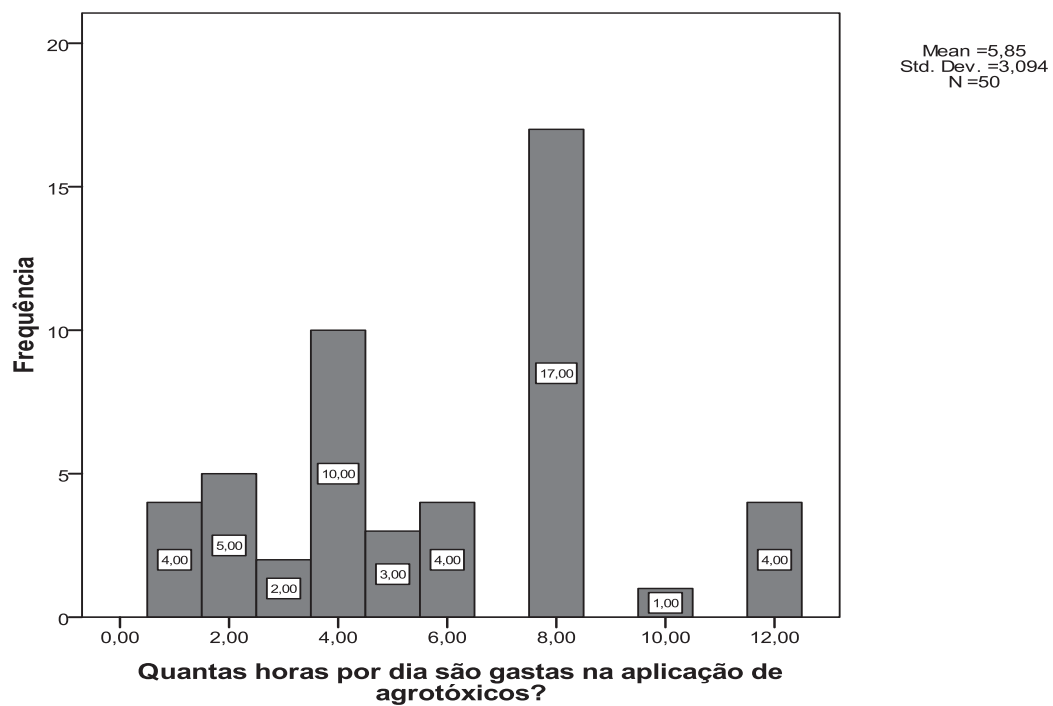
Fonte: Elaboração própria.



**Figura 8 – Sua pele entra em contato com o agrotóxico?**

Fonte: Elaboração própria.





**Figura 9 – Histograma do número de horas gastos na aplicação de agrotóxicos.**

Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 5 – Relação dos agrotóxicos utilizados pela população de agricultores.**

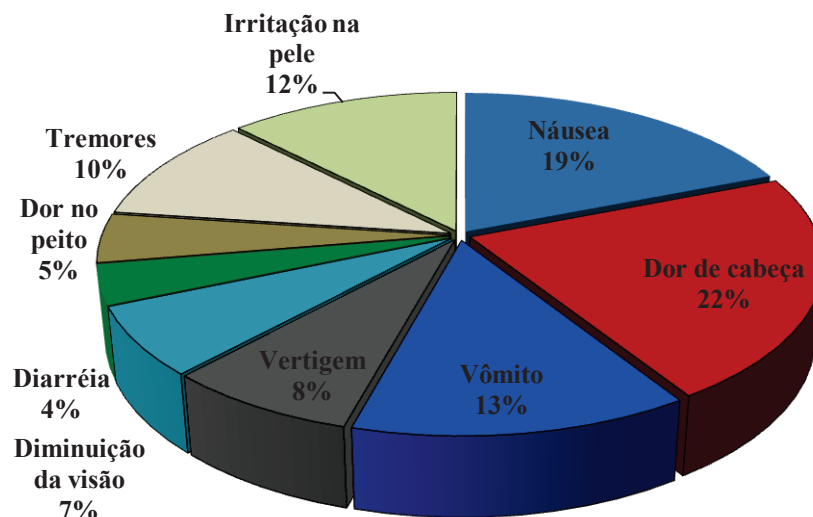
Nome Comercial	Nº de relatos	Grupo químico	Classe	Classificação toxicológica	
<b>Confidor</b>	15	Neonicotinóide	Inseticida	III	Pouco tóxico
<b>Dithane</b>	7	Carbamato	Fungicida /acaricida	II	Moderadamente tóxico
<b>Karate</b>	6	Piretróide	Inseticida	II	Moderadamente tóxico
<b>Decis</b>	6	Piretróide	Inseticida	II	Moderadamente tóxico
<b>Tamaron</b>	4	OP	Inseticida	I B	Altamente tóxico
<b>Primeplus</b>	3	Dinitrianiлина	Regulador do crescimento	IV	Muito pouco tóxico
<b>Baigon</b>	2	Carbamato	Inseticida	II	Moderadamente tóxico
<b>Furadan</b>	1	Carbamato	Inseticida	I A	Extremamente tóxico
<b>Lindano</b>	1	Organoclorado	Inseticida	II	Moderadamente tóxico
<b>Orthene</b>	1	OP	Inseticida	III	Pouco tóxico
<b>Lannate</b>	1	Carbamato	Inseticida	II	Moderadamente tóxico

Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 6 – Percentual de agricultores que relatam sobre o motivo da não utilização dos EPIs.**

Motivo	Desconfortáveis	Dificulta locomoção	Dificulta o trabalho	Custo elevado
<b>N</b>	31	2	3	19
<b>Percentual</b>	58,4%	2,8%	4,2%	26,4%

Fonte: Elaboração própria.



**Figura 10 – Distribuição percentual dos sintomas durante ou após a aplicação de agrotóxicos.**

Fonte: Elaboração própria.

### *VI. 3. Perfil do processo de colheita do tabaco na lavoura.*

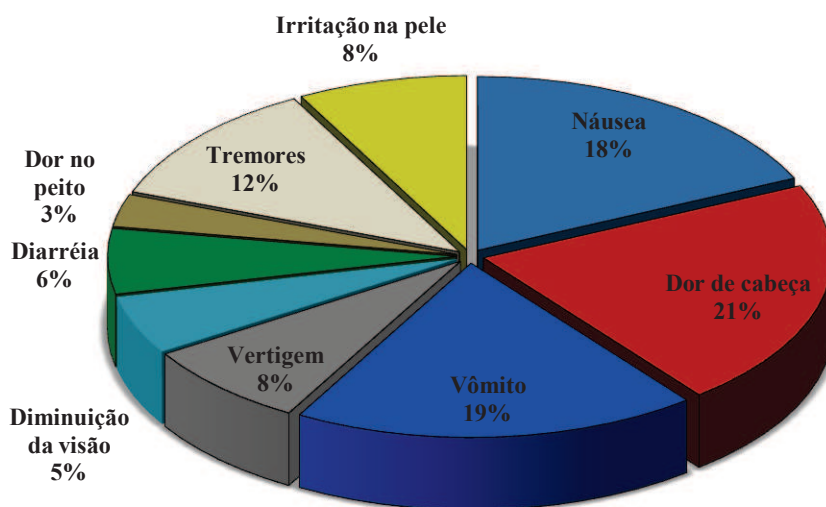
Na avaliação do processo de colheita do tabaco os 72 participantes foram questionados sobre o contato direto com a folha do tabaco, sobre a utilização de luvas no processo de colheita da folha, e se em algum momento sentiram-se mal durante esta atividade. Um total de 60 agricultores entre os 68 participantes que responderam sobre o contato direto com a planta informaram que a folha do tabaco entra em contato direto com a pele, e apenas 8 disseram não ter contato direto com a folha.

Sobre a utilização de luvas, 23 agricultores afirmaram utilizá-la durante a colheita do tabaco, enquanto 41 disseram que não utilizavam. Apenas 6 participantes não responderam a esta pergunta e 1 afirmou não manipular a folha. Sobre o fato de se sentirem mal durante a atividade de colheita, 46 afirmaram que em algum momento se sentiram mal enquanto coletavam o fumo, enquanto 22 participantes relataram não se sentirem mal durante esta atividade (tabela 7). Entre os sintomas relatados estavam náusea, dor de cabeça, vômito, vertigem, diminuição da visão, diarréia, dor no peito, tremor e irritação na pele. A distribuição percentual dos sintomas relatados pelos agricultores durante a colheita do fumo é mostrada no gráfico da figura 11.

**Tabela 7 – Perfil do contato dos agricultores com o tabaco.**

	<b>Contato direto com a folha N – %</b>	<b>Utilização de luvas na colheita N – %</b>	<b>Sentiu mal durante a atividade N – %</b>
<b>Sim</b>	60 – 88,2%	23 – 35,9%	46 – 67,6%
<b>Não</b>	8 – 11,8%	41 – 64,1%	22 – 32,4%
<b>Total de participantes que responderam</b>	68 – 94,4%	64 – 88,8%	68 – 94,4%

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 11 – Distribuição percentual dos sintomas durante a colheita do tabaco.**

Fonte: Elaboração própria.

A prevalência da sintomatologia relatada pelos agricultores durante a colheita do fumo foi comparada entre indivíduos fumantes e não-fumantes. Observou-se que sintomas como náusea, dor de cabeça, vômito, vertigem e irritação da pele foram significativamente mais prevalentes entre os não-fumantes, enquanto que como vertigem, diminuição da visão, dor no peito e tremores não mostraram diferença na prevalência entre os dois grupos (tabela 8). Também, a quantidade de sintomas relatados por fumantes e não fumantes foram comparados. O número de sintomas foi estratificado entre 0 a 3 e 4 ou mais sintomas. Foi verificado que os não fumantes relatam um número de sintomas significativamente maior (p valor = 0,04 qui-quadrado) comparados aos fumantes (tabela 9).

**Tabela 8 – Prevalência dos sintomas entre fumantes e não-fumantes.**

Sintomas	Fumantes n (%)	Não-fumantes n (%)	P valor (X <sup>2</sup> )
Náusea	7 (23%)	23 (77%)	0,006 *
Dor de cabeça	10 (29%)	25 (71%)	0,022*
Vômito	9 (29%)	22 (71%)	0,049*
Vertigem	3 (23%)	10 (77%)	0,128
Diminuição da visão	4 (44%)	5 (56%)	0,862
Diarréia	1 (10%)	9 (90%)	0,027*
Dor no peito	2 (40%)	3 (60%)	0,933
Tremores	5 (26%)	14 (74%)	0,106
Irritação na pele	2 (15%)	11 (85%)	0,032*

\*significância p < 0,05 teste qui-quadrado.

Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 9 – Prevalência em relação ao número de sintomas relatados entre fumantes e não-fumantes.**

Número de sintomas	Fumantes n (%)	Não-fumantes n (%)	P valor (X <sup>2</sup> )
0 a 3	23 (82%)	23 (59%)	
4 ou mais	5 (18%)	16 (41%)	0,044*

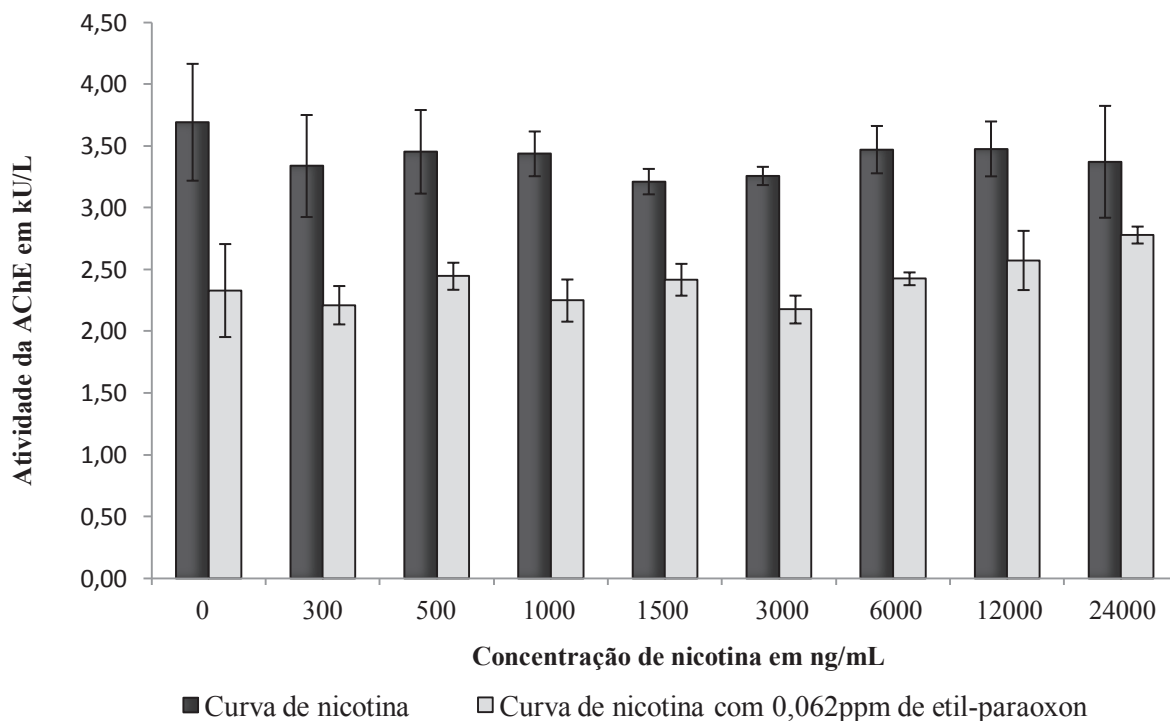
\*significância  $p < 0,05$  – teste qui-quadrado.

Fonte: Elaboração própria.

#### ***VI. 4. Efeito in vitro da nicotina e do etil paroxon sobre a atividade da AChE eritrocitária humana em sangue total.***

O gráfico da figura 12 mostra o efeito da nicotina e do etil paroxon sobre a atividade enzimática da AChE eritrocitária humana em um pool de 5 amostras de sangue total. A este pool foram adicionadas diferentes concentrações de nicotina, variando de 0 a 24000ng/mL, construindo-se uma curva. A alíquota de sangue não contendo nicotina (controle) apresentou uma atividade de 3,69 kU/L. A alíquota de sangue contendo 300ng/mL de nicotina mostrou uma atividade colinesterásica de 3,34kU/L  $\pm$  0,41. A alíquota contendo a concentração de 24000ng/mL apresentou uma atividade de 3,37kU/L  $\pm$  0,45. A análise do gráfico mostra que houve uma redução da atividade em todas as alíquotas contendo nicotina em relação ao controle, ou seja, uma inibição média de 8,45%. Porém, esta redução não mostrou uma relação com a concentração de nicotina, considerando-se então que o alcalóide não inibiu a atividade da enzima. Posteriormente foi adicionado o equivalente a 0,062ppm de etil paroxon em todas as alíquotas com o objetivo de verificar um possível efeito da nicotina sobre a capacidade de inibição enzimática do composto fosforado. O etil paroxon promoveu uma inibição média de 29,6% na atividade da enzima. A alíquota sem nicotina contaminada com etil paroxon apresentou atividade de 2,33 kU/L, correspondendo a uma inibição de 36,8%. A alíquota contendo 300ng/mL de nicotina e 0,062ppm do composto fosforado apresentou uma atividade de 2,21kU/L  $\pm$  0,16, e a alíquota contendo 24000ng/mL de nicotina e 0,062ppm de etil paroxon, demonstrou atividade de 2,78kU/L  $\pm$  0,07, inibições equivalentes a 40,1% e 24,7% respectivamente. Assim,

verifica-se que a nicotina não contribuiu para a redução da atividade enzimática promovida pelo etil paroxon.

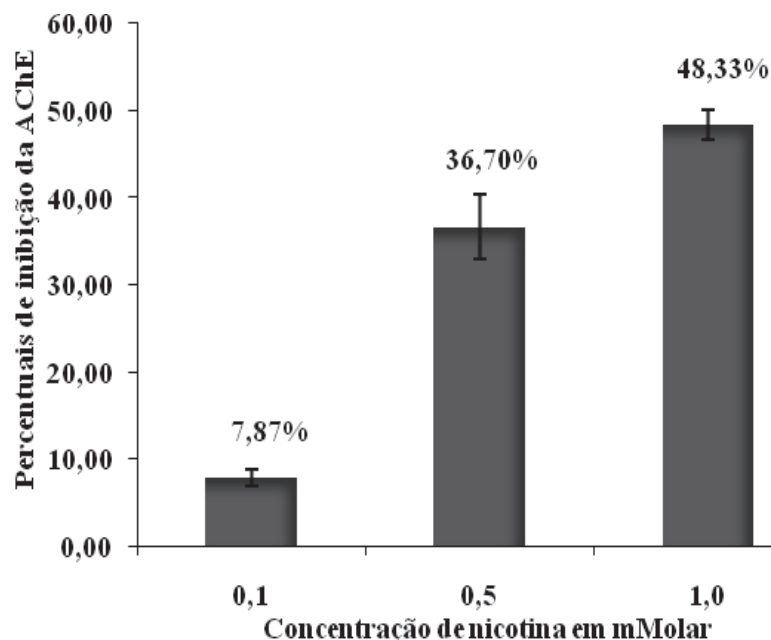


**Figura 12 – Curva de contaminação de AChE em sangue total com nicotina e etil paroxon.**

Fonte: Elaboração própria.

#### ***VI. 5. Efeito in vitro da nicotina sobre a atividade da AChE em membrana de hemácias humanas.***

O gráfico da figura 13 mostra o efeito da nicotina sobre a atividade enzimática da AChE eritrocitária humana. Neste ensaio, membranas de eritrócitos foram expostas a solução de nicotina nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0mM a temperatura ambiente. A exposição da AChE a uma concentração de 0,1mM de nicotina ocasionou uma redução de  $7,87\% \pm 1,04$  na sua atividade. As concentrações de 0,5 e 1,0mM promoveram uma inibição de  $36,7\% \pm 3,75$  e  $48,33\% \pm 1,74$  respectivamente.



**Figura 13 – Percentuais de inibição da AChE eritrocitária humana *in vitro* por nicotina.**

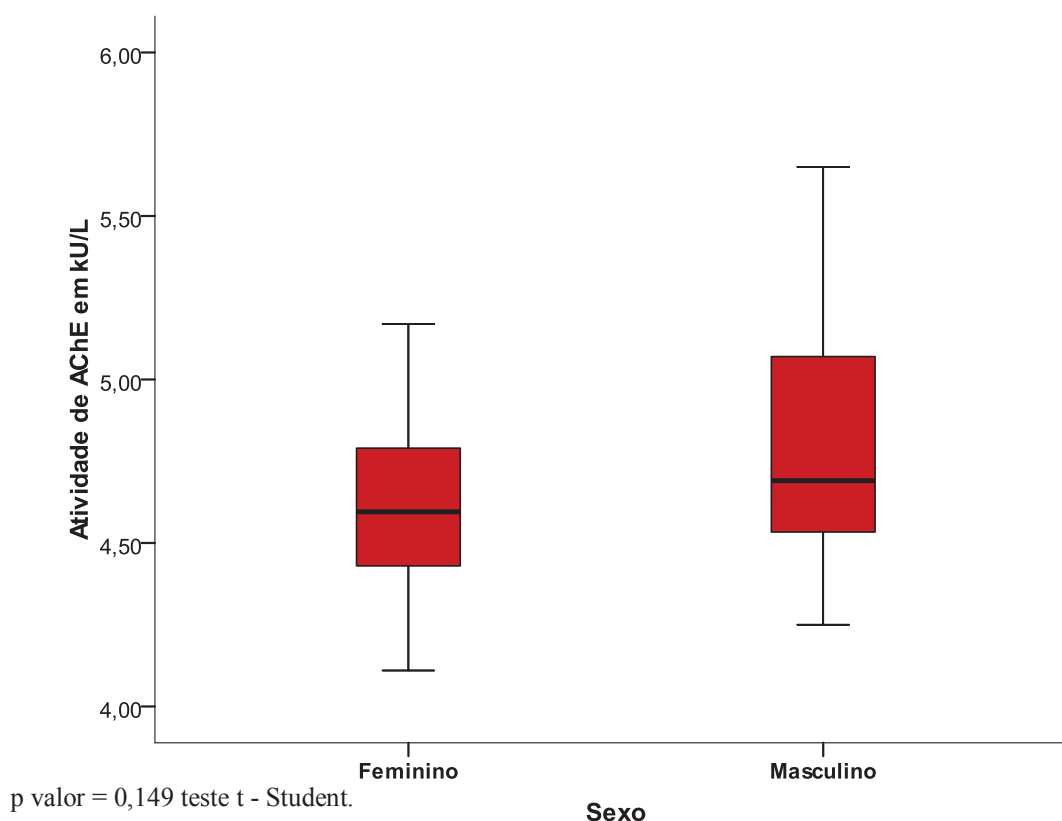
Fonte: Elaboração própria.

#### ***VI. 6. Análise da atividade da AChE e dos níveis cotinina plasmático na população de agricultores e grupo controle.***

##### ***VI. 6. 1. Atividade de AChE no grupo controle.***

A análise da atividade da enzima AChE eritrocitária dos 72 participantes foi utilizada na avaliação da exposição a agrotóxicos OPs. Para esta avaliação foi constituído um grupo controle composto por 45 voluntários, sendo 23 homens e 22 mulheres. A análise estatística pelo teste-t student mostrou que a atividade da AChE não apresentou diferença entre homens e mulheres (figura 14). No sexo masculino foi observada uma atividade média de AChE de  $4,79 \pm 0,40$  kU/L, o sexo feminino apresentou atividade média de  $4,63 \pm 0,31$  kU/L.





**Figura 14 – Atividade de AChE entre homens e mulheres do grupo controle.**

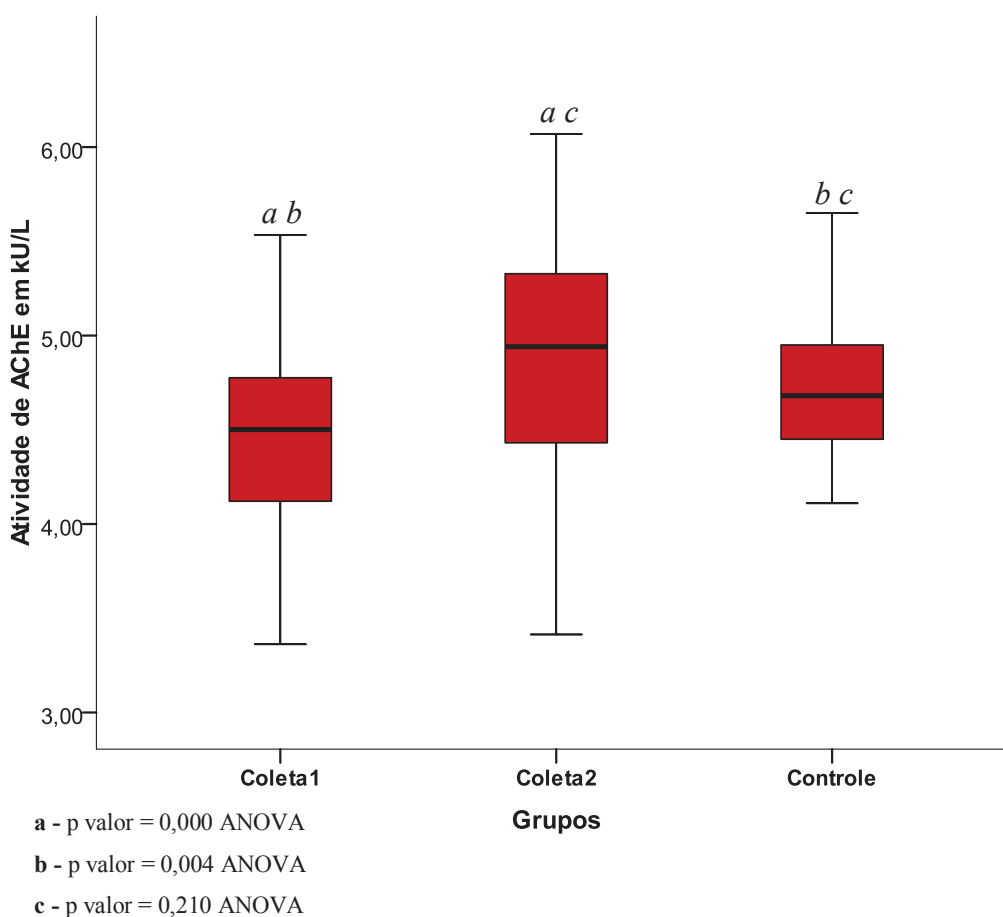
Fonte: Elaboração própria.

### ***VI. 6. 2. Atividade de AChE na população de agricultores.***

Utilizada como um biomarcador de exposição a agrotóxicos anticolinesterásicos, a atividade da AChE foi analisada na população de agricultores em dois momentos distintos, ou seja, no período de cultivo do tabaco (agosto e setembro / 2009) e no período entre safra (maio e junho / 2010). Nesta avaliação, homens e mulheres foram agrupados, pois, como verificado no grupo controle, a atividade da enzima não apresentou diferença entre os sexos. No período entre agosto e setembro (coleta 1), período de aplicação de agrotóxicos na lavoura de tabaco, a população apresentou atividade média de AChE de  $4,52 \pm 0,57$  kU/L. No período considerado entre safra da cultura de tabaco, entre maio e junho do ano (coleta 2), os mesmos agricultores apresentaram uma atividade enzimática média de  $4,92 \pm 0,59$  kU/L. Assim, verificou-se que durante o processo de cultivo de tabaco houve uma diminuição significativa de 8,13% (ANOVA  $p < 0,05$ ) na atividade AChE comparado ao período entre safra. Quando a atividade enzimática dos agricultores foi comparada ao grupo controle, que apresentou atividade média de  $4,72 \pm 0,37$  kU/L, também foi verificada uma diferença

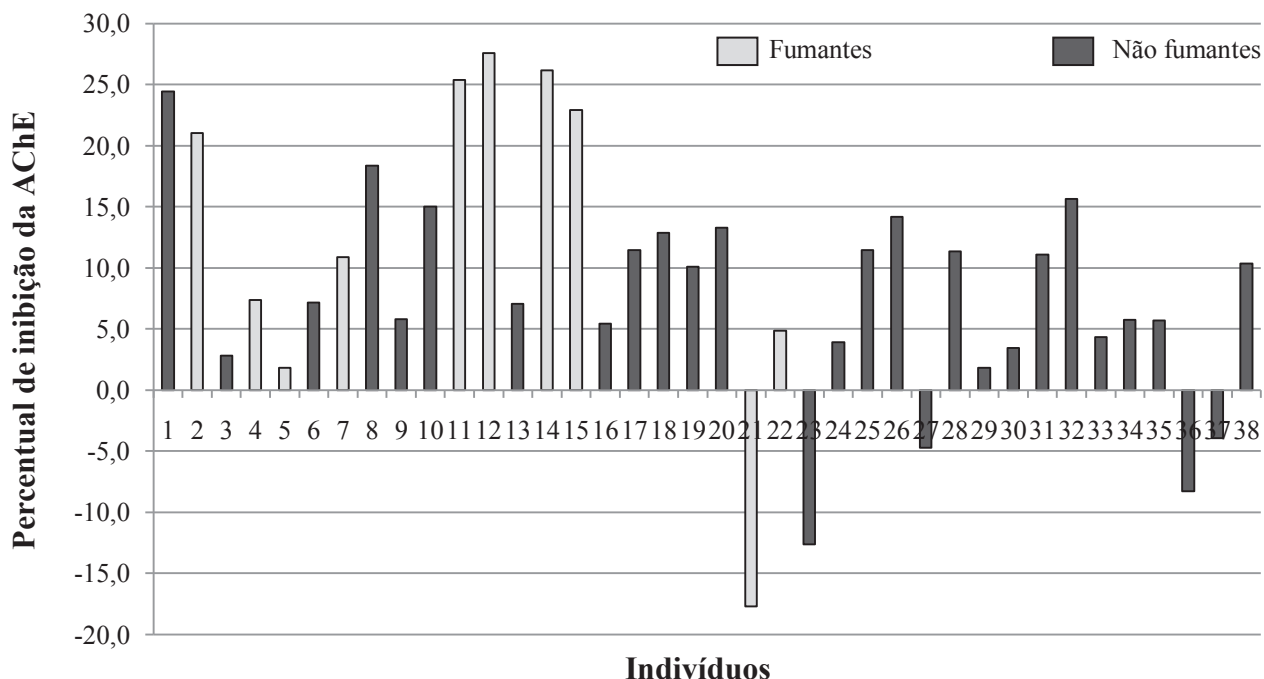
significativa entre a época de cultivo (coleta 1) e o grupo controle (ANOVA  $p < 0,05$ ). Porém, no período de entre safra (coleta 2), a atividade enzimática dos agricultores não mostrou diferença em relação ao grupo controle (figura 15).

Após observar uma menor atividade da AChE no período de cultivo (coleta 1), a atividade dos 38 agricultores que realizaram a coleta nos dois períodos foram comparadas individualmente, com o objetivo de verificar o percentual de inibição para cada agricultor. Comparando a atividade de cada agricultor em relação aos dois períodos ( $n=38$ ), pode-se verificar que seis indivíduos apresentaram redução da atividade enzimática superior a 20% enquanto 13 agricultores apresentaram redução entre 10 e 15% na atividade da enzima (figura 16).



**Figura 15 - Atividade de AChE na população de agricultores no período de cultivo (coleta 1), entre safra (coleta 2) e grupo controle.**

Fonte: Elaboração própria.



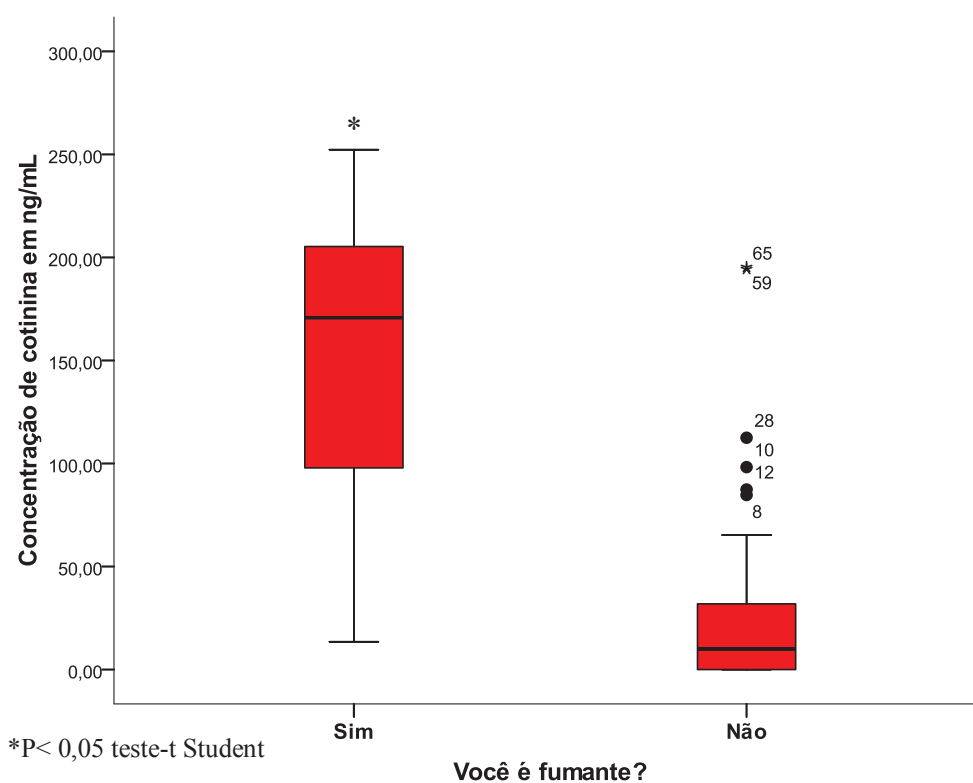
**Figura 16 – Percentual de inibição individual da atividade de AChE na população de agricultores entre período de cultivo (coleta 1) e período entre safra (coleta 2).**

Fonte: Elaboração própria.

### ***VI. 6. 3. Concentração de cotinina plasmática na população de agricultores e sua correlação com a atividade da AChE.***

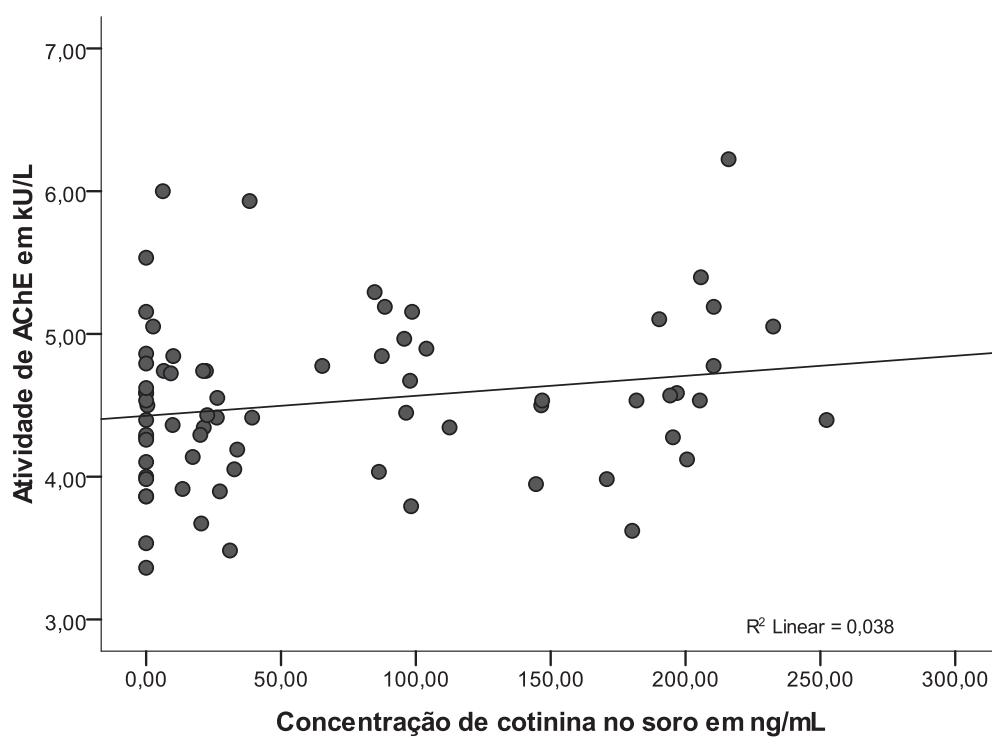
A concentração de cotinina plasmática foi determinada na população de agricultores no período de agosto a setembro de 2009. Os agricultores foram agrupados entre fumantes e não fumantes e comparados com relação ao nível de cotinina no sangue. Verificou-se que os fumantes ( $n= 28$ ) apresentaram maiores níveis de cotinina quando comparado aos não fumantes ( $n= 43$ ) (student t-test  $p< 0,05$ ). Os fumantes apresentaram média de cotinina plasmática de  $151,9 \pm 64,1$  ng/mL, variando de 13,5 a 252,3ng/mL, enquanto que entre os não fumantes foi observada uma concentração plasmática média de  $29,2 \pm 46,7$  ng/mL, variando de 0,0 a 195,32ng/mL. No entanto, seis indivíduos não fumantes apresentaram valores de cotinina entre 50 e 200 ng/mL (figura 17).

Posteriormente, foi feita uma correlação entre os níveis de cotinina da população de agricultores e a atividade da enzima com o objetivo de verificar se a concentração de nicotina e/ou cotinina plasmática promove qualquer efeito sobre a atividade da AChE *in vivo*. Os resultados mostraram que elevados níveis de cotinina plasmático não têm qualquer efeito sobre a atividade da enzima, de modo que, indivíduos com concentração plasmática em torno de 100ng/mL apresentam atividade de AChE semelhante a indivíduos com concentração de cotinina abaixo de 15ng/mL. Assim, não há uma correlação significativa (correlação de Pearson) entre os níveis de cotinina e a atividade enzimática (figura 17).



**Figura 17 – Concentração plasmática de cotinina entre indivíduos fumantes e não fumantes.**

Fonte: Elaboração própria.



**Figura 18 – Correlação entre concentração plasmática de cotinina e atividade de AChE dos 72 agricultores no período de cultivo do tabaco.**

Fonte: Elaboração própria.

## ***Capítulo VII - Discussão***

Este estudo avaliou 72 agricultores que trabalham no cultivo do tabaco no município de Arapiraca, Estado de Alagoas, com relação à exposição ocupacional e ambiental a agrotóxicos e nicotina. Embora a vertente ocupacional tenha sido mais explorada no estudo, um risco de exposição ambiental foi considerado, pois a dispersão dos agrotóxicos ao longo dos diversos componentes do meio ambiente, como águas, ar, solo, oferecem riscos mesmo àqueles que não estão envolvidos diretamente com o processo de aplicação <sup>88</sup>.

O estudo apresenta algumas limitações, como a avaliação da exposição à nicotina pelo hábito de fumar e seu efeito sobre a AChE na ausência de exposição ocupacional pelo cultivo do tabaco, bem como na ausência de exposição a agrotóxicos. Para esta avaliação, haveria a necessidade da construção de um grupo controle com indivíduos fumantes não expostos a agrotóxicos, o que neste estudo não foi possível. Tal fato não nos possibilita fazer inferências adicionais sobre os efeitos da exposição à nicotina pelo tabagismo e seu efeito sobre a AChE, bem como não nos permite verificar o quanto a exposição ocupacional a nicotina no cultivo do tabaco pode contribuir para o aumento nos níveis de cotinina nos fumantes. Da mesma forma, não obtivemos dados sobre a exposição a agrotóxicos OP em indivíduos não expostos a nicotina. Para isso, seria necessário a utilização de um grupo de agricultores não fumantes expostos a agentes anticolinesterásicos, o que também não foi possível neste estudo. Assim, não foi possível verificar se a exposição à nicotina poderia, de alguma forma, contribuir para uma maior exposição a agrotóxicos. Da mesma forma como não foi possível avaliar se o fato de estar ocupacionalmente exposto a nicotina no cultivo do tabaco, contribuiria para a redução no consumo de cigarros.

O cultivo do tabaco é associado ao aparecimento de graves problemas de saúde entre fumicultores, de modo que estes trabalhadores possuem um maior risco de desenvolver alterações neurocomportamentais que podem evoluir para um quadro de depressão e suicídio. Geralmente, associam-se estes distúrbios à exposição aos agrotóxicos OPs utilizados no cultivo do tabaco. Porém, a prevalência de casos de depressão e suicídio é maior entre agricultores que cultivam o tabaco, comparado aos que trabalham em outros tipos de cultura utilizando o mesmo agrotóxico <sup>1; 14; 17; 89</sup>. Em Arapiraca, Silva 2007 encontrou taxas de suicídio de 16 suicídios /100.000 habitantes <sup>20</sup>.

A intoxicação por agrotóxicos OPs em fumicultores é, na maiorias das vezes, tratada como um evento isolado, cujos efeitos estariam a princípio relacionados somente ao agrotóxico. Porém, sabe-se que os agrotóxicos não são os únicos contaminantes

responsáveis por eventos de intoxicação entre fumicultores, os quais também estão sujeitos a intoxicação pela nicotina, proveniente do contato direto com a folha do tabaco 10; 11; 25

A maior parte dos agrotóxicos utilizados na cultura do tabaco, segundo Biolchi, 2003, estão classificados nas classes toxicológicas I e II (principalmente os inseticidas)<sup>90</sup>. Neste estudo, observou-se que praticamente metade dos agrotóxicos citados pelos agricultores pertenciam a classe II, ou seja, moderadamente tóxicos. Também se verificou a utilização de agrotóxicos de classe I A e IB, considerados extremamente tóxicos e altamente tóxicos, respectivamente. A utilização dessas classes de agrotóxicos pode explicar, em parte, o quadro sintomatológico relatado pelos agricultores, durante ou após aplicação. Sintomas como náusea, vômitos, dor de cabeça podem ser resultados da intoxicação por OPs e carbamatos<sup>91</sup>. Tais sintomas representam 54% dos de sintomas relatados pelos agricultores com relação a aplicação de agrotóxicos. Também importante ressaltar que muitos casos de intoxicação podem ser devidos à exposição a compostos da classe dos piretróides ou a outros agrotóxicos que não geram inibição na atividade das colinesterases.

Com relação à utilização de EPIs no processo de cultivo do tabaco, os agricultores relataram que, o fato de tais equipamentos serem termicamente desconfortáveis e terem custos elevados, seriam alguns dos principais motivos pelos quais os mesmos não seriam utilizados no processo de trabalho. Na agricultura brasileira, especialmente em pequenas comunidades rurais, é comum deparar-se com trabalhadores sem os equipamentos de proteção individual (EPIs) durante a manipulação e a aplicação de agrotóxicos. Veiga, 2007 e Monquero, 2009, também verificaram que uma das principais razões para não se utilizar EPIs está relacionada ao fato de que muitos dos EPIs utilizados na agricultura, devido a sua inadequação, podem provocar desconforto térmico, tornando-os bastante incômodos para uso, além de dificultar a respiração e a mobilidade<sup>92; 93</sup>. Por outro lado, deve-se considerar que a utilização de equipamentos de proteção não é uma consequência direta do conhecimento dos riscos associados ao manejo do agrotóxico, mas depende da maneira como, individual e coletivamente, os trabalhadores percebem o risco no uso destas substâncias. Segundo Fonseca e colaboradores 2007, é comum que os trabalhadores rurais não façam uma associação clara entre as condições de trabalho e a percepção dos riscos relacionados à suas atividades laborais. Assim, a comunicação dos riscos na utilização de agrotóxicos na lavoura buscando o esclarecimento e a conscientização em relação ao



risco de exposição contribui para tornar o risco mais real, fornecendo ao agricultor elementos para tomar uma melhor decisão com relação à utilização de EPIs no cultivo do tabaco <sup>94</sup>.

A avaliação do nível de escolaridade demonstrou que a maior parte dos agricultores não chegam a concluir o nível fundamental, e o baixo grau escolaridade observado poderia, em parte, contribuir para uma menor compreensão de instruções relacionadas à utilização dos produtos químicos. Por outro lado, as instruções contidas nos rótulos das embalagens de agrotóxicos não apresentam uma linguagem acessível à grande maioria dos agricultores, contendo um elevado teor técnico, dificultando a compreensão e criando uma série de barreiras à comunicação sobre o uso, os cuidados e os efeitos sobre a saúde e o ambiente <sup>95;96</sup>.

Também é comum que as informações sobre a utilização e os cuidados em relação ao uso dos agrotóxicos sejam fornecidas por técnicos e revendedores, e, quando estas se confrontam com a experiência empírica cotidiana dos agricultores, é comum que estes optem por suas próprias interpretações. Isto mostra uma necessidade de se avaliar a forma de transmitir a informação de modo a adequá-la a uma linguagem acessível aos agricultores, bem como, estudar estas populações no sentido de verificar como estas percebem e compreendem as informações contidas nos rótulos das embalagens de agrotóxicos, promovendo o conhecimento e capacitação desta população para o uso adequado dessas substâncias <sup>97</sup>.

Neste trabalho, a avaliação biológica da exposição aos agrotóxicos OPs e carbamatos foi realizada em dois períodos distintos. A primeira análise foi realizada no período de cultivo do tabaco (agosto e setembro de 2009), e uma segunda análise foi feita em um período de entre safra (maio e junho de 2010).

Para avaliação da exposição aos agrotóxicos anticolinesterásicos, a atividade da AChE eritrocitária foi utilizada como biomarcador, pois a inibição desta enzima reflete o grau de inibição da AChE presente nas sinapses nervosas, bem como a severidade da intoxicação <sup>51</sup>.

O grupo controle somente foi comparado aos agricultores com relação a atividade da enzima. Em nosso estudo, verificou-se que a média de idade dos agricultores foi superior a média de idade do grupo controle para ambos os sexos. Os participantes que integraram o grupo controle foram indivíduos voluntários (alunos e funcionários) recrutados na UFAL de Arapiraca, o que dificultou a seleção de indivíduos com idades superiores a 50 anos. A variação de faixa etária para o sexo

feminino foi de 20 a 47 anos e para o sexo masculino de 21 a 45. No grupo de agricultores, 73,6% dos indivíduos encontravam-se na faixa etária entre 18 e 50 anos e 26,4% tem idades superiores a 50 anos, o que eleva a média de idade dos agricultores.

Rumenejak, 1998 em um estudo sobre a distribuição da atividade da AChE eritrocitária em humanos verificou que não há diferença na atividade enzimática em relação à idade (0 e 70 anos) <sup>98</sup>. Esta estabilidade intra-individual da AChE eritrocitária em relação à idade foi confirmada por Lefkowitz, 2007, onde se verificou que a atividade da enzima é extremamente estável ao longo dos anos e muito pouca variação pode ser verificada mesmo após 20 anos <sup>99</sup>. Assim, embora esta relação entre a atividade da enzima e a faixa etária dos indivíduos não tenha sido realizada em nosso estudo devido a um N amostral reduzido, agricultores com idades superiores a 50 anos não foram excluídos na comparação da atividade da AChE entre o grupo em estudo e o grupo controle, exclusão esta que reduziria a amostra de 72 agricultores para 53 agricultores.

A análise da atividade da AChE dos agricultores no período de cultivo do tabaco sugere a possibilidade de exposição aos agrotóxicos anticolinesterásicos, pois se verificou que os agricultores apresentaram menor atividade enzimática quando comparados ao grupo controle.

Os valores de referência usualmente utilizados se constroem através da determinação das atividades destas enzimas em populações não expostas de onde seria obtida uma atividade média. Deste valor seria subtraído de 20 a 30% da atividade e então estabelecido o valor de referência limite para estas atividades, a partir deste limite, o indivíduo seria considerado excessivamente exposto <sup>100</sup>.

Idealmente, os valores de referência devem ser obtidos do próprio indivíduo antes da exposição, o que na maioria das vezes não é feito devido à dificuldade em recrutar o mesmo indivíduo em épocas distintas. Porém, nesta análise, mesmo não podendo garantir que no período entre safra os agricultores não estivessem expostos a estes agrotóxicos de alguma forma, também se buscou avaliar os indivíduos em dois momentos, supondo haver uma menor exposição neste período comparada ao período de cultivo. Desta forma, o agricultor foi utilizado como sua própria referência.

A análise da atividade da AChE destes agricultores no período de cultivo, comparada ao período entre safra, também sugere a possibilidade de exposição, pois neste último, verificou-se que os trabalhadores apresentaram atividades significativamente mais elevadas. Alguns indivíduos apresentaram redução superior a

20% na atividade enzimática no período de cultivo, comparado ao período entre safra. De acordo com Extension Toxicology Network, 1993 e Sosan, 2010, quando utilizamos o indivíduo como referência (duas coletas, uma em momento no qual o indivíduo não está manipulando agrotóxicos e outra quando esse indivíduo está fazendo uso desses agentes químicos), uma inibição enzimática entre 20 e 30% indica exposição a agrotóxicos OPs e carbamatos (inseticidas). Inibições superiores a 30% indicam intoxicação por esses agentes químicos, mesmo quando da ausência de sintomas visíveis / identificáveis <sup>101; 102</sup>.

Também foi observado que mesmo agricultores que relataram não aplicar agrotóxicos, mas moram dentro da área de cultivo ou desempenham outra atividade na lavoura como colheita e manipulação da folha do tabaco, apresentaram redução na atividade da AChE no período de cultivo comparada ao período entre safra. Segundo Hoshino e colaboradores 2008, a população rural exposta ao agrotóxico não se limita somente aos trabalhadores, mas também a sua família que vive praticamente dentro da plantação e à comunidade local, reforçando a necessidade de pesquisas para avaliar a exposição ambiental aos agrotóxicos e os riscos associado <sup>103</sup>.

A atividade enzimática dos agricultores no período entre safra mostrou uma tendência a ser mais elevada quando comparada ao grupo controle, porém não foi significativa. Esta elevação de atividade apresentada pelos agricultores no período entre safra pode ser explicado por um possível aumento na síntese da enzima BChE, o chamado "efeito rebote" da colinesterase plasmática. A BChE plasmática é uma enzima produzida pelo fígado e exportada para a corrente sanguínea em um *turnover* de 4 a 7 dias <sup>80</sup>. Porém a BChE possui afinidade pela acetilcolina, com uma velocidade de hidrólise 4 vezes menor em relação à velocidade de hidrólise da AChE para este mesmo substrato <sup>104</sup>. Em estudos realizados por Oliveira-Silva, 2000, 2001, nos quais aproximadamente 300 trabalhadores tiveram sua atividade colinesterásica monitorada durante um ano, observou-se que BChE, no intervalo de 11 a 20 dias, apresentava um comportamento atípico, caracterizado por um aumento médio de suas atividades em torno de 14%, sendo que em alguns casos atingia 42% da atividade basal, efeito este não observado na colinesterase das hemácias, a AChE <sup>80; 96</sup>. Este aumento tende a ocorrer quando indivíduos são expostos cronicamente a agentes anticolinesterásicos, pois, em exposições crônicas, com a diminuição das enzimas ativas, podemos supor a amplificação da síntese do sistema enzimático da BChE. Este efeito não é observado em exposições agudas, possivelmente pelo tipo de indução enzimática, que pode se

processar de duas formas: por amplificação da atividade do RNA mensageiro ou por aumento na síntese do RNA <sup>105</sup>.

No período entre safra, os fumicultores plantam outros tipos de cultura e utilizam os mesmos agrotóxicos utilizados no cultivo do fumo, porém em menor escala (informações verificadas em campo). Assim, pode-se considerar que, mesmo no período entre safra ocorra uma exposição crônica a agrotóxicos, contribuindo para um aumento da atividade da BChE refletindo na atividade da AChE na metodologia utilizada.

O método utilizado em nosso estudo emprega sulfato de quinidina, um inibidor de BChE, para determinação da atividade da AChE em amostras de sangue total. Porém não se pode garantir que esta inibição seja de 100%. Assim, estes agricultores podem apresentar um aumento na atividade da BChE, e esta, por possuir uma afinidade pelo substrato da AChE, pode contribuir para a hidrólise da acetilcolina, ocasionando indiretamente um leve aumento na atividade desta última, como foi verificado nos agricultores no período entre safra. Esta interferência é uma limitação da metodologia utilizada no estudo.

A avaliação da exposição à nicotina foi verificada pela concentração de cotinina em amostras de soro. A cotinina é o principal metabólito da nicotina e um específico marcador de exposição ao alcalóide, independente da via de exposição, de modo que pode ser utilizada na avaliação de exposição ocupacional ao tabaco como também no controle da abstinência ao tabagismo <sup>83; 106</sup>. Esta avaliação foi realizada durante o período de cultivo do tabaco, época em que há uma maior exposição ao alcalóide através do contato com a folha do tabaco durante o plantio, cultivo, colheita e cura do tabaco <sup>91</sup>.

A análise do nível de cotinina plasmática no grupo de agricultores demonstrou a exposição desses trabalhadores à nicotina, de modo que concentrações de 0 a 252,3 ng/mL de cotinina foram observadas. Neste estudo, a exposição dos agricultores a nicotina poderia ser proveniente de duas fontes de contaminação. Uma fonte de exposição à nicotina seria o hábito de fumar, verificado em 38,9% dos indivíduos, e outra fonte seria o contato com a folha do tabaco no processo de cultivo.

Segundo PNAD 2008, a proporção de fumantes no Brasil é de 23,9% da população. No Brasil rural, o percentual desses fumantes é de 20,4% (4,4 milhões de fumantes), enquanto os de residência urbana alcançam percentual de 16,6% (20,1 milhões de fumantes). Cerca de 90% dos fumantes tornam-se dependentes da nicotina entre os 5 e os 19 anos de idade. No Nordeste, os fumantes dependentes somam

31% da população, e os moradores da zona rural também fumam mais que os das zonas urbanas<sup>107</sup>

Segundo Schimitt, 2007, plantadores não-fumantes de tabaco mostram níveis de cotinina similares a fumantes ativos<sup>22</sup>. Em nosso estudo, observou-se que os indivíduos fumantes apresentaram níveis médios de cotinina mais elevados quando comparado aos não-fumantes. Nossos resultados mostraram que, embora os níveis médios de cotinina em fumantes tenham sido mais elevados, os não-fumantes apresentaram níveis de cotinina entre 0,0 a 195,32 ng/mL. Variação semelhante foi verificada para o grupo de fumantes, ou seja, de 13,5 a 252,30 ng/mL. Essa ampla variação nos níveis de cotinina entre os não-fumantes foi determinada por valores de cotinina entre 50 e 195 ng/mL apresentado por apenas seis agricultores. Benowitz, 2008 relatou que o valor de cotinina em soro, que distingue fumantes de não-fumantes é de 14 ng/mL e Park, 2010 encontrou uma variação de cotinina entre não-fumantes de 0.93 a 14.99 ng/ml<sup>106; 108</sup>. Assim, os elevados níveis de cotinina observados entre os agricultores não-fumantes neste estudo, associados à época do plantio do tabaco, podem estar relacionados a uma exposição à nicotina pelo contato com a folha do tabaco durante o processo de trabalho na lavoura, pois como foi mostrado em nossos resultados, 88% dos agricultores relataram ter contato direto com a folha do tabaco. Tal fato não exclui a possibilidade dos seis agricultores, declarados não fumantes, possuírem o hábito de fumar, pois como foi verificado, somente esses seis indivíduos, entre os não fumantes, apresentaram valores mais elevados em relação aos demais deste mesmo grupo.

Segundo Satora, 2009, o contato direto com a folha durante o plantio das mudas, colheita ou cura do tabaco, possibilita a absorção dérmica da nicotina levando a um quadro de intoxicação conhecido como doença da folha verde do tabaco ou “bebedeira do fumo”<sup>70</sup>. Nossos resultados mostram que os sintomas mais relatados pelos agricultores durante ou após o manuseio da folha foram dor de cabeça, náusea e vômitos, representando 57% do total de sintomas referidos, seguidos de tremores, vertigem, irritação na pele, diarreia, diminuição da visão e dor no peito. Segundo Arcury, 2001, McKnight, 2005 e Curwin, 2005, os sintomas referidos são característicos da “bebedeira do fumo”<sup>21; 109; 110</sup>.

Apesar dos critérios de diagnóstico da doença da folha verde não se encontrem estabelecidos, a sintomatologia também pode incluir prostração, dificuldades respiratórias, dores musculares e, ocasionalmente, variações de pressão sanguínea e batimentos cardíacos. A sintomatologia pode ocorrer entre três e dezessete horas após

exposição à nicotina e sua duração tende a variar de um a três dias. Ainda, a exposição dérmica crônica à nicotina pode ocasionar toxicidade ao sistema cardiovascular em fumicultores<sup>22; 111</sup>. A integridade da pele é outro fator que pode contribuir para aumentar a incidência e os riscos da doença, pois, lesões da pele como pruridos, cortes e ferimentos, podem facilitar a absorção da nicotina<sup>21</sup>.

Observou-se que sintomas como náusea, dor de cabeça, vômito, vertigem e irritação da pele foram significativamente mais prevalentes entre os não-fumantes. Também, verificou-se que os não fumantes relatam um número de sintomas significativamente maior comparados aos fumantes. Essa maior prevalência de sintomas entre os não fumantes é um indicativo de uma possível suscetibilidade a exposição à nicotina. Em fumantes, a exposição constante a baixas concentrações de nicotina causam inicialmente um dessensibilização dos receptores nicotínicos. Com a exposição prolongada ao alcalóide esses receptores passariam do estado dessensibilizado para o estado inativo, levando a uma maior tolerância à substância. Para restaurar a homeostase ocorreria então o aumento do número dos receptores, de modo que, o tecido cerebral humano de fumantes tem uma maior densidade de receptores nicotínicos comparados aos não fumantes<sup>112</sup>.

As exposições à nicotina e ao agrotóxico em culturas de tabaco podem ocorrer em um mesmo momento, e os efeitos dessas exposições podem manifestar-se em conjunto, tornando difícil a diferenciação da intoxicação por um ou outro agente.

Alguns estudos mostram que a nicotina pode ter um efeito inibidor sobre a atividade da AChE, e investigações sobre os níveis de nicotina capazes de promover este efeito *in vitro* tornam-se importantes na avaliação da exposição de agricultores que cultivam tabaco<sup>33; 34; 35</sup>. Assim, neste estudo, também foi verificado o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de nicotina sobre a atividade da AChE eritrocitária. Também, verificou-se se a nicotina seria capaz de ocasionar um efeito aditivo na inibição enzimática promovida por um agente anticolinesterásico, que em nosso caso foi o etilparaoxon.

O efeito *in vitro* da nicotina sobre a AChE foi analisado em amostras de sangue total e em amostras de membranas de hemácias. A contaminação de amostras de sangue total com solução de nicotina para posterior avaliação da atividade da AChE tende a reproduzir com mais proximidade a realidade da contaminação por exposição a nicotina, de modo que todos os componentes sanguíneos estão presentes na amostra, como enzimas séricas e proteínas plasmáticas. Por outro lado, a contaminação de membranas

de hemácias permite verificar o efeito da nicotina sem presença dos componentes plasmáticos na amostra.

Nossos resultados mostraram que o efeito inibidor *in vitro* da nicotina sobre a enzima só pôde ser observado em concentrações iguais ou superiores a 0,5mM. A contaminação do sangue total comparada à contaminação de membranas de eritrócitos mostra que, nestes ensaios, não houve interferência dos componentes plasmáticos com relação ao efeito da nicotina sobre a enzima, de modo que percentuais semelhantes de inibição foram observados para a concentração de 0,1mM tanto em sangue total como em membranas de eritrócitos.

Segundo Hukkanen, 2005, a concentração plasmática de nicotina em fumantes, varia de 10 a 50ng/mL. O aumento na concentração venosa de nicotina após fumar um único cigarro varia de 5 a 30 ng/ml e seus níveis declinam rapidamente, em torno de 20 minutos, devido à distribuição tecidual <sup>113</sup>.

Em nossos ensaios *in vitro*, foi observado que a nicotina somente exerce um efeito de inibição da atividade da AChE em concentrações muito superiores àquelas que podemos encontrar em um ser humano. Nesses ensaios, somente foram observadas inibições da enzima pela nicotina em concentrações de aproximadamente 80000ng/mL (0,5mM) e 160000ng/mL (1,0mM), com redução de 36,7% e 48,3% respectivamente.

Silva e Pereira, 2005 verificaram que fumantes que consumiam 20 cigarros por dia não apresentavam qualquer alteração na atividade da AChE eritrocitária <sup>114</sup>. Silva, 2006 somente verificou efeitos inibidores da nicotina sobre a enzima em sangue total em concentrações iguais ou superiores a 0,5mM. Em resultados demonstrados por Silva, 2006 observam-se inibições de 22% e 39% para concentrações de 0,5 e 1,0mM respectivamente <sup>35</sup>.

Os níveis de cotinina observados nos agricultores neste estudo mostram que as concentrações plasmáticas de nicotina nesses trabalhadores não atingem os níveis suficientes para promover um efeito inibidor na atividade da AChE, como os observados nos ensaios *in vitro*. Isto pode explicar a não correlação entre os níveis de cotinina e a atividade da AChE.

Também, o fato da nicotina não exercer efeitos sobre inibições promovidas por OPs *in vitro*, podem estar relacionados às concentrações de nicotina utilizadas nos ensaios. Assim, acredita-se que, pelas concentrações de cotinina observada nos agricultores, os níveis de nicotina não exerçam efeitos inibitórios sobre a AChE, mesmo

nos casos de exposições simultâneas à nicotina e agrotóxicos com ação anticolinesterásica.



## ***Capítulo VIII - Conclusão e Perspectivas***

Neste estudo verificou-se que no processo de cultivo do tabaco no município de Arapiraca, agricultores estão ocupacionalmente expostos a agrotóxicos com ação anticolinesterásica como os OP e carbamatos. As reduções nas atividades da AChE verificadas no período entre safra em comparação com o período de cultivo do tabaco, mostram que neste último os agricultores estão mais expostos a agrotóxicos com ação anticolinesterásica.

As reduções na atividade enzimática de pessoas que não aplicam agrotóxicos, porém residem próximo às áreas de cultivo, mostram também a ocorrência de exposição ambiental a esses agentes.

A exposição à nicotina entre os agricultores ocorre, tanto pelo hábito do tabagismo como pela contaminação no processo do cultivo do tabaco. Agricultores não fumantes que manipulam a folha do tabaco têm níveis sanguíneos de nicotina semelhantes a indivíduos fumantes quando se utiliza o valor de corte descrito na literatura (14 ng/mL) para discriminar fumantes de não fumantes.

Em nossas condições experimentais, a nicotina apresentou efeito inibidor sobre a atividade da AChE eritrocitária, mas somente em concentrações consideradas elevadas. Em concentrações menores avaliadas *in vitro* e que podem ser encontrados em humanos após o consumo de cigarros ou por exposições ocupacionais verificadas nos agricultores, a nicotina não demonstrou efeito inibidor sobre a atividade da enzima.

A ausência de correlação entre a atividade da AChE e os níveis de cotinina plasmático encontrado nos agricultores também mostra que a nicotina não exerceu efeito inibidor sobre a AChE *in vivo*.

A nicotina não promoveu efeitos de inibição aditivos nas inibições enzimáticas por OP nas condições utilizadas em nossos ensaios.

Estudos posteriores são necessários com o objetivo de se construir um valor de referência para AChE na população de Arapiraca, a fim de realizar o monitoramento da exposição a agentes anticolinesterásicos em fumicultores. Isto contribuirá para fazer um diagnóstico diferencial entre a intoxicação por agrotóxicos e a contaminação pela nicotina, pois a sintomatologia da exposição a agrotóxicos sem redução da atividade enzimática sugere a contaminação por nicotina, ou seja, a doença da folha verde ou “bebedeira do fumo”.

O estudo não contemplou a avaliação da exposição a outras classes de agrotóxicos, como os piretróides por exemplo. Assim, estudos sobre a exposição a

diferentes classes de agrotóxicos no cultivo do tabaco são necessários para um maior entendimento dos riscos de exposição a agrotóxicos neste tipo de cultura.

Estudos distintos sobre a percepção de risco dos agricultores sobre a doença da folha verde e sobre a exposição a agrotóxicos podem contribuir para melhor entendimento da problemática da exposição ocupacional a agrotóxicos e nicotina no cultivo do tabaco. A partir deste entendimento, melhores informações sobre os riscos de contaminação podem ser passados aos agricultores, de modo que os mesmos possam ter conhecimento dos reais efeitos tóxicos das substâncias com as quais lidam em sua atividade laboral.

## ***Capítulo IX - Bibliografia***

- 1 – Campaign For Tobacco Free Kids. 2001. Golden leaf barren harvest: the costs of tobacco farming. Washington DC, November. Nov. 2001. 42 p. Ilus, Tab.
- 2 – DESER (Departamento de Estudos Sócio-Econômicos Rurais). 2003 a. A Cadeia produtiva do Fumo. Contexto Rural /DESER, Ano III, nº 4, dezembro.
- 3 – FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2003 – Projections of tobacco production, consumption and trade to the year 2010 - Rome 2003.
- 4 – FAOSTAT (Food And Agriculture Organization Of The United NATIONS). Disponível em: <http://faostat.fao.org> ; UNCTAD (2005).
- 5 – DESER (Departamento de Estudos Sócio-Econômicos Rurais). 2009. A fumicultura e a convecção-quadro desafios para a diversificação.
- 6 - Almeida GEG. 2005. Fumo: Servidão Moderna e Violação de Direitos Humanos. Terra de Direitos. Curitiba. p.168.
- 7 - NARDI, JB. Produção e Indústria do fumo no Nordeste. Diagnóstico 2007. Palestra. Brasília: Câmara Setorial do Fumo, 21-22 de novembro de 2007.
- 8 - DESER (Departamento de Estudos Sócio-Econômicos Rurais). 2005. A Cadeia produtiva do Fumo. Contexto Rural /DESER, Ano V, nº 5, julho.
- 9 - SEPLAN (Secretaria Executiva de Planejamento e Orçamento). Disponível em <http://www.planejamento.al.gov.br/dados-estatisticos/estatisticas/anuario-estatistico/2004/agregadosm.pdf>, acessado em 14/10/2010.
- 10 - Hadlich G, Monteiro M, Muller ME, Maykot R. 1997. Caracterização do meio rural de Sombrio. In: SCHEIBE, L. F.; PELLERIN, J. Qualidade ambiental de municípios de Santa Catarina: o município de Sombrio. Florianópolis: Fepema, 1997. cap. 5, p. 61-93.

11 - Guivant J. 1994. Percepção dos olericultores da Grande Florianópolis sobre os riscos decorrentes do uso de agrotóxicos. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 22 (82): 47-57.

12 - Guivant J. 1992. O uso de agrotóxicos e os problemas de sua legitimação: Um estudo de sociologia ambiental no município de Santo Amaro da Imperatriz, SC. 1992. Tese (Doutorado) – Departamento de Sociologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

13 - Guivant J. 2000. Reflexividade na sociedade de risco: os agrotóxicos nos alimentos. In: HERCULANO, S. (Org.) *Qualidade de vida e riscos ambientais*. Niterói: Editora da UFF, 2000.

14 - ILO/WHO (International Labour Organization / World Health Organization). 2009 Joint Press Release ILO/WHO: Number of Work related Accidents and Illnesses Continues to Increase - ILO and WHO Join in Call for Prevention Strategies. Disponível em: <http://www.ilo.org/public/english/bureau/inf/pr/2005/21.htm>. Acessado em 04/12/2009

15 - Falk JW, Carvalho LA, Silva LR, Pinheiro S. 1996. Suicídio e doença mental em Venâncio Aires – RS: Conseqüência do Uso de Agrotóxicos. Relatório preliminar de pesquisa.

16 - Etges BI. 2000. Pequenas Agroindústrias Familiares de Conservas e Compotas: estudo de casos. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade de Santa Cruz do Sul. Santa Cruz do Sul, RS.

17 - Fialho RR. 2000. Os sentidos produzidos pelos agricultores e agricultoras familiares da cultura do fumo em relação ao trabalho. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade de Santa Cruz do Sul. Santa Cruz do Sul, RS.

18 - Moreira JC, Jacob SC, Peres F. 2002. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. *Ciência e Saúde Coletiva*, v.7, n.2, p. 299-311.

19 - Cordeiro A, Marochi F, Tardin JM. 1998. A Poison Crop – Tobacco in Brazil. *Global Pesticide Campaigner*. 8(2):1-7.

20 - Silva ALO, Meyer A, Moreira JC, Chrisman J. 2007. Paraoxonase, pesticides exposure and suicide index in tobacco plantations in Brazil: an important factor? *REVISA*. 3 (1/2/3): 261-268.

21 - Arcury TA, Quandt SA, Preisser JS. 2001. Predictors of incidence and prevalence of Green tobacco sickness among Latino farmworkers in North Carolina, USA. *J Epidemiol Community Health* 2001. 55:818–824.

22 - Schmitt NM, Schmitt J, Kouimintzis DJ, and Kirch W. 2007. Health risks in tobacco farm workers – a review of the literature. *J Public Health*.15:255–264.

23 - Costa LG, Cole TB, Vitalone A, Furlong CE. 2005. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Cilinal Chimica Acta* 352: 37-47.

24 - Trapé ÂZ, Botega NJ. 2006. Inquérito de morbidade auto-referida e exposição a agrotóxicos. In. Etges, Virginia.

25 - Moschandreas DJ, Karuchit S. 2002. Scenario model parameter: a new method of cumulative risk uncertainty analysis *Environment International*. 28:247– 261.

26 - Salvi RM, Lara DR, Ghisolfi ES, Portela LV, Dias RD, Souza DO. 2003. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicological sciences*, 73:267—271.

27 - Jamal G, Hansen S, Pilkington A, Buchanan D, Gillham R, Abdel-Azis M, Julu P, Al-Rawas S, Hurley F, Ballantyne J. 2002. A clinical, neurological, neurophysiological, and neuropsychological study of sheep farmers and dippers exposed to organophosphate pesticides. *Occupational and environmental medicine*. 59: 434—441.

- 28 - DESER (Departamento de Estudos Sócio-Eocnômicos Rurais). 2003b. Fumo - Análise da safra 2002-2003 e Perspectivas para 2003 – 2004. Boletim do Deser. Conjuntura Agrícola. No. 134, dezembro.
- 29 - Blecher B. 1996. Suicídios apavoram as cidades do fumo. Folha de São Paulo 1996 Nov 29; Sec. A:10.
- 30 - Girardi G. 2002 A Última Colheita. Galileu 133: p. 24-31.
- 31- Portal Extensão UFAL. Disponível em <http://portaldeextensao.wikidot.com/a-cultura-do-fumo-em-arapiraca>. acessado em 26/01/2010.
- 32 - Chang PL, Bhagat B, Taylor JJ. 1973. Effect of chronic administration of nicotine on acetylcholinesterase activity in the hypothalamus and medulla oblongata of the rat brain. An ultrastructural study. Brain Res. 17;54:75-84.
- 33 - José AS, Silva FO, Dalcin TM, Santos ER, Pereira ME. 2003. In vitro effect of nicotine on total cholinesterase activity from human blood. Revista Brasileira de Toxicologia, 16: 202.
- 34 - Figueiró M. 2005. Sensibilidade da enzima acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7) à nicotina in vitro e ex vivo. 100 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
- 35 - Silva VBM. 2006. Parâmetros hematológicos e toxicológicos em amostras de sangue de doadores fumantes e efeito da nicotina in vitro. Dissertação de Mestrado Programa de pós-graduação em bioquímica Toxicológica; Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, RS, Brasil.
- 36 - ECOBICHON, D. J. 1996. Toxic effects of pesticides. In: KLASSEN, C. D. Casarett & Doull's. Toxicology: the basic science of poisons. New York: McGraw-Hill p. 643-689.



37 – OPAS (Organización Panamericana de la Salud). 2004. Vigilancia sanitaria de plaguicidas: experiencia de Plagsalud en Centroamérica. Washington D.C: Organización Panamericana de la Salud.

38 - Abiquim (Associação Brasileira da Indústria Química). 2007. A Nova Política de Substâncias Químicas da União Européia, REACH. Disponível em [http://www.abiquim.org.br/reach/inf\\_gerais.pdf](http://www.abiquim.org.br/reach/inf_gerais.pdf) , acessado em 16/01/2011.

39 - WHO/UNEP (World Health Organization/ United Nations Environment Programme). 1990. Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture, WHO, Geneva.

40 - Larini L. 1999. Toxicologia dos praguicidas. São Paulo: Manole, 1999.

41 - Oliveira-Silva JJ. 2003. Avaliação da exposição humana a agrotóxicos. In: PERES, F.; COSTA, J. É veneno ou é remédio? - Agrotóxicos Saúde e Ambiente. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz.

42 - Antle JM, Pingali PL. 1994. Pesticides, Productivity, and Farmer Health: A Philippine Case Study. *American Agricultural Economics Association*. 76: 418-430.

43- Zalom FG, Toscano NC, Byrne FJ. 2005. Manejo da resistência é fundamental para uso futuro de piretróides e neonicotinóides. *California Agricultures*. 15. 1-5.

44 - Maroni M, Fanetti AC, Metruccio F. 2006. A avaliação de riscos e gestão da exposição ocupacional a agrotóxicos na agricultura. *Lav Med*. 97 (2): 430-7.

45 - Anwar WA. 1997. Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environmental Health Perspectives*, v. 105 (Suppl. 4).

46 – WHO (World Health Organization ) 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009. Disponível em [http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard\\_2009.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf). acessado em 10/01/2010.

- 47 - Hogstedt, C. Pesticides. 1994. In: Occupational health in developing countries. Oxford : Ed. Jeyaratnam J. - Oxford University Press, 1992, p. 237-254.
- 48 - Klaassen CD. 2001. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 6th edition, 2001): Editor; McGraw-Hill Professional.
- 49 - Santos VMR, Donnici CL, Da Costa JBN, Caixeiro JMR. 2007. Compostos OPs pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Quim. Nova.* 30 (1): 159-170.
- 50 - Misra UK, Kalita J. 2009. Toxic neuropathies Indian Perspective. 57 (6): 697 – 705.
- 51 - Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH. 2008. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet.* 371: 597–607.
- 52 - Voicu VA, Thiermann H, Radulescu F S, Mircioiu C, Miron D S. 2009. The Toxicokinetics and Toxicodynamics of Organophosphonates versus the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oxime Antidotes: Biological Consequences Journal Compilation. Nordic Pharmacological Society. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 106: 73–85.
- 53 - Silva P. 1998. *Farmacologia.* Rio de Janeiro: 5ª edição. Guanabara & Koogan 1314p.
- 54 - Gotti C, Clementi F. 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 74: 363-396.
- 55 - Soreq H, Seidman S. 2001. Acetylcholinesterase – news roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.* 2: 294-302.

- 56 - Tinsley MR, Quinn JJ, Fanselow MS. 2004. The role of muscarinic and nicotinic cholinergic neurotransmission in aversive conditioning: comparing pavlovian fear conditioning and inhibitory avoidance. *Learn Mem.* (11): 35-42.
- 57 - Francischi JN, Castro MS, Lopes MT, Maia RM. 2005. *A farmacologia em nossa vida.* Belo Horizonte: Editora UFMG. p. 83-86.
- 58 - Sarter M, Parikh V. 2005. Choline Transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 6: 49-56.
- 59 - Dani AJ, De Biasi M. 2001. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem and Behav.* 70: 439-446.
- 60 - Mc Kay BE, Placzek AN, Dani JA. 2007. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol.* 74 (8): 1120-1133.
- 61 - Houston T. 2002. Tobacco: A cultural history of how an exotic plant seduced civilization. Ed. *Medscape General Medicine.* 4 (2): 403p.
- 62 - Musk AW, De Klerk NH. 2003 History of tobacco and health. *Respirology.* 8 (3): 286-290.
- 63 - Rosemberg J. 2009. *Pandemia do tabagismo enfoques históricos e atuais.* Secretaria de saúde do Estado de São Paulo, São Paulo.
- 64 - Heckerling G. 2009. Artigos de Gregório Heckerling. Disponível em: <http://www.amigosdocachimbo.com.br/artigos/08mar2009>.
- 65 - Catassi A, Servent D, Paleari L, Cesario A, Russo P. 2008. Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: implications on lung carcinogenesis. *Mutat Res.* 659 (3):221-31.

66 - Baselt RC. 2002 - Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, sixth ed., Biochemical Publications. Foster City. pp. 744–748.

67 - Planeta CS, Cruz, FC. 2005. Bases neurofisiológicas da dependência do tabaco” Rev. Psiqu. Clin. 32 (5): 251-258.

68 - Dajas-Bailador F, Wonnacott S. 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. Trends Pharmacol. Sci. 25 (6): 317-324.

69 - Zevin S, Gourlay SG, Benowitz NL. 1998. Clinical pharmacology of nicotine. Clin. Dermatol. 16. 557-564.

70 - Satora L, Goszcz H, Gomółka E, Biedroń W. 2009. Green tobacco sickness in Poland. Pol Arch Med Wewn. 119 (3):184-186.

71 - McBride JS, Altman DG, Klein M, White W, Green tobacco sickness. 1998. Tob Control Autumn.7 (3):294-298.

72 - Amorim LCA. 2003. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment . Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 6, supl. 1.

73 - Rüdiger HW. 1999. Biomonitoring in occupational medicine. In: Marquart H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F (eds.). Toxicology. San Diego: Academic Press; 1999.

74 - Peres F. 2003. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. Editora FIOCRUZ. 384p

75 - Lauwerys R.R. 1993. Industrial Chemical Exposure – Guidelines for Biological Monitoring. 2<sup>a</sup> ed. London: Lewis Publishers.

76 - WHO (World Health Organization). Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace. Volumes 1 e 2. Geneva; 1996

77 - Oliveira Silva JJ, Castro HA, Trambellini A. 2002. Busca de novos biomarcadores inflamatórios. In Congresso Brasileiro de Epidemiologia. 5. Curitiba. Anais.

78- Silva JM, Silva EN, Faria HP, Pinheiro TMM. 2005. Pesticides and work : a dangerous combination for the Brazilian agricultural worker's health. *Ciência e Saúde coletiva* 10. (4): 891-903.

79 - Taylor P. 1991. The cholinesterases. *J. Biol. Chem.* 266 (7): 4025-4028.

80 - Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Inácio AF. 2000. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. *Human & Experimental Toxicology.* 19: 173-177.

81 – Suarez RLV, Galvan CF, Fernandez CO, Martinez ED, Guerrero FB. 2001. Tabaquismo en adolescentes, valores de cotinina en saliva y enfermedad respiratória. *An Esp Pediatr.* 54: 114-119.

82 - Hatsukami DK, Hecht SS, Hennrikus DJ, Joseph A M, Pentel PR. 2003. Biomarkers of tobacco exposure or harm: Application to clinical and epidemiological studies *Nicotine & Tobacco Research.* 5: 387–396.

83 - Mello PRB, Okay TS, Dores EFGC, Botelho C. 2005. Avaliação de um sistema de exposição tabágica passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição. *Pulmão RJ.* 14 (3): 228-236.

84 – Weerd S, Thomas CM, Kuster JE, Cikot RJ, Steegers EA. 2002. Variation of serum and urine cotinine in passive and active somoking and applicability in preconceptional smoking cessation counseling. *Environmental Research Section A* 90. 119-124.

85 - Magnotti RA, Dowling KJ, Eberly P, McConnell RS. 1988. Field measurement of plasma and erythrocyte cholinesterases. *Clinica Chimica Acta.* 176, Issue 3, 15. 315-332.

86 – Cunha JB, Lima JS, Faria MVC. 1991. Brain acetylcholinesterase as an in vitro detector of organophosphorus and carbamate insecticides in water. *Wat. Res.* 25 (7): 835-840.

87 - Dhar P. 2004. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35: 155–168.

88 - Moreira J C, Jacob S C, Peres F, Lima J S, Meyer A, Oliveira-Silva J J, Sarcinelli P N, Batista D F, Egler M, Faria M V C, Araújo A J, Kubota A H, Soares M O, Alves S R, Moura C M. Curi R. 2002. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ *Ciência & Saúde Coletiva.* 7 (2): 299-311.

89 - Etges VE, Ferreira M, CAMARGO ME. 2002. O Impacto da Cultura do Tabaco no Ecosistema e na Saúde Humana na Região de Santa Cruz do Sul/RS. – Relatório preliminar.

90 – Biolchi MA, Bonato AA, Oliveira MA. 2003. A cadeia produtiva do fumo. *Contexto Rural.* 3 (4): 5-55.

91 - Arcury TA, Vallejos QM, Schulz MR, Feldman SR, Fleischer AB Jr, Verma A, Quandt SA. 2008. Green tobacco sickness and skin integrity among migrant latino farmworkers. *American Journal of Industrial Medicine* 51: 195–203.

92 – Veiga MM, Duarte FJCM, Meirelles LA, Garrigou A, Baldi I. 2007. A contaminação por agrotóxicos e os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs). *Rev. Bras. Saúde Ocup.* São Paulo, 32 (116): 57-68.

93 - Monquero PA, Inácio EM, Silva AC. 2009. Levantamento de agrotóxicos e utilização de equipamento de proteção individual entre os agricultores da região de araras. *Arq. Inst. Biol. São Paulo.* 76 (1): 135-139.

- 94 - Fonseca M G U, Peres F, Firmo J O A, Uchôa E. 2007. Percepção de risco: maneiras de pensar e agir no manejo de agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*. 12(1): 39-50.
- 95 - Soares WL, Freitas EAV, Coutinho JAG. 2005. Trabalho rural e saúde: intoxicações por agrotóxicos no município de Teresópolis – RJ. *Rev. Econ. Sociol. Rural* vol.43 no.4 2005
- 96 - Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Meyer A, Peres F, Matos RCO, Sarcinelli PN. 2001. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Revista Saúde Pública*. 35 (2): 130-135.
97. Recena M C P, Caldas E D. 2008. Percepção de risco, atitudes e práticas no uso de agrotóxicos entre agricultores de Culturama, MS *Rev. Saúde Pública* 42 (2) São Paulo.
- 98 - Rumenjak V. 1998. Distribution of human erythrocyte acetylcholinesterase according to age, sex and pregnancy. *Acta Med Croatica*. 52(3): 187-189.
- 99 - Lefkowitz LJ, Kupina JM., Hirth NL, Henry RM., Yoland G, Barbee JY, Zhou JY, Weese CB. 2007. Intraindividual Stability of Human Erythrocyte Cholinesterase Activity *Biochemical Pharmacology*, *Vcml*. 54. 743-753.
- 100 - Peres F, Oliveira-Silva JJ, Della-Rosa HV, Lucca SR. 2005. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva* Print version ISSN 1413-8123. vol.10 suppl.0.
- 101 - EXTTOXNET (Extension Toxicology Network)-Oregon State University). 1993. **Exttoxnet Extension Toxicology Network - toxicology information briefs** cholinesterase inhibition - <http://exttoxnet.orst.edu/tibs/cholines.htm>. acessado em 03/01/2011.

102 - Sosan MB, Akingbohunge AE, Durosinmi MA, Ojo IA. 2010. Erythrocyte cholinesterase enzyme activity and hemoglobin values in cacao farmers of southwestern Nigeria as related to insecticide exposure. *Arch Environ Occup Health*. 65 (1): 27-33.

103 Hoshino A C H, Ferreira H P, Taguchi C K, Tomita S, Miranda M F. 2008. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados *Rev Bras Otorrinolaringol*. 74(6): 912-8.

104 - Rang HP, Dale MM. 1993. *Farmacologia*, 2a edição. Ed. Guanabara Koogan S. A.

105 - Lehninger, AL, Cox N, Nelson KY. 2002. *Princípios de Bioquímica*. 3ª Edição. Editora: Sarvier (Almed).

106 - Benowitz NL, Bernert JT, Caraballo RS, Holiday DB, Wang J. 2008. Optimal serum cotinine levels for distinguishing cigarette smokers and nonsmokers within different racial/ethnic groups in the United States between 1999 and 2004. *American Journal of Epidemiology*. 169. (2): 236-248.

107 - PNAD (Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios) - Tabagismo : 2008 / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. – Rio de Janeiro : IBGE, 2009. 140 p.

108 - Park S, Lee DH, Park JG, Lee YT, Chung J. 2010. A sensitive enzyme immunoassay for measuring cotinine in passive smokers. *Clinica Chimica Acta*. 411. 1238–1242.

109 - McKnight RH, Spiller HA. 2005. Green tobacco sickness in children and adolescents. *Public Health Rep*. 120: 602-606.

110 - Curwin BD, Hein MJ, Sanderson WT. 2005. Nicotine exposure and decontamination on tobacco harvesters' hands. *Ann Occup Hyg*. 49: 407-413.



111 - Arcury TA, Quandt SA, Preisser JS, Bernert JT, Norton D, Wang J. 2003. High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farmworkers. *Nicotine & Tobacco Research* 5. 315–321.

112 - Crooks PA, Dwoskin LP. 1997. Contribution of CNS Nicotine Metabolites to the Neuropharmacological Effects of Nicotine and Tobacco Smoking *Biochem Pharmacol.* 54 (7): 743-53.

113 - Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL. 2005. Metabolism and disposition kinetics of nicotine *pharmacol rev* 57:79 –115.

114 - Silva VBM, Pereira ME. 2005. Hematologics and toxicologics parameters in blood of smoker donators. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 37. 97–101.

## *X – Anexos*

**Anexo I - Questionário**

**Módulo I**

**LEVANTAMENTO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL E AMBIENTAL A  
AGROTÓXICOS**

1-Identificação: \_\_\_\_\_ 2-Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

3-Nome: \_\_\_\_\_

4-Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ 5-Idade: \_\_\_\_\_

6-Sexo:  1-feminino  2-masculino

7-Endereço:

\_\_\_\_\_

8-Localidade:  Arapiraca  outra: \_\_\_\_\_

9-Telefone para contato: \_\_\_\_\_

10-Raça/Etnia:

1-branco  2-negro  3-mestiço  4-asiático  5-índio

11-Nível de escolaridade:

1-analfabeto  2-primário incompleto  3-primário completo

4-ginásio incompleto  5-ginásio completo

6-2º grau incompleto  7-2º grau completo

12-Relação de trabalho:

1-proprietário  2-empregado  3-meeiro  4-ajuda a família  5-ocupante

6-administrador  7-parceiro c/ ônus dos insumos  8-parceiro s/ ônus

9-parceiro c/ ônus parcial dos insumos  10-outros \_\_\_\_\_

13-Renda familiar: \_\_\_\_\_

14-Anos de trabalho: \_\_\_\_\_ anos

15-Idade que começou a trabalhar: \_\_\_\_\_ anos

17-Quantas pessoas vivem na sua casa? \_\_\_\_\_

19-Quantas pessoas da sua família trabalham na agricultura? \_\_\_\_\_

20-Alguém da família trabalha com agrotóxicos?

1-sim                       2-não                       3-não sabe

21- Quantas pessoas? \_\_\_\_\_

22-Você aplica agrotóxicos?

1-sim                       2-não

23-Quantas horas por dia você trabalha? \_\_\_\_\_

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

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

1-direto (manipula a mistura e aplica na lavoura)                       2-direto (puxa a mangueira)

3-indireto (a lavoura é no mesmo terreno da casa)                       4-indireto (lava o costal)

5-indireto (lava as vestimentas usadas na aplicação de agrotóxicos)  6-  
outros: \_\_\_\_\_

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

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

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

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

1-milho       2-feijão       3-tomate       4-outros: \_\_\_\_\_

41-Você consome os alimentos que planta?

1-sim       2-não

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

1-sim       2-não

43-Como foi o treinamento?

1-palestra       2-explicação no local de trabalho       3-outros \_\_\_\_\_

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

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

57-Conhece o receituário agrônômico?

1-sim       2-não

58-Utiliza o receituário agrônômico?

1-sim       2-não

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

- 1-sim                       2-não

60-Com que frequência ocorre este treinamento?

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

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

- 1-não recebeu       2-cooperativa       3-proprietário       4-administrador  
 5-EMATER

6-representante do fabric. de agrotóxico

7-outros: \_\_\_\_\_

62- Quem indica o agrotóxico?

1-proprietário               2-representante de indústria               3-vendedor               4-  
EMATER

5-outro agricultor       6-administrador               7-outros:

\_\_\_\_\_

63-De quem você compra o agrotóxico?

1-representante de indústria               2-vendedor               3-estabelecimento  
comercial

4-outros: \_\_\_\_\_

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

1-freqüentemente       2-às vezes       3-nunca

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

1-freqüentemente       2-às vezes       3-nunca

66-Quem recomenda o cálculo da dosagem do agrotóxico?

1-fabricante (rótulo)     2-representante de indústria     3-vendedor     4-EMATER

5-outro agricultor     6-o próprio (dosagem aleatória)     7-outros:

\_\_\_\_\_

67-Qual o lugar onde são armazenados os agrotóxicos?

1-residência     2-local só para agrotóxicos     3-local com outros materiais

4-lavoura     5-outro: \_\_\_\_\_

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

1-freqüentemente     2-às vezes     3-nunca

69-Você joga fora as embalagens dos agrotóxicos?

1-sim     2-não     3-não sabe

70-Qual o destino das embalagens de agrotóxicos vazias?

1-vende     2-queima     3-guarda     4-lavoura     5-depósito público  
 6-enterra

7-sistema de coleta de embalagem     8-reutiliza     9-corpos d'água     10-outro: \_\_\_\_\_

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

1-sim     2-não

71a-Se sim, para que? \_\_\_\_\_

72-Sua pele entra em contato com o agrotóxico?

1-sim     2-não

73-Com que freqüência? \_\_\_\_\_



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

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

75-Onde são lavados os equipamentos mecânicos?

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

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

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

77a-Qual? \_\_\_\_\_

78-Por que não utiliza os equipamentos?

- 1-são desconfortáveis       2-dificultam a locomoção       3-são quentes
- 4-dificultam o trabalho       5-são pesados       6-têm custo elevado
- 7-outros: \_\_\_\_\_

79-Se utiliza, onde lava os equipamentos?

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

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

n°	EPI	sempre	quando aplica	quando puxa mangueira
80	máscara de papel			
81	máscara de pano			
82	respirador			
83	luvas			
84	botas			
85	óculos			
86	avental			
87	macacão			
88	outros _____			

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

n°	VESTIMENTA	SIM	NÃO
89	descalço		
90	chinelo		
91	sapato fechado		
92	sem camisa		
93	camisa de manga curta		
94	bermuda		

95	calçacomprida		
96	outros		

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

\_\_\_\_\_

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

1-freqüentemente                       2-às vezes                       3-nunca

100-Você lava suas mãos após o trabalho?

1-freqüentemente                       2-às vezes                       3-nunca

101-Você toma banho logo após aplicar o agrotóxico?

1-freqüentemente                       2-às vezes                       3-nunca

102-Costuma beber durante a aplicação de agrotóxico?

1-freqüentemente                       2-às vezes                       3-nunca

103-Costuma comer durante a aplicação de agrotóxico?

1-freqüentemente                       2-às vezes                       3-nunca

104-Você toma bebidas alcoólicas?

1-sim                                       2-não

105-Com que freqüência você toma bebidas alcoólicas?

1-4 ou mais vezes por semana       2-até 3 vezes por semana

3-pelo menos 1 vez por mês           4- menos de 1 vez por mês

5-não sabe

106-Que tipo de bebidas alcoólicas você costuma beber?

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

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

- 1-freqüentemente       2-às vezes       3-nunca

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

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

\_\_\_\_\_

- 4-outros: \_\_\_\_\_

109-Como estão distribuídas as janelas na sua casa?

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

110- Quantas janelas da sua casa estão de frente pra lavoura? \_\_\_\_\_  99-não tem  
janela de frente pra lavoura

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

- 1-sim       2-não

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

- 1-sim       2- não       3-não sabe

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

- 1-sim       2- não       3-não lembra

114-Já foi intoxicado por agrotóxico?

- 1-sim       2- não       3-não sabe

115-Quantas vezes? \_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

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

- 1-náuseas       2-dor de cabeça       3-vômitos       4-vertigens       5-  
diminuição da visão



128-Está tomando algum medicamento atualmente?

1-sim                     2- não                     3-não sabe

129-Qual (is)? \_\_\_\_\_

130-Para que? \_\_\_\_\_

Nº	Substância	Nº de aplicações / semana	Horas gastas em cada aplicação	Época da última aplicação	Períodos de utilização
Exemplo	TAMARON	2	6	3/4/00	1x/mês
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Para o entrevistador lembrar os nomes:

Inseticidas/organofosforados: folidol, tamaron, nuvacron

Inseticidas/carbamatos: carbaril, furadam

Inseticidas/organoclorados: aldrin, lindano

Fungicidas: maneb, dithane

Herbicidas: paraquat (gramaxone), round-up

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

## Módulo II

### LEVANTAMENTO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL E AMBIENTAL A NICOTINA

131 - Há quanto tempo trabalha em cultura de tabaco? \_\_\_\_\_

132 - Quantos dias por semana você trabalha na cultura de tabaco? \_\_\_\_\_

133 - Quantas horas por dia você trabalha? \_\_\_\_\_

134 - Já interrompeu o trabalho com o tabaco? \_\_\_\_\_

135 - Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

136 - A folha do tabaco entra em contato com a sua pele? \_\_\_\_\_

137 - Com que frequência? \_\_\_\_\_

138 - Há quanto tempo foi o último contato que você teve com a folha do tabaco?  
\_\_\_\_\_ (colocar dias, meses, anos,...)

Você é fumante?

1-sim       2-não

139-Quantos cigarros fuma, em média, por dia? \_\_\_\_\_

140 - Você fuma enquanto manipula a folha do fumo?

1-sim       2-não

141 - Você tem o hábito de “mascar fumo”?

1-sim       2-não

142 - Em caso afirmativo quantas vezes por dia? \_\_\_\_\_

143 - Você já se sentiu mal durante a colheita do fumo? \_\_\_\_\_

144 - Quais os sintomas e/ou sinais que sentiu?

1-náuseas     2-dor de cabeça     3-vômitos     4-vertigens     5-  
diminuição da visão

6-diarrréia     7-dores no peito     8-tremores     9-irritação da pele     10-  
outros: \_\_\_\_\_

145 - Você usa luvas durante a colheita do fumo?

1-sim       2-não       3-não manipula a folha

146 - Você lava as suas mãos após manipular a folha do fumo? \_\_\_\_\_



## Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“Análise Integrada do Uso de Agrotóxicos na Região Nordeste”**, um projeto coordenado pela Fundação Oswaldo Cruz. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar desta pesquisa, sem qualquer prejuízo.

Este estudo tem como um dos principais objetivos conhecer o que os trabalhadores e a população em geral pensam sobre o uso de agrotóxicos na agricultura em seu município.

Sua participação nesta etapa da pesquisa consistirá em: a) responder às perguntas feitas durante a aplicação de um questionário, que leva em torno de 25 minutos para ser preenchido; e b) fornecer amostras de sangue para análise de uma possível exposição a agrotóxicos e à nicotina. O sangue será coletado com tubos de vidro com agulhas descartáveis, num total de 20 ml (aproximadamente duas colheres de sopa) em cada coleta. Um ligeiro desconforto acontecerá na coleta de sangue (semelhante à picada de um inseto), com pequena ardência no lugar onde este foi coletado. As amostras biológicas (sangue) serão utilizadas exclusivamente para as análises do projeto, sendo descartadas após o término das análises.

O benefício relacionado com a sua participação é contribuir para a melhoria das informações sobre os efeitos dos agrotóxicos na saúde e no meio ambiente. Não haverá nenhuma compensação financeira / pagamento pelo fornecimento destas informações.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação:

Josino Costa Moreira  
Pesquisador  
CESTEH / ENSP / Fiocruz  
R. Leopoldo Bulhões 1480  
Manguinhos, Rio de Janeiro / RJ  
Tel. (21) 3885-1625

Comitê de Ética em Pesquisa da Ensp  
R. Leopoldo Bulhões 1480 – sala 314  
Manguinhos, Rio de Janeiro / RJ  
Tel. (21) 2598-2863

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

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Assinatura