

EFEITOS GENOTÓXICOS DOS PESTICIDAS

GENOTOXIC EFFECTS OF PESTICIDES

Carla Costa¹ e João Paulo Teixeira¹

RESUMO

Em oposição a todos os benefícios que a utilização de pesticidas pode trazer à agricultura com o aumento da produção das colheitas, estas substâncias apresentam propriedades adversas se forem incorrectamente utilizadas. Estes compostos interferem em mecanismos comuns a muitas espécies (incluindo a humana), o que leva a que vários organismos expostos a pesticidas apresentem os efeitos de intoxicações agudas e crónicas. Os pesticidas são compostos genotóxicos capazes de induzir dano directo (danificando directamente as bases) e indirecto no ADN (através da produção de radicais livres). Tradicionalmente, o dano genético tem vindo a ser estudado recorrendo ao teste de aberrações cromossómicas. No entanto, nas últimas décadas têm sido desenvolvidas novas técnicas que contribuiram para o conhecimento do potencial destes compostos de induzir danos no ADN Neste artigo serão apresentados os dados mais recentes e relevantes acerca deste tema, apresentando de forma integrada os resultados dos biomarcadores de exposição, efeito e susceptibilidade

Palavras-chave: Biomonitorização, genotoxicidade, pesticida.

ABSTRACT

In addition to all the benefits pesticide usage can bring to crop production and nor-

mal daylife, these compounds also present several harmful properties if not correctly used. Their non-specific action increases the possibility of all living organisms (including man) exposed to pesticides undergo severe acute or chronic poisonings. Pesticides are recognized genotoxic compounds that can induce direct damage (damaging directly the bases that constitute the DNA molecule) and indirect damage in DNA (with the production of free radicals). Traditionally, genetic damage was observed by means of chromosomal aberrations. However in the more recent decades new and improved techniques were developed and proved to be useful in understanding the potential of these compounds to induce DNA damage Herein, it will be presented the more recent and relevant data on this matter joining together results of different type of biomarkers: exposure, effect and susceptibility.

Keywords: Biomonitoring, genotoxicity, pesticide.

INTRODUÇÃO

A persistência no ambiente e o facto da grande maioria dos pesticidas serem pouco específicos e tóxicos para os processos biológicos comuns a muitas espécies (apenas alguns são específicos para os processos metabólicos da espécie que devem eliminar) pode levar ao aparecimento de uma série de efeitos indesejados no ambiente e na saúde humana decorrentes da sua utilização (Keifer, 2000).

A população humana pode estar exposta a estes compostos de diferentes formas: enve-

¹ Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Rua Alexandre Herculano, 321, 4000-055 Porto, cstcosta@gmail.com

nenamentos acidentais ou tentativas de suicídio, exposição ocupacional e exposição associada à ingestão de produtos edíveis (água e alimentos). As populações mais expostas a estas substâncias são reconhecidamente aquelas que lidam diariamente com elas na sua actividade profissional (na produção ou na preparação e aplicação destes compostos) já que isto implica uma exposição frequente a estes compostos.

As intoxicações agudas são provavelmente um dos efeitos mais conhecidos dos pesticidas: a Organização Mundial de Saúde estima que por ano ocorram 1 a 5 milhões de casos de envenenamento por pesticidas (muitos dos quais poderão ser voluntários) (WHO, 1990). Por outro lado, surgem evidências de outros efeitos na saúde humana, tais como doenças dermatológicas, neurológicas, reprodutivas, dano genético e até o aumento da incidência de cancro (Sanborn, 2004). Estes efeitos são normalmente observados em agricultores que constituem uma população continuamente exposta a estes compostos, embora a níveis mais baixos.

Só com este conhecimento podem surgir estratégias que mediante selecção, análise e aplicação sejam capazes de reduzir os riscos decorrentes da exposição.

PESTICIDAS

Os pesticidas (também designados produtos fitofarmacêuticos) incluem uma grande variedade de substâncias activas muito diferentes na sua composição e nas suas propriedades. Estes compostos podem ser naturais ou sintéticos e são utilizados para prevenir, destruir ou repelir qualquer organismo inimigo das culturas (Cecchine *et al.*, 2000). Designam-se também por pesticidas, os produtos que condicionam a produção vegetal, denominados, reguladores de crescimento. Estes compostos são largamente utilizados na agricultura para protecção das culturas e também em saúde pública para controlar a transmissão de doenças por vectores e hospedeiros intermédios.

Nas últimas décadas, a agricultura tradicional aderiu ao sistema de monocultura que favorece o aparecimento de pragas, doenças e infestantes. Este problema leva muitas vezes à utilização abusiva e inapropriada de pesticidas. Em Portugal, foi registada em 2005 uma diminuição de 3,5% no volume de vendas destes compostos relativamente ao ano anterior (Vieira, 2006). Ainda assim, Portugal continua a ser um dos países da União Europeia em que estas substâncias são mais utilizadas (3.74Kg/ha e 2.10Kg/ha, respectivamente).

Toxicocinética dos pesticidas

A toxicocinética dos xenobióticos (compostos químicos estranhos ao organismo) inclui a absorção, distribuição, armazenamento, biotransformação e eliminação (Hughes, 1996).

A absorção depende das propriedades físico-químicas do agente tóxico, da dose, duração e via de exposição. A pele, o tracto respiratório e tracto gastrointestinal constituem as principais vias de exposição e absorção. Alguns autores sugerem que a pele é a principal via de entrada dos pesticidas (Aragon, 2005). Ainda assim, a via respiratória não deve ser ignorada quando o individuo está exposto a compostos com alta pressão de vapor ou realiza as suas actividades em ambiente confinado. O tracto gastrointestinal é importante se estiver em causa a ingestão de água ou alimentos contaminados, além dos casos de ingestão voluntária (suicídios) ou involuntária (homicídios).

Uma vez na corrente sanguínea, o tracto do composto depende não só das suas propriedades químicas mas também da concentração desse mesmo composto no sangue e nos tecidos (NRC, 2004).

Os organismos dispõem de enzimas capazes de metabolizar alguns xenobióticos participando activamente na destoxificação destes compostos. A inexistência de processos enzimáticos capazes de transformar os anéis aromáticos e remover os átomos de cloro dos organoclorados leva a que a metabolização

destes pesticidas seja extremamente lenta. Além disto, estes compostos são lipofílicos pelo que se acumulam no tecido adiposo onde permanecem estáveis até que pequenas quantidades sejam excretadas e as concentrações no sangue sejam compensadas.

A biotransformação dos compostos organofosforados inclui um grande número de reacções metabólicas que envolvem o sistema do citocromo P450. A dessulfuração dos ésteres dos organofosforados resulta na formação da configuração *oxão*, o que acarreta um aumento significativo da toxicidade do composto, uma vez que esta forma é responsável pela inibição da acetilcolinesterase. Na fase II de metabolização ocorrem reacções de glucuronidação e sulfonação dos ésteres previamente hidrolisados. Os carbamatos são metabolizados de forma semelhante.

Alguma evidência científica sugere que os piretróides são rapidamente detoxificados através da actividade de hidrolases e monooxigenases (Ecobichon, 2001). A exposição múltipla a pesticidas pode modificar as vias de metabolização e potenciar os efeitos dos compostos.

Embora os pesticidas possam ser eliminados do corpo pelas fezes, ar exalado, leite materno, suor e saliva, a urina é a mais importante via de excreção quer dos compostos iniciais quer dos seus metabolitos (Stacey, 2004).

Dano Genético

A duração de cada uma das fases que incluem o mecanismo de toxicocinética determina o tempo que os compostos têm para exercer o seu efeito e para possivelmente danificar o tecido alvo: toxicodinâmica (mecanismo de interacção entre os agentes químicos ou os seus produtos com o organismo) (Hughes, 1996). Para além de danificar os órgãos alvo, os pesticidas podem interagir com moléculas fundamentais, tais como o ADN, ARN e proteínas.

Os agentes químicos podem danificar as células através de diferentes mecanismos. Com base nestes mecanismos, os compos-

tos podem ser classificados de mutagénicos, genotóxicos ou citotóxicos (não são mutuamente exclusivos). Mutagenicidade encerra alterações estruturais de um gene que podem ser mutações pontuais (alterações nas bases da molécula de ADN, duplicações, inserções, inversões e translocações) ou deleções.

Mesmo sem exposição a agentes químicos, as alterações da molécula de ADN são eventos frequentes pelo que as células dispõem de diversos mecanismos de reparação capazes de restaurar a molécula à sua estrutura inicial. O mecanismo de excisão de bases, excisão de nucleótidos, reparação de quebras duplas e a reparação mismatch constituem os processos básicos de reparação do ADN. As fases fundamentais dos sistemas de reparação incluem o reconhecimento, excisão do dano, síntese de ADN e ligação. Em último caso, e se não for possível reparar o dano, as células podem iniciar o processo de apoptose (Preston e Hoffman, 2001).

O potencial genotóxico de um composto é um dos mais importantes factores de risco para o aparecimento de efeitos a longo prazo como cancro ou efeitos a nível reprodutivo. São compostos genotóxicos aqueles que directamente ou indirectamente são capazes de danificar o ADN nuclear. A probabilidade deste dano genético originar um efeito real na saúde do indivíduo depende da natureza do dano, da capacidade da célula para reparar ou amplificar esse dano, da oportunidade que a célula pode ter ou não de expressar essa alteração e ainda da capacidade do organismo de reconhecer e suprimir a multiplicação de células aberrantes (Silbergeld, 2001).

Dependendo das células afectadas podem surgir diferentes efeitos. Uma alteração genética numa célula somática pode culminar, por exemplo, no aparecimento de cancro e envelhecimento prematuro. Alterações em células germinativas afectam, apenas, indivíduos da geração seguinte.

O processo carcinogénico é composto por diversas etapas: a exposição a um carcinogénico, iniciação (alteração genética numa célula que será a célula inicial), promoção (resulta na formação de uma pré-neoplasia),

conversão e progressão (activação de proto-oncogenes e inativação do supressor tumoral p53) (Links *et al.*, 1995). Alterações em alguns destes genes críticos podem provocar uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de processos carcinogénicos. Há também substâncias naturais ou sintéticas como os anti-oxidantes e processos de reparação do ADN que desempenham uma função protectora no organismo.

Muitos pesticidas já foram testados relativamente ao seu potencial mutagénico, concretamente a testes de mutações genéticas e alterações cromossomais. Os dados experimentais revelaram que muitos destes compostos possuem propriedades mutagénicas (Sanborn *et al.*, 2004). Assim, diferentes organizações, como a Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC – International Agency for Cancer Research) e a Agência de Protecção Ambiental Norte Americana (US EPA – United States Environmental Protection Agency) já classificaram muitos compostos activos de produtos fitofarmacêuticos de carcinogénicos e/ou mutagénicos para os humanos (IARC, 1991).

Vários estudos (Jaga e Dharmani, 2005) apresentam uma associação entre a exposição a pesticidas e o aparecimento de tumores, especialmente quando estes estudos dizem respeito à exposição ocupacional. Estes resultados corroboram a necessidade da redução da utilização de pesticidas principalmente na agricultura e outras actividades profissionais (Sanborn *et al.*, 2004).

Monitorização biológica e testes citogenéticos

Os estudos clássicos de monitorização humana consistem na monitorização ambiental em que são recolhidas amostras de ar para posterior identificação e quantificação de compostos tóxicos, permitindo conhecer o nível de poluente no ar inalado.

Por outro lado, na monitorização biológica, a própria substância química, os seus metabolitos ou outros parâmetros bioquímicos susceptíveis de se alterarem por acção

do tóxico são analisados em fluidos ou tecidos corporais. O seu doseamento permite conhecer a exposição do indivíduo ao agente tóxico, sendo designados por indicadores biológicos.

Os indicadores biológicos são habitualmente diferenciados em três grupos: indicadores de exposição (indicam a existência de exposição a um dado agente; podem tratar-se de quantificações directas dos agentes tóxicos ou dos seus metabolitos nos fluidos corporais ou excreções), indicadores de efeito (dizem respeito a parâmetros biológicos, medidos no organismo, que reflectem a interacção da substância química com os receptores biológicos) e indicadores de susceptibilidade (variações genéticas responsáveis por modificações na susceptibilidade dos indivíduos a compostos tóxicos).

A monitorização biológica apresenta vantagens óbvias relativamente à monitorização ambiental, já que considera todas as vias de entrada possíveis no organismo. Por outro lado, prevê variações individuais no que diz respeito à absorção, ao metabolismo, à excreção e à distribuição do agente xenobiótico (Van Delft *et al.*, 1998).

Permite ainda identificar e até certo ponto quantificar, o risco de exposição a factores ambientais e tem sido por isto, uma ferramenta de grande interesse na avaliação da exposição a carcinogénicos (Bonassi e Au, 2002).

O estudo de diversos indicadores biológicos contribui simultaneamente não só para o conhecimento da extensão do efeito do xenobiótico no organismo como também para a selecção adequada do biomarcador que deve ser utilizado para uma monitorização eficiente da exposição humana a agentes químicos.

Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo consiste na observação de células em interfase onde são detectados micronúcleos resultantes de danos genéticos induzidos por agentes citotóxicos. Os micronúcleos surgem nas células quando durante a anafase algum cromosso-

ma ou fragmento acêntrico de cromossoma sofre um atraso enquanto os fragmentos com centrômero se dirigem para os pólos – na origem dos micronúcleos, podem estar portanto, agentes aneugênicos ou clastogênicos. Estes fragmentos não são incluídos nos núcleos das células filhas originando assim a formação de um micronúcleo, sendo este morfológicamente igual ao núcleo principal mas de tamanho inferior o que justifica a sua designação (Fenech, 2000).

Aberrações cromossômicas

As aberrações cromossômicas são alterações na estrutura ou número dos cromossomas que podem ocorrer espontaneamente ou como resultado de tratamento/radiação química. Estas alterações que incluem cromossomas dicêntricos, GAPS, quebras de cromátídeos, anéis e figuras tetrarradiais são observadas em células em metafase (Farmer e Emeny, 2006). Alguns estudos evidenciam que as aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico são preditivas de cancro.

Troca entre cromátídeos irmãos

As trocas entre cromátídeos irmãos são induzidas por mutagêneos e/ou carcinogêneos e, por isso, este é um teste útil para monitorizar a exposição a este tipo de compostos. As trocas são observadas em preparações com cromossomas em metafase. As trocas entre cromátídeos irmãos são translocações recíprocas entre as duas cadeias de ADN e julga-se que na sua origem estão erros ocorridos durante o processo de replicação do ADN de uma cromátídeo já danificada (Farmer e Emeny, 2006). Este processo de permuta é considerado indicador de ocorrência de possíveis lesões e reparação da molécula de ADN, pois quanto maior o número de lesões, maior a possibilidade de erro na ligação posterior das cadeias. Este ensaio deve, contudo, ser considerado apenas indicativo, uma vez que a troca entre cromátídeos irmãos não resulta necessariamente numa mutação (Silva *et al.*, 2003).

Teste do Cometa

Uma outra técnica que permite detectar danos no ADN resultantes da exposição a genotóxicos é o teste do Cometa. Trata-se de uma técnica rápida, simples e sensível. Sincintamente, consiste na lise de células que foram previamente colocadas em agarose numa lâmina. Na versão alcalina do método a electroforese é realizada a pH alcalino (> 13) o que permite a detecção de quebras simples e lesões alcali-lábeis no ADN de células individuais. Como a maioria dos agentes genotóxicos induz estes dois tipos de danos com maior frequência do que quebras duplas, esta técnica possibilita uma maior sensibilidade na detecção dos danos no ADN das células (Tice, 1995).

Após electroforese, neutralização e coloração, as lâminas são observadas ao microscópio de fluorescência e as células com danos no seu ADN apresentam a forma de cometas com núcleos intensamente brilhantes e caudas. O comprimento da cauda e a intensidade do brilho dependem da quantidade de dano. As células que apresentam apenas uma cabeça brilhante sem cauda representam células com ADN não danificado (Faust *et al.*, 2004).

PESTICIDAS E DANO GENÉTICO

Tanto a comunidade científica como a população em geral têm vindo a mostrar a sua preocupação em relação aos possíveis efeitos negativos da utilização de pesticidas. Os alimentos, água e ar contaminados constituem as principais fontes de exposição de pesticidas para o público em geral. Mais ainda, a contaminação pode ser superior em áreas tratadas com estas substâncias (sejam áreas agrícolas ou edifícios).

A exposição ocupacional a pesticidas inclui o processo de produção bem como a sua utilização corrente no controlo de pestes (seja na agricultura ou noutras situações). Devido aos níveis e à frequência de exposição, os indivíduos ocupacionalmente expostos a estas

substâncias constituem um grupo de risco. Por esta razão, esta é a população adequada para estudar e observar todos os potenciais efeitos dos pesticidas na saúde humana.

Os estudos desenvolvidos nos últimos anos em populações expostas tentaram identificar os factores que influenciam o dano genético e qual o indicador biológico mais útil na biomonitorização humana a pesticidas.

Embora tenham sido reportadas conclusões contraditórias, a maior parte dos estudos encontra diferenças ao nível do dano genético entre populações expostas a pesticidas e populações controlo. Por exemplo, Bolognesi *et al.* (2002) observou diferenças significativas na frequência de micronúcleos, (Kaioumova e Khabutdinova, 1998) na frequência de aberrações cromossómicas e Garaj-Vrhovac (2002) nos parâmetros do teste do cometa. Estas alterações permitem concluir que a exposição a pesticidas pode de facto interferir na saúde humana sendo capaz de induzir alterações ao nível celular.

A razão pela qual vão sendo obtidos resultados contraditórios em estudos independentes não está completamente esclarecida. Alguns autores acreditam que os factores de exposição estão na base destas diferenças enquanto outros sugerem que a exposição a pesticidas pode induzir uma resposta adaptativa (Pastor *et al.*, 2002b). Esta resposta poderá envolver um aumento do evento de apoptose ou atraso na divisão nuclear de forma a permitir a reparação do ADN danificado (Kirsh-Volders e Fenech, 2001). Qualquer um destes fenómenos resulta numa observação de falsos negativos em testes citogenéticos.

Factores técnicos, variação interlaboratorial, interindividual e intraindividual ao longo do tempo, características demográficas, hábitos tabágicos e dieta são todas variáveis importantes nos níveis de dano genético observados quer em populações controlo, quer em populações expostas (Fenech, 1998). Outros factores (relacionados com a exposição a pesticidas) afectam o dano observado apenas nas populações expostas. Estes incluem as condições ambientais, a utilização de equipamento de protecção individual, as tarefas realizadas e

o conhecimento dos riscos associados a cada uma das tarefas entre outros factores.

Para além disto, as diferenças observadas entre populações controlo e populações expostas podem ainda estar relacionadas com o desenho do estudo, nomeadamente com as características das populações. Em estudos caso-controlo é normal que os dois subgrupos (população controlo e exposta) residam na mesma área geográfica. No entanto, no caso do estudo dos efeitos dos pesticidas esta metodologia pode apresentar desvantagens: os pesticidas são compostos, na sua maioria, persistentes com potencial para afectar os diferentes ecossistemas na área de estudo (Fishes *et al.*, 1991).

Assim, pelo facto destes compostos afectarem não só as populações ocupacionalmente expostas mas também potencialmente as que vivem na mesma região, os resultados obtidos poderão levar a conclusões inexactas relativamente ao potencial genotóxico destes compostos (Sanborn *et al.*, 2004). Joksic *et al.* (1997) observaram frequências significativamente mais elevadas de micronúcleos em indivíduos controlo de uma área de vinicultura relativamente a um segundo grupo controlo de uma área mais afastada em períodos de pós-tratamento de pesticidas.

Variação intra-individual

Grande parte dos estudos reporta resultados a uma amostra individual colhida uma única vez. No caso do estudo dos efeitos dos pesticidas, esta pode ser uma questão relevante uma vez que a frequência com que os agricultores lidam com estes compostos varia ao longo do ano. Alguns autores (Joksic *et al.*, 1997; Garaj-Vrhovac e Zeljezic, 2001; Zeljezic e Garaj-Vrhovac, 2001; Pastor *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2006) colheram amostras em diferentes épocas de trabalho (fase de pré-tratamento e de pós-tratamento em indivíduos que aplicavam pesticidas; no caso de indivíduos que trabalhavam na produção de pesticidas foram colhidas amostras oito meses depois da exposição e depois de oito meses de não-exposição) e todos obtiveram

níveis de dano mais elevados, em alguns casos significativos, nos testes de micronúcleo, aberrações cromossômicas e Comet assay nos períodos de maior exposição.

Variação inter-individual

A variação inter-individual pode ser devida a características individuais tais como polimorfismos genéticos. Outros factores como os níveis hormonais, peso e gordura corporal também podem ter repercussões nos níveis de ADN observado.

Há vários anos que tem sido descrita uma tendência para os trabalhadores exibirem taxas de morte mais baixas do que a população em geral. Isto tem sido designado como a síndrome do trabalhador saudável. As variações inter-individuais tais como os polimorfismos são provavelmente a melhor explicação para este efeito. Au *et al.* (1999) obteve resultados muito interessantes depois de comparar as frequências dos polimorfismos genéticos de agricultores e de indivíduos controlo. As formas desfavoráveis das enzimas CYP2E1, GSTM1, GSTT1 e PON1 apresentavam frequências abaixo do esperado entre os agricultores. Os autores sugeriram que indivíduos com as formas genéticas desfavoráveis poderão mudar de emprego assim que possível dada a sua susceptibilidade aos efeitos dos pesticidas. No entanto, estudos que incluam um maior número de indivíduos são obrigatórios para poder tirar conclusões acerca desta questão.

A influência dos polimorfismos genéticos nos níveis de dano genético dos indivíduos expostos a pesticidas não está totalmente esclarecida. De facto, alguns estudos nesta matéria mostram que serão importantes não só os polimorfismos das enzimas associadas ao metabolismo dos pesticidas como também das enzimas envolvidas no processo de reparação do ADN.

Características demográficas

Fenech (1998) descreveu um aumento significativo das frequências de micronúcleo

os em indivíduos saudáveis, não fumadores com a idade. O aumento da instabilidade cromossômica com a idade é um fenómeno na literatura (Bolognesi *et al.*, 1999). A diminuição da capacidade de reparação do ADN e o aumento de espécies reactivas de oxigénio estão na base desta instabilidade cromossômica. Este aumento observado em termos de dano genético pode ser detectado não só através do teste do micronúcleo mas também noutros biomarcadores, por exemplo, através do teste do cometa (Ramsey *et al.*, 1995).

No caso do teste do micronúcleo, o sexo dos indivíduos é outra das variáveis que pode influenciar significativamente o dano genético observado. Diferentes autores mostraram que o aumento do número de micronúcleos com a idade se deve a um fenómeno consistente de perda dos cromossomas sexuais (Norppa e M-Falck, 2003). Bonassi *et al.* (1995) estudou a influência do sexo numa população constituída por 2131 indivíduos e constatou que a frequência de micronúcleos era 20-30% superior nas mulheres quando comparadas com as frequências nos homens.

Hábitos tabágicos

Os hábitos tabágicos são outra das variáveis que pode ser responsável pela alteração dos níveis de dano genético observados nos indivíduos. Os cigarros apresentam na sua composição uma diversidade de compostos químicos, alguns dos quais classificados como carcinogêneos com capacidade de alterar a estrutura do ADN.

Um estudo de revisão acerca do dano genético causado pelo consumo de tabaco mostra um aumento de dano genético em fumadores (embora não significativo) (Hoffmann *et al.*, 2005). O potencial genotóxico foi confirmado em diversos estudos (Calvert *et al.*, 1998; El-Khatib e Hammam, 2003; Bhalli *et al.*, 2006). Vários autores preferem excluir esta variável dos seus estudos (quer controlos quer expostos) sendo as populações compostas apenas por indivíduos não-fumadores (Joksic *et al.*, 1997; Davies *et al.*,

1998; Munnia *et al.*, 1999; Gómez-Arroyo *et al.*, 2000; Piperakis *et al.*, 2003).

Produtos químicos utilizados

A utilização abusiva de pesticidas pode ter sérias consequências na saúde pública associadas à ingestão de edíveis contaminados.

Habitualmente, nas suas actividades, os agricultores estão expostos a um grande número de compostos muito diferentes na sua composição, facto observável na maior parte dos estudos desenvolvidos nesta matéria; a exposição ocupacional a apenas um composto não é comum na agricultura.

Os pesticidas, além da substância activa, apresentam na sua composição outros compostos. Estes podem ser inertes ou adjuvantes; alguns são também tóxicos para os humanos e portanto devem ser incluídos na análise de risco (Cecchine *et al.*, 2000).

No contexto ocupacional é importante considerar todas as substâncias a que os trabalhadores estão expostos diariamente. Nesta perspectiva, pode dizer-se que os estudos *in vivo* são bastante mais úteis na identificação dos efeitos destas substâncias do que os estudos *in vitro* que habitualmente consideram unicamente a substância activa.

Além dos produtos químicos incluídos na formulação comercial dos pesticidas, a sua forma (pós molháveis, líquido ou pó) poderá também influenciar significativamente os níveis de exposição, uma vez que umas serão mais rapidamente absorvidas do que outras,

Alguns autores tentaram estabelecer uma relação entre os compostos utilizados, o número de tratamentos efectuados por ano e a área tratada com os níveis de dano genético observado, mas os resultados foram inconsistentes. Enquanto alguns não obtiveram uma associação entre estas variáveis e o dano citogenético, outros observaram uma associação (Lebailly *et al.*, 1998; Garry *et al.*, 2001; Shaham *et al.*, 2001; Bolognesi *et al.*, 2004).

Bolognesi *et al.* (2004) observaram frequências mais elevadas de micronúcleos associados à utilização mais frequente de pesticidas e ao uso de compostos de maior

toxicidade. Pastor *et al.* (2001) encontraram ligeira associação entre as frequências deste mesmo biomarcador e o número de horas de trabalho.

Práticas de trabalho

Outros factores, além da toxicidade dos compostos, podem influenciar o risco de exposição. Os modelos de avaliação de risco geralmente consideram factores como a altura da cultura e a sua densidade, as tarefas desempenhadas pelos indivíduos, as técnicas de aplicação, o ambiente de trabalho e até a formação dos trabalhadores.

Neste tipo de estudos de dano genético associados à exposição de determinados compostos, é difícil estabelecer esta ligação uma vez que as populações estudadas incluem um número relativamente baixo de indivíduos perdendo-se todo o significado estatístico se estas populações forem adicionalmente subdivididas de acordo com todas estas variáveis.

A aplicação de pesticidas acima do nível da cabeça favorece a exposição e absorção dérmica e respiratória (Carbonell *et al.*, 1995). Simultaneamente, culturas densas facilitam o contacto dérmico e portanto a absorção dos compostos.

O tempo dedicado a cada uma das diferentes tarefas associadas ao trabalho agrícola, tais como, preparação, aplicação e manutenção da cultura podem também influenciar a exposição. A aplicação é considerada a actividade de maior risco, seguida de manutenção e preparação.

Se as aplicações são efectuadas manualmente ou em tractor, além do tipo de maquinaria utilizada, podem também constituir importantes indicadores de exposição. Os atomizadores produzem partículas de diâmetro inferior favorecendo a inalação. Os sistemas mais seguros de aplicação são aqueles controlados por computador que diminuem significativamente a exposição humana a estes compostos.

O ambiente de trabalho é outro factor muito importante a considerar no risco as-

sociado à exposição a pesticidas. Dois estudos independentes (Bolognesi *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2006) encontraram danos significativamente mais levados em trabalhadores de estufas, comparados com os que desenvolvem as suas actividades ao ar livre; as estufas são locais fechados, geralmente com valores de temperatura e humidade mais elevados, o que favorece a inalação de pesticidas.

Por último, a formação dos trabalhadores deverá também ser considerada. Aplicadores com conhecimentos adequados dos riscos associados à exposição a pesticidas poderão apresentar práticas de trabalho ajustadas diminuindo os riscos associados (Weinger e Lyons, 1992).

Utilização de equipamento de protecção individual

Dependendo dos compostos utilizados, todas as vias de exposição poderão ser importantes. No contexto ocupacional, a pele é a principal via de exposição a pesticidas (Aragon, 2005).

Nestas situações, a exposição pode diminuir significativamente através da utilização de equipamento de protecção individual. A caracterização das tarefas é essencial na identificação do equipamento de protecção individual mais adequado na protecção do trabalhador. Por exemplo, as luvas são muito importantes, se a aplicação for efectuada a baixa pressão, enquanto noutras situações (aplicação a altas pressões ou de compostos em pó) a utilização de máscara adequada poderá ser mais relevante. Idealmente, os trabalhadores deveriam utilizar todo o equipamento de protecção individual disponível para minimizar a exposição.

Alguns estudos (Shaham *et al.*, 2001; Bolognesi *et al.*, 2002; Ündegör e Basaran, 2002; Bolognesi *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006) observaram frequências de dano mais elevadas em trabalhadores que afirmavam não utilizar equipamento de protecção individual durante as suas actividades laborais.

Tempo de exposição

Certos autores acreditam que os efeitos genotóxico dos pesticidas subsistem ao longo do tempo e portanto os efeitos observados são cumulativos (Carbonell *et al.*, 1993).

Alguns estudos mostram, de facto, um aumento no dano genético de trabalhadores com histórias mais longas de exposição a estes compostos (Joksic *et al.*, 1997; Antonucci e Cólus, 2000; Padmavathi *et al.*, 2000; Shaham *et al.*, 2001; Bolognesi *et al.*, 2002; El-Khatib e Hammam, 2003; Grover *et al.*, 2003; Bolognesi *et al.*, 2004; Bhalli *et al.*, 2006; Sailaja *et al.*, 2006).

Ao mesmo tempo, os dados obtidos por Garaj-Vrhovac *et al.* (2001) indicam que após um período de oito meses sem exposição a pesticidas o dano era significativamente mais baixo. Carbonell *et al.*, 1995 mostraram que um período de seis meses é suficiente para reduzir os níveis de aberrações cromossómicas para os níveis de controlo.

CONCLUSÕES

Os pesticidas continuam a constituir o recurso mais eficaz para a eliminação de espécies indesejadas e para a garantia da obtenção de lucros numa actividade que tem vindo a passar por algumas dificuldades nas últimas décadas (diminuição da área agrícola e o aumento do número de catástrofes naturais que limitam a taxa de produção).

Os dados apresentados neste artigo mostram alguns dos possíveis efeitos da exposição a pesticidas. Além de outros efeitos na saúde humana, os pesticidas são capazes de danificar o ADN e, possivelmente, desencadear o desenvolvimento de cancro. As condições em que ocorre a exposição são determinantes no risco observado e devem ser devidamente examinadas de forma a controlar a exposição.

Para compreender os efeitos destes compostos no genoma bem como as consequências desta interacção torna-se necessário estabelecer desenhos de estudo que permitam a comparação de resultados obtidos em dife-

rentes condições de trabalho. No entanto, a questão da exposição múltipla observada na maior parte dos casos é de facto um factor de confundimento difícil de eliminar.

A publicação dos diversos estudos acerca desta matéria possibilita a identificação das variáveis de exposição relevantes que, por sua vez, permitem o desenvolvimento de modelos de análise de risco adequados. Estes modelos após validação permitiriam a intervenção em situações em fases iniciais de risco, prevenindo os efeitos associados à exposição a pesticidas.

Simultaneamente, o aumento da produção e utilização destas substâncias em países em desenvolvimento, a falta de enquadramento legal, o elevado número destes compostos presentes no mercado e a ausência de formação dos agricultores obrigam à introdução de medidas adequadas de gestão destes produtos, de forma a diminuir o risco associado, não só para o ambiente mas também para a saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonucci, G. e Cólus, I. (2000) - Chromosomal aberrations analysis in a brazilian population exposed to pesticides. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 20, 265-272.

Aragon, A. (2005) - *Dermal exposure to pesticides in Nicaragua. A qualitative and quantitative approach*. Doctoral Theses. Stockholm, Department of Public Health Sciences, Division of Occupational Medicine. Stockholm Karolinska Institutet.

Au, W.W.; Sierra-Torres, C.H.; Cajas-Salazar, N.; Shipp, B.K. e Legator, M.S. (1999) - Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environmental Health Perspectives*, 107:501-505.

Bhalli, J.A.; Khan, Q.M.; Khalid, A.M. e Nassim, A. (2006) - Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. *Mutagenesis*, 21: 143-148.

Bolognesi, C.; Lando, C.; Forni, A.; Landini, E.; Scarpato, R.; Migliore, L. e Bonassi, S. (1999) - Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age and ageing*, 28: 393-397.

Bolognesi, C.; Landini, E.; Perrone, E. e Roggeri, P. (2004) - Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with all-chromosome centromeric probe. *Mutation Research*, 557:109-117.

Bolognesi, C.; Perrone, E. e Landini, E. (2002) - Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis*, 17: 391-397.

Bonassi, S. e Au, W. (2002) - Biomarkers in molecular epidemiology studies studies for health risk prediction. *Mutation Research*, 511: 73-86.

Bonassi, S.; Bolognesi, C.; Abbondandolo, A.; Barale, R.; Bigatti, P.; Camurri, L.; Dalpra, L.; Ferrari, M. D.; Forni, A.; Lando, C.; Padovani, P.; Pasquini, R.; Stella, M. e Puntoni, R. (1995) - influence of sex on cytogenetic end points: Evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer epidemiology biomarkers and prevention*, 4:671-679.

Calvert, G.M.; Talaska, G.; Mueller, C.A.; Ammenheuser, M.M.; Au, W.W.; Fajen, J.M.; Fleming, L.E.; Briggles, T. e Ward, E. (1998) - Genotoxicity in workers exposed to methyl bromide. *Mutation Research*, 417: 115-128.

Carbonell, E.; Valbuena, A.; Xamena, N.; Creus, A. e Marcos, R. (1995) - Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutation Research*, 344:127-134.

Carbonell, E.; Xamena, N.; Creus, A. e Marcos, R. (1993) - Cytogenetic biomonitoring in a spanish group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis*, 8:511-517.

Cecchine, G.; Golomb, B.A.; Hilborne, L.H.; Spektor, D.M. e Anthont, C.R. (2000) - Pesticides. *A Review of the Scientific Lite-*

- ature as it pertains to gulf war illnesses. Santa Monica, USA, RAND Corporation, vol. 8: Pesticides, p.5-14.
- Costa, C.; Teixeira, J.; Silva, S.; Roma-Torres, J.; Coelho, P.; Gaspar, J.; Alves, M.; Laffon, B.; Rueff, J. e Mayan, O. (2006) - Cytogenetic and molecular biomonitoring of a portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis*, 21: 343-350.
- Davies, H.W.; Kennedy, S.M.; Teschke, K.; Jenny, P. e Quintana, E. (1998) - Cytogenetic analysis of South Asian berry pickers in British Columbia using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, 416: 101-113.
- Ecobichon, D.J. (2001) - Toxic effects of pesticides. In: C. D. Klaassen (Ed.) - *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. New York, McGraw-Hill Companies, p.763-805.
- El-Khatib, H. e Hammam, F. (2003) - Cytogenetic biomonitoring of egyptian workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes. In: Cebulska-Wasilewska, A.; Au, W.W. e Srám, R.J. (Eds.) - *Human Monitoring for Genetic Effects*. IOS Press, NATO Science Series, vol. 351, p.142-150.
- Farmer, P.B. e Emeny, J.M. (2006) - *Biomarkers of carcinogen exposure and early effects*. Lodz, Nofer Institute of Occupational Medicine.
- Faust, F.; Kassie, F.; Knasmüller, S.; Boedeker, R.H.; Mann, M. e Mersch-Sundermann, V. (2004) - The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 566: 209-229.
- Fenech, M. (1998) - Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes - a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutation Research*, 404: 155-165.
- Fenech, M. (2000) - The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81-95.
- Fishel, F.; Brown, C.; Hock, W.; Sanders, D. e Jarman, J. (1991) - *Pesticides and the environment*. Ed.U.E., Columbia, Missouri, University of Missouri-Columbia, 6 p.
- Garaj-Vrhovac, V. e Zeljezic, D. (2001) - Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology*, 165: 153-162.
- Garaj-Vrhovac, V. e Zeljezic, D. (2002) - Assessment of genome damage in a population of croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. *Journal of Applied Toxicology*, 22: 249-255.
- Garry, V.F.; Tarone, R.E.; Kirsch, I.R.; Abdallah, J.M.; Lombardi, D.P.; Long, L.K.; Burroughs, B.L.; Barr, D.B. e Kesner, J.S. (2001) - Biomarker correlations of urinary 2,4-d levels in foresters: genomic instability and endocrine disruption. *Environmental Health Perspectives*, 109: 495-500.
- Gómez-Arroyo, S.; Díaz-Sánchez, Y.; Meneeses-Pérez, M.; Villalobos-Pietrini, R. e Rodríguez, J.L. (2000) - Cytogenetic biomonitoring in a mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research*, 466: 117-124.
- Grover, P.; Danadevi, K.; Mahboob, M.; Rozati, R.; Banu, B.S. e Rahman, M. (2003) - Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the comet assay. *Mutagenesis*, 18: 201-205.
- Hoffmann, H.; Högel, J. e Speit, G. (2005) - The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis*, 20: 455-466.
- Hughes, W. (1996) - *Essentials of environmental toxicology: the effects of environmentally hazardous substances on human health*. London, Taylor and Francis.
- IARC - International Agency for Research on Cancer, (1991) - *Occupational exposure in insecticide application and some pesticides*. Lyon, France, IARC, p.178-250. (IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans 53).

- Jaga, K. e Dharmani, C. (2005) - Epidemiology of pesticide exposure and cancer: a review. *Reviews on Environmental Health*, 20: 15-38.
- Joksic, G.; Vidakovic, A. e Spasojevic-Tisma, V. (1997) - Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. *Environmental Research*, 75: 113-118.
- Kaioumova, D.F. e Khabutdinova, L.K. (1998) - Cytogenetic characteristics of herbicide production workers in Ufa. *Chemosphere*, 37: 1755-1759.
- Keifer, M.C. (2000) - Effectiveness of interventions in reducing pesticide overexposure and poisonings. *American Journal of Preventive Medicine*, 18: 80-89.
- Kirsch-Volders, M. e Fenech, M. (2001) - Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, 16: 51-58.
- Lebailly, P.; Vigreux, C.; Lechevrel, C.; Ledemeny, D.; Godard, T.; Sichel, F.; Le-Talaër, J.; Henry-Amar, M. e Gauduchon, P. (1998) - DNA damage in mononuclear leukocytes of farmers measured using the alkaline comet assay: discussion of critical parameters and evaluation of seasonal variations in relation to pesticide exposure. *Cancer Epidemiology Biomarkers e Prevention*, 7: 929-940.
- Links, J.M.; Kensler, T.W. e Groopman, J.D. (1995) - Biomarkers and mechanistic approaches in environmental epidemiology. *Annual Review of Public Health*, 16: 83-103.
- Liu, Y.J.; Huang, P.-L.; Chang, Y.-F.; Chen, Y.-H.; Chio, Y.-H.; Xu, Z.-L. e Wong, R.-H. (2006) - GSTP1 genetic polymorphism is associated with a higher risk of DNA damage in pesticide-exposed fruit growers. *Cancer Epidemiology Biomarkers e Prevention*, 15: 659-666.
- Munnia, A.; Puntoni, R.; Merlo, F.; Parodi, S. e Peluso, M. (1999) - Exposure to agrochemicals and DNA adducts in western Liguria, Italy. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 52-56.
- Norppa, H. e M-Falck, G.C. (2003) - What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 18: 221-233.
- NRC - National Research Council (2004) - *Intentional human dosing studies for EPA regulatory purposes: scientific and ethical issues*. Committee on the Use of Third Party Toxicity Research with Human Research Participants Science, Technology, and Law Program, National Research Council, Washington, The National Academies Press, 226 p.
- Padmavathi, P.; Prabhavathi, P.A. e Reddy, P.P. (2000) - Frequencies of SCEs in peripheral blood lymphocytes of pesticide workers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64: 155-160.
- Pastor, S.; Creus, A.; Xamena, N.; Siffel, C. e Marcos, R. (2002a) - Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40: 101-109.
- Pastor, S.; Lucero, L.; Gutiérrez, S.; Durban, R.; Gomez, C.; Parron, T.; Creus, A. e Marcos, R. (2002b) - A follow-up study on micronucleus frequency in spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis*, 17: 79-82.
- Pastor, S.; Gutiérrez, S.; Creus, A.; Cebuska-Wasilewska, A. e Marcos, R. (2001) - Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of polish farmers exposed to pesticides. *Mutation Research*, 495: 147-156.
- Piperakis, S.M.; Petrakou, E.; Tsilimigaki, S.; Sagnou, M.; Monogiudis, E.; Haniotakis, G.; Karkaseli, H. e Sarikaki, E. (2003) - Biomonitoring with the comet assay of greek greenhouse workers exposed to pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 41: 104-110.
- Preston, R.J. e Hoffman, G.R. (2001) - Chapter 9: Genetic toxicology. In: Klassen, C.D. (Ed.) - *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons*. McGraw-Hill Companies, p. 321-350.

- Ramsey, M.; Moore, D.II; Briner, J.; Lee, D.; Olsen, L.; Senft, J. e Tucker, J. (1995) - The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mutation Research*, 338: 95-106.
- Sanborn, M.; Cole, D.; Kerr, K.; Vakil, C.; Sanin, L.H. e Bassil, K. (2004) - *Pesticides literature review*. Toronto, Ont, Ontario College of Family Physicians, 188 p.
- Shaham, J.; Kaufman, Z.; Gurvich, R. e Levi, Z. (2001) - Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutation Research*, 491: 71-80.
- Silbergeld, E.K. (1998) - Toxicologia. In: OIT (Ed.) - *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. Madrid, Oficina Internacional del Trabajo, 84 p.
- Silva, J.D.; Erdtmann, B. e Henriques, J.A.P. (2003) - *Genética toxicológica*. Monte Alegre, Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental.
- Stacey, N. (2004) - Basics of toxicology. In: Winder e N. H. Stacey (Eds.) - *Occupational toxicology*. Boca Raton, Florida, CRC Press, p. 17-40.
- Tice, R.T. (1995) - The single cell gel / Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Philips, D. e Venitt, S. (Eds.) - *Environmental Mutagenesis*. Oxford, Bios Scientific Publishers, p. 315-339.
- Ündegör, Ü. e Basaran, N. (2002) - Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides mixtures by the alkaline comet assay. *Genotoxicity*, 76: 430-436.
- VanDelft, J.H.M.; Baan, R.A. e Roza, L. (1998) - Biological effect markers for exposure to carcinogenic compound and their relevance for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 28: 477-510.
- Vieira, M.M. (2006) - *Venda de produtos fitofarmacêuticos em Portugal em 2005*. Lisboa, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Direção-Geral de Protecção das Culturas.
- Weinger, M. e Lyons, M. (1992) - Problem-solving in the fields: an action-oriented approach to farmworker education about pesticides. *American Journal of Industrial Medicine*, 22: 677-690.
- WHO (1990) - *Public health impact of pesticides used in agriculture*. Geneva, World Health Organization, 140 p.
- Zeljezic, D. e Garaj-Vrhovac, V. (2001) - Chromosomal aberrations and single cell gel electrophoresis (comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis*,