



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

THALITA PEDON DE ARAUJO CARDOSO

ESTRATÉGIAS E IMPLEMENTAÇÃO DE TÉCNICAS *IN VITRO*, *EX VIVO* E *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DA PASSAGEM DÉRMICA E OCULAR DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

Recife
2020

THALITA PEDON DE ARAUJO CARDOSO

ESTRATÉGIAS E IMPLEMENTAÇÃO DE TÉCNICAS *IN VITRO*, *EX VIVO* E *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DA PASSAGEM DÉRMICA E OCULAR DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Co-orientadora(s): Prof^a. Dr^a. Cheila N. Galindo Bedor

Prof^a. Dr^a. Leila Bastos Leal

Recife
2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

C268e Cardoso, Thalita Pedon de Araujo.
Estratégias e implementação de técnicas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para avaliação da passagem dérmica e ocular de resíduos de pesticidas / Thalita Pedon de Araujo Cardoso. – 2020.
83 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Davi Pereira de Santana.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Agroquímicos. 2. Técnicas *in vitro*. 3. Pele. I. Santana, Davi Pereira de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-068)

THALITA PEDON DE ARAUJO CARDOSO

ESTRATÉGIAS E IMPLEMENTAÇÃO DE TÉCNICAS *IN VITRO*, *EX VIVO* E *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DA PASSAGEM DÉRMICA E OCULAR DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em: 17 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a. Ana Amélia Moreira Lira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Fernando José Malagueño de Santana (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Virginia Laura Lucas Torres (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, razão de todas as coisas, por me permitir em todo o tempo, sentir a Sua presença em minha vida.

Ao meu amado esposo Igor, por me amar como a si mesmo, sempre demonstrando o seu companheirismo e por ser meu maior encorajador em tudo, não poupando esforços para me ver feliz. Obrigada por ser exatamente você e por despertar o melhor de mim!

Aos meus pais, Josael e Ida, por serem meus exemplos de amor, dedicação e cuidado. Agradeço a vocês por tudo e principalmente por sempre acreditarem em mim, não me deixando esquecer que Deus governa sobre tudo.

À minha irmã Sarah, por ser essa pessoa amável a quem eu admiro e que mesmo conhecendo as minhas limitações me incentiva em tudo. Obrigada por enxergar sempre a minha melhor versão, me fazendo ter a certeza de que nunca estarei sozinha.

Ao Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, meu orientador, pelo apoio, oportunidade e pelas palavras que nos fazem refletir.

À Prof^a. Dr^a. Leila Bastos Leal, minha (co) orientadora, por ser essa pessoa a quem eu admiro e conservo um enorme carinho. Muito obrigada por me acolher, me direcionar e por sempre estar disponível munida das palavras adequadas nos momentos oportunos. À senhora a minha gratidão.

Aos meus amigos do laboratório por toda a amizade e pelos momentos agradáveis durante esse período. Em especial a Wellithom, pela amizade, conversas e auxílio em diversas etapas deste trabalho.

Ao senhor Antônio e a senhora Virgínia, pessoas maravilhosas e acolhedoras que tive o prazer em conhecer o meu muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Danilo Bedor, pela contribuição durante os ensaios analíticos.

A todos do NUDFAC, pelo apoio e torcida.

Aos voluntários que participaram do estudo.

Aos professores e funcionários do PPGCF-UFPE.

A FACEPE pela bolsa concedida.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Após um período de ênfase nas ações governamentais para a modernização da agricultura na região nordeste do Brasil, o Vale de São Francisco tornou-se um local fértil e propício ao cultivo, principalmente de frutas, onde é possível encontrar grandes empresas e pequenos agricultores. Assim, o agrotóxico dimetoato (organofosforado) amplamente utilizado nesta região foi selecionado como objeto deste estudo. O estudo de caso *in vivo* foi realizado com três trabalhadores através de duas abordagens: 1) uma secção de algodão, imitando uma peça de roupa, fixada nas roupas do trabalhador, em diferentes regiões com área exposta específica para investigar a exposição dérmica do dimetoato; 2) a quantificação do estrato córneo foi realizada pela técnica de *tape-stripping* para avaliar a absorção dérmica do dimetoato. Uma abordagem *in vitro* usando células Franz foi realizada aplicando-se dimetoato (0,4 e 1,8 µg) diretamente na pele de porco ou em uma secção de algodão antes de entrar em contato com a pele de porco. Dois estudos *ex vivo* foram ainda realizados em, um com córneas bovinas excisadas frescas e refrigerada e o outro com olhos bovinos inteiros frescos, refrigerados e danificados. Em ambos os experimentos foram aplicados 50 µL (5 mg/mL) de uma formulação de pesticida emulsificável (Dimetoato 500 EC[®]). Os resultados *in vivo* demonstraram os altos níveis de agrotóxicos aos quais os agricultores estão expostos, com a exposição dérmica potencial total entre 0,87-2,85 mg/pessoa/h e o fator estimado de penetração de EC(PF) entre 0-54,0 e 0- 28,9% para a nuca e os braços, respectivamente. Para o estudo *in vitro*, a quantidade de pesticida retido no EC foi de $52,63 \pm 10,73$ e $135,15 \pm 31,8$ ng/cm² após a aplicação diretamente no EC e demonstrando uma boa concordância com a abordagem *in vivo*. No estudo de absorção ocular *ex vivo*, os perfis de dimetoato, os fluxos e os coeficientes de permeação não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre córneas excisadas frescas e refrigeradas. Em relação aos resultados obtidos para permeações em olhos inteiros, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os experimentos realizados com olhos frescos e os realizados com olhos refrigerados/danificados. Assim, os estudos preliminares demonstram que a abordagem *ex vivo* desenvolvida utilizando olhos inteiros é simples e demonstrou ser reprodutível para avaliação de agrotóxicos. É evidente que testes adicionais precisam ser realizados utilizando-se outros pesticidas com características físico-químicas distintas para uma melhor compreensão da passagem dos agrotóxicos pela pele.

Palavras-chave: Agroquímicos. Técnicas *in vitro*. Pele.

ABSTRACT

After a period of emphasis on government actions for the modernization of agriculture in northeastern Brazil, the São Francisco Valley has become a fertile and conducive place for cultivation, especially of fruits, where it is possible to find large companies and small farmers. Thus, the pesticide dimethoate (organophosphate) widely used in this region has been selected as an object since this study. The *in vivo* case study was carried out with three workers using two approaches: 1) a section of cotton, imitating a piece of clothing, fixed on the worker's clothes, in different regions with a specific exposed area to investigate the dermal exposure of dimethoate; 2) the stratum corneum was quantified by the tape-stripping technique to assess the dermal absorption of dimethoate. An *in vitro* approach using Franz cells was performed by applying dimethoate (0.4 and 1.8 μg) directly to the pig skin or to a cotton section before coming into contact with the pig skin. Two *ex vivo* studies were also carried out in, one with fresh and chilled excised corneas and the other with fresh, chilled and damaged whole bovine eyes. In both experiments, 50 μL (5 mg/mL) of an emulsifiable pesticide formulation (Dimethoate 500 EC[®]) was applied. The *in vivo* results demonstrated the high levels of pesticides to which farmers are exposed, with the total potential dermal exposure between 0.87-2.85 mg/person/h and the estimated EC penetration factor (PF) between 0-54, 0 and 0- 28.9% for the neck and arms, respectively. For the *in vitro* study, the amount of pesticide retained in the EC was 52.63 ± 10.73 and 135.15 ± 31.8 ng/cm² after application directly to the EC and demonstrating a good agreement with the *in vivo* approach. In the study of ocular absorption *ex vivo*, the dimethoate profiles, flows and permeation coefficients did not show statistical differences ($p < 0.05$) between fresh and chilled excised corneas. Regarding the results obtained for permeations in whole eyes, there was a statistical difference ($p < 0.05$) between the experiments performed with fresh eyes and those performed with chilled / damaged eyes. Thus, preliminary studies demonstrate that the *ex vivo* approach developed using whole eyes is simple and has been shown to be reproducible for the evaluation of pesticides. It is evident that additional tests need to be carried out using other pesticides with different physical-chemical characteristics for a better understanding of the passage of pesticides through the skin.

Keywords: Agrochemicals. In Vitro Techniques. Skin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 –	Estrutura química do dimetoato.....	28
Figura 02 –	Comparação histológica entre a pele suína e a humana.....	34
Figura 03 –	Estrutura da córnea bovina.....	35
Figura 04 –	Estrutura da mucosa suína bucal (a) e esofágica (b). E: epitélio escamoso estratificado; B: lâmina basal; CT: tecido conjuntivo; P: papilas; M: mucosas musculares; 100X.....	36
Figura 05 –	Representação esquemática da célula de difusão vertical.....	37
Figura 06 –	Locais em que as amostras foram coletadas com secções de algodão e com as fitas adesivas para avaliar a distribuição do pesticida dimetoato.....	44
Figura 07 –	Concentrações aplicadas no estudo <i>in vitro</i>	46
Figura 08 –	Esboço do estudo <i>in vitro</i> (A) e do estudo <i>ex vivo</i> (B) utilizando olhos bovinos.....	49
Figura 09 –	Quantidade de dimetoato ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) encontrada no retalho de algodão para os três locais e trabalhadores avaliados.....	57
Figura 10 –	Perfil cumulativo do dimetoato permeado (ng/cm^2) em experimento de 4 horas com aplicação da solução de dimetoato diretamente na pele do porco (N = 6) (painel A). Fluxo calculado de dimetoato (J) ($\text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$) e coeficiente de permeabilidade (KP) (cm/h) (painel B).....	62
Figura 11 –	Perfil de permeação comparativo da córnea e do fluxo calculado (J) ($\text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$) do dimetoato no líquido receptor com aplicação de 50 μL para córnea fresca e refrigerada. A inserção mostra a concentração de dimetoato (ng/mL) na solução receptora aos 60 e 120 minutos.....	63
Figura 12 –	Perfil cumulativo do dimetoato permeado (ng/cm^2) na mucosa	

	esofágica e na sublingual.....	64
Figura 13 –	Concentração de dimetoato (ng/cm ²) no humor aquoso com aplicação de 50µL para as permeações com córneas frescas, refrigeradas e danificadas, após tempos de permeação de 60 e 120 minutos.....	65
Figura 14 –	Secções histológicas: (a) córnea fresca (± 979 µm) (b) córnea refrigerada por 24h (± 1006 µm) e (c) córnea danificada (± 1378 µm) 10X.....	67
Figura 15 –	Viabilidade de linfócitos humanos tratados com solução aquosa de dimetoato em concentrações de 62.500ng/mL, 125.000ng/mL, 250.000ng/mL e 750.000ng/mL. Barras verticais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicado. p = 0,0001.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL50.....	23
Tabela 2 –	Valores dos parâmetros do MS-MS obtidos através da otimização automática.....	56
Tabela 3 –	Exposição dos trabalhadores ao dimetoato durante a pulverização de maçãs.....	58
Tabela 4 –	Dimetoato no EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por área amostrada para os três trabalhadores avaliados.....	59
Tabela 5 –	FP de dimetoato no EC (%) analisado para os três trabalhadores avaliados.....	59
Tabela 6 –	Quantidade encontrada no estudo de permeação realizado após aplicação de dimetoato (200 μL) no algodão nas concentrações de 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e 9 $\mu\text{g} / \text{mL}$	61
Tabela 7 –	Quantidade encontrada no estudo de permeação realizado após aplicação de dimetoato (200 μL) diretamente na pele de porco em concentrações de 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$	61
Tabela 8 –	Dados de retenção em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para permeação <i>in vitro</i> com córnea excisada e para permeação <i>ex vivo</i> com olhos inteiros com volume de aplicação de 50 μL após 2 horas de avaliação.....	66
Tabela 9 –	Resultados do teste BCOP.....	68
Tabela 10 –	Resultados dos testes HET-CAM e CAM-TBS.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NR	Norma Regulamentadora
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
LC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.
BCOP	Teste de permeabilidade e opacidade da córnea bovina
HET-CAM	Teste em membrana corioalantóide
CAM-TBS	Teste de quantificação de azul de trypan em membrana corioalantóide.
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
PND	Plano Nacional de Desenvolvimento
ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
EPI	Equipamentos de proteção individuais
EPC	Equipamentos de proteção coletivos
OMS	Organização Mundial da Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INCA	Instituto Nacional do Câncer
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
NOTIVISA	Sistema de Notificações para a Vigilância Sanitária
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA	Comissões de ética para uso de animais
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações
RENAME	Rede Nacional de Métodos Alternativos
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

LISTA DE SÍMBOLOS

mg/mL	Miligrama por mililitro
nm	Nanômetro
mm ²	Milímetro quadrado
®	Marca registrada
mL/min	Mililitro por minuto
mM	Milimolar
kg	Quilograma
m	Metro
L	Litro
µg/mL	Micrograma por centímetro quadrado
±	Mais ou menos
cm ²	Centímetro quadrado
ng/cm ²	Nanograma por centímetro quadrado
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
cm	Centímetro
g	Gramma
J	Fluxo
K _p	Coefficiente de permeabilidade
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
r ²	Coefficiente de determinação
RPM	Rotação por minuto
CV%	Coefficiente de variação
DL ₅₀	Dose letal média a 50%
CL ₅₀	Concentração letal a 50%

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1	AGROTÓXICOS	19
3.1.1	Legislação	22
3.1.2	Exposição ocupacional	24
3.1.3	Dimetoato	27
3.1.4	Região do Vale do São Francisco	29
3.2.	MÉTODOS ALTERNATIVOS	30
3.2.1	Permeações utilizando pele/mucosa bucal suína e mucosa ocular bovina	32
3.2.2	Teste de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP)	37
3.2.3	Ensaio em membrana cório-alantóide (HET-CAM/CAM-TBS)	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	INSUMOS	40
4.2	SELEÇÃO DO AGROTÓXICO	40
4.3	QUANTIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DO AGRÓTOXICO DIMETOATO	40
4.3.1	Desenvolvimento do método bioanalítico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) para quantificação das amostras de dimetoato	40
4.3.1.1	Solução padrão	40
4.3.1.2	Preparo das amostras utilizadas na otimização cromatográfica e da fonte de ionização	41
4.3.1.3	Condições espectrométricas	41
4.3.1.4	Condições cromatográficas.....	41
4.3.2	Procedimento de extração e preparo das amostras dos estudos <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>.	42
4.3.3	Processamento e Análise dos dados	42
4.4	ESTUDO IN VIVO	42
4.5	ESTUDO <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO PELE SUÍNA	45

4.6	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> E <i>EX VIVO</i> UTILIZANDO OLHOS BOVINOS E MUCOSAS SUINAS.....	47
4.6.1	Preparo da solução de dimetoato	47
4.6.2	Transporte e armazenamento dos olhos bovinos e das mucosas suínas	47
4.6.3	Olhos bovinos danificados para estudo de olhos inteiros.....	48
4.6.4	Estudo de permeação <i>in vitro</i> utilizando córnea bovina excisada fresca e refrigerada por 24h.....	48
4.6.5	Estudo de permeação e retenção <i>in vitro</i> do dimetoato utilizando mucosa esofágica e sublingual frescas provenientes de suínos	49
4.6.6	Delineamento do estudo de permeação <i>ex vivo</i> utilizando olhos bovinos inteiros frescos, refrigerados por 24h e danificados	49
4.6.7	Avaliação histológica das córneas bovinas	50
4.7	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	50
4.7.1	Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	51
4.7.2	Cultura de linfócitos e estimulação <i>in vitro</i> com dimetoato	51
4.7.3	Análise da viabilidade celular.....	51
4.8	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO E CORROSÃO OCULAR....	52
4.8.1	Teste de Permeabilidade e Opacidade da Córnea Bovina (BCOP)	52
4.8.2	Teste de ovo de galinha - Membrana cório-alantóide (HET-CAM)	53
4.8.3	Teste Membrana cório-alantóide - Coloração com Azul de Trypan (CAM-TBS)	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA Á ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS) PARA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DIMETOATO.....	55
5.1.1	Condições espectrométricas	55
	Assim, a ionização dos compostos foi realizada à pressão atmosférica por eletro pulverização no modo positivo e a transição de massas pelo monitoramento de múltiplas reações (MRM) para detecção de dimetoato foi de m/z 230 > 125.	56
5.1.2	Condições cromatográficas	56
5.2	ESTUDO <i>IN VIVO</i>	56
5.2.1	Estudo <i>in vivo</i> – Secções de algodão	56
5.2.2	Estudo <i>in vivo</i> - Quantificação no estrato córneo e na saliva.....	58

5.3	ESTUDO <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO PELE DE PORCO	60
5.4	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> E <i>EX VIVO</i> UTILIZANDO OLHOS BOVINOS.....	63
5.4.1	Estudo de permeação <i>in vitro</i> utilizando córnea bovina excisada fresca e refrigerada por 24h.....	63
5.4.2	Estudo de permeação <i>in vitro</i> do dimetoato utilizando mucosa esofágica e sublingual frescas provenientes de suínos	64
5.4.3	Estudo de permeação <i>ex vivo</i> utilizando olhos bovinos inteiros frescos, refrigerados por 24h e danificados.....	65
5.4.4	Avaliação histológica das córneas bovinas	66
5.5	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	67
5.6	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO E CORROSÃO OCULAR...	68
6	CONCLUSÃO.....	70
6.1	PERSPECTIVAS	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA	82
	ANEXO A – SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA E APROVAÇÃO DO ESTUDO.....	83

1 INTRODUÇÃO

Após a Segunda Guerra Mundial, a agricultura passou por um período de mudanças, e diversas políticas para incentivar a expansão e a consolidação do mercado agrícola foram implementadas. Esse período, conhecido como "Revolução Verde", incentivou além do uso de agroquímicos, a produção em monoculturas altamente mecanizadas e o uso de fertilizantes químicos. Entretanto, esse processo ocorreu de forma desigual nas várias regiões do mundo (LONDRES, 2011; PELAEZ, TERRA, SILVA, 2010; SANTANA & MACHINSKI, 2004).

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, após esse período, o uso de agroquímicos aumentou consideravelmente ao longo dos anos, fato que não foi acompanhado pela implementação de programas de qualificação da força de trabalho e/ou leis que protegessem adequadamente o trabalhador rural (MOREIRA *et al.*, 2002; PERES, MOREIRA, DUBOIS, 2003). Desta forma, os danos à saúde humana decorrentes da exposição aos agrotóxicos tornaram-se cada vez mais comuns nessa população (KOZIOSKI & CIOCCA, 2000).

O contato dos trabalhadores rurais com os pesticidas ocorre principalmente através da pele, da via inalatória e da mucosa ocular, embora outras vias possam predominar na exposição não ocupacional. Uma vez expostos aos agrotóxicos, devido principalmente a falta e/ou uso incompleto da paramentação, os trabalhadores, se destacando aqueles da agricultura familiar, podem apresentar danos imediatos por simples irritação da pele e mucosa dos olhos, ou danos tardios, como neuropatias, distúrbios hematológicos, diversos tipos de câncer e uma série de alterações na visão (KOZIOSKI & CIOCCA, 2000).

No Brasil, a Norma Regulamentadora 31 (NR 31) anexada à Portaria nº. 86 de 04 de maio de 2005 exige que os empregadores realizem avaliações do risco ocupacional e promovam condições de segurança para os trabalhadores que manipulam agroquímicos (BRASIL, 2005). Todavia, nos países em desenvolvimento a agricultura é, principalmente, de base familiar. No Brasil, esta modalidade é responsável pela renda de 40% da população economicamente ativa do país e por mais de 70% dos brasileiros empregados no campo (MAPA, 2019).

Esta forma de agricultura, passada de geração em geração, por ser vista pelos trabalhadores como segura, inofensiva e rotineira, atrelada as dificuldades de acesso às informações, os expõe a um maior risco. Muitas vezes, devido ao não cumprimento das normas de saúde e segurança, os agrotóxicos são utilizados indiscriminadamente, sem as

medidas de proteção adequadas (DAMALAS & ABDOLLAHZADEH, 2016; ESECHIE & IBITAYO, 2011). No entanto, existem poucos estudos, principalmente nos países em desenvolvimento, que avaliam as condições de trabalho dessa população (MUTTRAY *et al.*, 2006; AN *et al.*, 2014; CAO *et al.*, 2015; DAMALAS & ABDOLLAHZADEH, 2016).

Na região nordeste do Brasil, após um período de ênfase nas ações governamentais para a modernização da agricultura local, como o incentivo à irrigação em áreas semiáridas, a região conhecida como Vale de São Francisco tornou-se um local fértil e propício ao cultivo, principalmente de frutas. Atualmente, essa região é uma das principais áreas de exportação da horticultura irrigada do país, onde é possível encontrar grandes empresas e pequenos agricultores (agricultura familiar), com mais de 51% de sua população economicamente ativa empregada na agricultura (ARAÚJO *et al.*, 2007, MAPA, 2019).

Desta forma, o pesticida dimetoato, amplamente utilizado na região do Vale do São Francisco, foi selecionado para o estudo. Seu uso foi introduzido em 1956, sendo produzido em muitos países. Trata-se de um produto químico de uso geral contra uma ampla gama de insetos na agricultura e também para o controle da mosca doméstica (IPCS, 1989). Pertencente à classe dos organofosforados o dimetoato apresenta ação sistêmica, solubilidade em água de 2,08 mg/mL, log P 1,21 e pKa 15,99 (TMIC, 2020).

Em vista desses aspectos, esse trabalho teve por objetivo traçar estratégias por meio da implementação de técnicas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para a avaliação da passagem dérmica, ocular e bucal dos resíduos de agrotóxicos, considerando as condições ambientais de trabalho na agricultura familiar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Traçar estratégias por meio da implementação de técnicas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para a avaliação da passagem dérmica, ocular e bucal dos resíduos de agrotóxicos, considerando as condições ambientais de trabalho na agricultura familiar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) para detecção de resíduos de dimetoato em pele, em mucosa esofágica e sublingual frescas provenientes de suínos, estrato córneo humano, humor aquoso/córnea bovina e em secções de algodão.
- Realizar estudo de caso *in vivo* para a avaliação do resíduo agrotóxico (dimetoato) na roupa dos trabalhadores rurais utilizando secções de algodão, bem como, no estrato córneo humano por meio da técnica de *tape-stripping*;
- Realizar o estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro* por meio da aplicação direta e indireta (algodão) do dimetoato na pele dorsal de porco dermatomizada;
- Realizar o estudo de permeação e retenção *in vitro* do dimetoato utilizando córnea bovina excisada fresca e refrigerada;
- Realizar o estudo de permeação *in vitro* do dimetoato utilizando mucosa esofágica e sublingual frescas provenientes de suínos;
- Desenvolver técnicas de permeação e retenção *ex vivo* utilizando olhos bovinos inteiros frescos, danificados e refrigerados para a avaliação do dimetoato;
- Realizar a avaliação histológica da córnea bovina excisada fresca, danificada e refrigerada;
- Realizar a avaliação da citotoxicidade do agrotóxico dimetoato utilizando linfócitos humanos;
- Avaliar o potencial de irritação e corrosão ocular do agrotóxico dimetoato utilizando o teste de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP);

- Avaliar o potencial de irritação e corrosão ocular do agrotóxico dimetoato utilizando o teste em membrana corioalantóide (HET-CAM) e o teste de quantificação de azul de trypan em membrana corioalantóide (CAM-TBS).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 AGROTÓXICOS

Durante muito tempo, a agricultura foi vista como meio de vida para os trabalhadores rurais e suas famílias (SILVA *et al.*, 2005). Entretanto, com o crescimento do contingente populacional e após o período das duas guerras mundiais, o uso de agrotóxicos na agricultura, teve origem como um mercado promissor para as indústrias químicas produtoras de “venenos”, que até então eram utilizados como armas químicas (LONDRES, 2011). Assim, o processo produtivo agrícola tornou-se dependente de agrotóxicos e fertilizantes químicos devido aos sistemas de monoculturas mecanizadas, ao uso de adubos químicos e a implementação de políticas mundiais de incentivo à expansão e consolidação deste mercado. (ABRASCO, 2015, LONDRES, 2011; SANTANA; MACHINSKI JUNIOR, 2004; PELAEZ; TERRA; SILVA, 2010).

Este pacote tecnológico, que ficou conhecido como “Revolução Verde” e seria fundamental para erradicar a fome que assolava boa parte da população mundial teve como os principais responsáveis por sua difusão o Banco Mundial (LONDRES, 2011) e a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO (2003) que define agrotóxicos (pesticidas, praguicidas, venenos ou defensivos agrícolas) como:

Qualquer substância, ou mistura de substâncias, usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga – incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de danos durante (ou interferindo na) a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados, ou que - deva ser administrada para o controle de insetos, aracnídeos e outras pestes que acometem os corpos de animais de criação.

No Brasil, os primeiros registros de utilização de agrotóxicos foram realizados no ano de 1946, em programas de saúde pública de combate a parasitas e vetores (FERREIRA, 1999). Durante as décadas 50 e 60, o processo de registro de novos pesticidas junto ao Ministério da Agricultura foi intenso, gerando em média 2.050 novos registros (FILHO, 2002). Entretanto, no início dos anos 60, os problemas decorrentes da utilização generalizada de substâncias químicas no combate às pragas, essencialmente do diclorodifeniltricloroetano (DDT), os pesticidas passaram a ser observados com cautela. Tal fato, deve-se à publicação do livro intitulado *Silent Spring* (Primavera Silenciosa) no ano de 1962, pela pesquisadora americana Rachel Carson, que continha denúncias em

relação ao uso do DDT, como a redução populacional de variadas espécies de aves. Desta maneira, este movimento desencadeou uma reavaliação da segurança do uso de agrotóxicos pelos órgãos governamentais americanos que teve impacto no cenário mundial (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002; FILHO, 2002).

Em 1965, com a criação do Sistema Nacional de Crédito Rural brasileiro, que estabelecia a compra de insumos químicos pelos agricultores para posterior concessão do crédito agrícola, bem como a criação, em 1975, do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas, no âmbito do II Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), foram gerados recursos financeiros que subsidiaram a criação de empresas nacionais e a instalação de empresas transnacionais de insumos agrícolas com o objetivo de modernizar a agricultura. Isto significou a abertura do caminho, para que os agrotóxicos começassem a ser utilizados em grande escala no país (ARAÚJO *et al.*, 2007; PELAEZ *et al.*, 2009 apud LONDRES, 2011; SILVA *et al.*, 2005).

Outro aspecto importante foi o marco regulatório defasado e pouco rigoroso, que vigorou até 1989, facilitando a aprovação de centenas de substâncias tóxicas, muitas já proibidas em outros países (PELAEZ; TERRA; SILVA, 2010). Com o passar do tempo, a utilização de agrotóxicos na agricultura brasileira apenas foi intensificada, e o modelo atual envolve a expansão dos latifúndios agroindustriais que se utilizam da vasta complexidade tecnológica, causando uma série de danos ambientais e sociais (SOARES & PORTO, 2007).

Atualmente, o Brasil é um dos países que mais consomem agrotóxicos no mundo. De modo que, na safra de 2011, foram plantados 71 milhões de hectares de lavoura temporária (soja, milho, cana, algodão) e permanente (café, cítricos, frutas, eucaliptos), o que corresponde aproximadamente a 853 milhões de litros (produtos formulados) de agrotóxicos pulverizados nessas lavouras, o que representa uma média de uso de 12 litros/hectare e exposição média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de agrotóxicos por habitante (ABRASCO, 2015).

O fato é que se tem difundido a ideia de que existe uma forma segura de se utilizar os agrotóxicos e de que não é possível produzir alimentos suficientes de maneira ecológica, respeitando os diversos biomas do Brasil e do mundo (Rigotto; Rosa, 2012). Entretanto, os impactos do uso dos biocidas à saúde pública são extensos, e abrangem não só a saúde dos trabalhadores rurais, como também a da população em geral que consome os alimentos contaminados por esses produtos. No mais, os danos ambientais gerados ao solo, ao ar, a

água, a flora e a fauna são extensos (ABRASCO, 2015; LONDRES, 2011; PIGNATI *et al.*, 2007).

Somado a tal fato, enquanto nos países desenvolvidos a agricultura é considerada como um sistema agroindustrial, que compõe uma atividade comercial especializada na produção, comercialização e distribuição dos alimentos, nos países em desenvolvimento, a exemplo do Brasil, ela é baseada na produção familiar. Vale salientar que apenas uma pequena parcela dessa agricultura, foi modernizada, tornando-se competitiva frente ao mercado (SILVA *et al.*, 2005).

Assim, no modelo agrícola familiar, os agricultores estabelecem diferentes tipos de relações de trabalho sendo elas, de proprietário-produtor, diarista, trabalhador temporário, arrendatário e entre outras combinações. Diferindo, desta forma, da agroindústria que é caracterizada pela contratação direta e/ou terceirização da mão de obra assalariada. Portanto, essa diversidade na agricultura familiar, além de dificultar a classificação das relações de trabalho no setor, gera um contato amplo dos trabalhadores rurais com diferentes classes de pesticidas, bem como uma maior dificuldade em monitorar as condições de saúde dessa população (SILVA *et al.*, 2005).

Os dados publicados demonstram que no mundo ocorrem aproximadamente 220 mil mortes por uso de agrotóxicos por ano e estima-se que 25 milhões de trabalhadores rurais sejam intoxicados de forma aguda nos países em desenvolvimento (ALAVANJA; HOPPIN; KAMEL, 2004 *apud* BEDOR, 2008). Deste modo, de acordo com Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), no período de 2006 a 2014, ocorreram 9.488 casos de intoxicação humana por uso de agrotóxicos em ambiente agrícola, registrados em circunstância ocupacional. Mas, segundo o Ministério da Saúde, para cada caso notificado, há estimativa de que existam 50 não notificados aumentando esses valores para cerca de 480.000 casos (PERES, 2003).

Desta forma, a ausência de informações sobre o consumo de agrotóxicos no Brasil juntamente com a insuficiência dos dados sobre as intoxicações, dificulta o conhecimento a respeito da extensão da carga química de exposição ocupacional bem como sobre a dimensão dos danos causados à saúde (FARIA, 2007). Além disso, o risco a saúde relacionado ao uso de pesticidas depende de fatores como: tipo e intensidade da exposição, perfil toxicológico do produto e da vulnerabilidade da população exposta (DELGADO & PAUMGARTTEN, 2004).

Por conseguinte, um ponto importante é a determinação dos níveis de exposição, que auxiliam no processo de tomada de decisão para a avaliação dos riscos aos quais

operadores, trabalhadores, consumidores e ambiente estão submetidos (TSAKIRAKIS *et al.*, 2014). Essa avaliação juntamente com os dados toxicológicos específicos de cada pesticida, deve ser realizada com o intuito de calcular o risco de intoxicação e a segurança de cada condição de trabalho e, quando necessário, de recomendarem medidas de proteção para as condições consideradas inseguras (TÁCIO, OLIVEIRA, MACHADO, 2008). Ao passo que, quando medidas de segurança são tomadas e equipamentos de proteção individuais (EPI) ou coletivos (EPC) são utilizados o risco torna-se menor (DELGADO & PAUMGARTTEN, 2004).

Entretanto, existem poucos estudos que avaliem as condições de exposição e a própria exposição dos trabalhadores rurais brasileiros aos agrotóxicos (DELGADO & PAUMGARTTEN, 2004; GARCIA, 1997; MACHADO *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.* 2001). Em contrapartida, uma série de estudos demonstram que nas regiões brasileiras onde o agronegócio é a principal fonte de renda da população, existe uma maior incidência de câncer, má formações, distúrbios endócrinos, neurológicos e imunológicos (SOUZA & FOLGADO, 2016).

3.1.1 Legislação

Após a revisão da constituição de 1988, a legislação ambiental brasileira apresentou considerável avanço com a publicação da Lei 7.802, conhecida como a Lei dos Agrotóxicos, em 11 de julho de 1989 e regulamentada pelo Decreto no 98.816, de 11 de janeiro de 1990. Anterior a esta Lei, o Decreto nº 24.114, de 14 de abril de 1934 (época na qual os agrotóxicos não eram utilizados como biocidas) era considerado a base regulamentadora do setor (GARCIA; BUSSACOS; FISCHER, 2005).

Desta forma, os agrotóxicos antes submetidos apenas à avaliação toxicológica e de eficácia agronômica, passaram a ter a avaliação e a classificação do potencial de periculosidade ambiental exigidos para fins de registro no Brasil (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

Assim, a Lei dos Agrotóxicos foi um marco do chamado movimento “Nossa Natureza” que teve origem devido a pressões internacionais com foco sobre a Amazônia e ao medo dos militares de perderem o controle sobre a floresta e suas fronteiras. Desta forma, o governo brasileiro da época considerou estratégico aprovar um pacote de medidas pró meio ambiente (LONDRES, 2011).

Em 24 de novembro de 1993, o Decreto nº 991, alterou a Lei e eliminou a necessidade de renovação do registro dos agrotóxicos após cinco anos, descartando assim, a reavaliação periódica dos produtos sob uma ótica de testes mais modernos. Destarte, os agrotóxicos podem ser reavaliados a qualquer momento desde que apresentem riscos à saúde, ao meio ambiente ou sua eficácia mostre-se reduzida. Posteriormente, o Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, atualmente em vigor, revogou os decretos anteriores (Decreto nº 98.816/ 90 e o nº 991/93), mantendo as modificações estabelecidas (GARCIA; BUSSACOS; FISCHER, 2005; LONDRES, 2011). Fato que facilita a permanência no mercado, de agrotóxicos capazes de provocar danos (LONDRES, 2011).

Outro ponto abordado na Lei dos agrotóxicos é à definição dos parâmetros de classificação, estabelecidos pelo Ministério da Saúde por meio da Portaria nº 3/92 de forma similar aos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no início da década de 1970. De acordo com esses parâmetros, os agrotóxicos são distribuídos em quatro classes toxicológicas (tabela 1), levando-se em consideração, principalmente, sua dose letal média a 50% (DL_{50}) e outros indicadores como danos causados à córnea, lesões na pele e concentração letal a 50% (CL_{50}). Todavia, no Brasil, a classificação toxicológica tem servido apenas para a apresentação dos riscos nas embalagens comerciais (GARCIA; BUSSACOS; FISCHER, 2008).

Tabela 1 - Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL_{50} .

Classe Toxicológica	Classificação	Cor da faixa no rótulo da embalagem
I	Extremamente tóxico	Vermelho intenso
II	Altamente tóxico	Amarelo intenso
III	Medianamente tóxico	Azul intenso
IV	Pouco tóxico	Verde intenso

Fonte: Adaptado de EMBRAPA, 2020.

Atualmente, de acordo com o Decreto 4.074/02, para o registro de um novo produto no país, o fabricante deve submeter os estudos de comprovação de eficácia e de segurança do pesticida ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Secretaria de Defesa Agropecuária – DAS, ao Ministério da Saúde (MS), através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e ao Ministério do Meio Ambiente, através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Por conseguinte, cabe a esses órgãos analisarem os estudos apresentados, em suas devidas áreas de competência, e demonstrar se o produto apresenta riscos ou não.

Quando nenhum dos órgãos demonstra por meio de evidências a inadequação e/ou ineficácia do produto, ele é aprovado para registro. A questão é que nem sempre é possível estabelecer a relação entre a exposição aos agrotóxicos e os danos por eles causados à saúde e ao meio ambiente (BRASIL, 2002; LONDRES, 2011; PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

A Lei dos Agrotóxicos estabelece ainda, que a aquisição desses produtos só pode ser realizada com a apresentação do Receituário Agrônomo que é um documento emitido apenas por profissional legalmente habilitado (engenheiro agrônomo, engenheiro florestal ou técnico agrícola) (BRASIL, 1989). Segundo o Decreto 4.074/02, esse documento deve conter informações a respeito do diagnóstico, doses de aplicação, quantidade total a ser adquirida, época de aplicação, intervalo de segurança e informações específicas sobre cultura e/ou problema. Isto torna evidente a necessidade de uma visita técnica, pelo profissional habilitado, à propriedade rural antes da emissão de um receituário agrônomo (BRASIL, 2002; LONDRES, 2011).

Em relação às embalagens vazias, o decreto estabelece que estas devem ser devolvidas em um período máximo de um ano a partir da data da compra, aos estabelecimentos comerciais onde foram adquiridas ou a algum posto de recolhimento de embalagens vazias de agrotóxicos. Cabe, portanto, aos fabricantes dos produtos, proverem o destino adequado as embalagens devolvidas. Essa medida previne que as embalagens sejam abandonadas próximo as áreas de cultivo, rios, córregos ou beiras de estradas, já que mesmo lavadas por repetidas vezes, carregam quantidades significativas de resíduos que podem contaminar não só o solo mas a água e até mesmo as pessoas, caso sejam reutilizadas para outras finalidades (BRASIL, 2002; CAMPANHOLA & BETTIOL, 1999).

É importante salientar ainda, que os Estados e Municípios também podem aprovar leis próprias para regulamentar o comércio, o armazenamento, o transporte e o uso de agrotóxicos, bem como o descarte de embalagens vazias. A única exigência é que estas leis não sejam mais permissivas do que as leis federais e as estaduais no caso dos municípios (LONDRES, 2011).

3.1.2 Exposição ocupacional

A partir da Constituição Federal de 1988 o termo agrotóxico passou a ser utilizado em detrimento de defensivos agrícolas. Tal mudança ocorreu devido ao extenso

movimento da sociedade civil organizada, que buscava evidenciar a toxicidade desses compostos para o meio ambiente e para a saúde humana (SIQUEIRA & KRUSE, 2008; FUNASA, 1998).

Os agrotóxicos são, por sua vez, utilizados em diversas áreas, como na saúde pública (controle de vetores), no tratamento de madeira, na produção de flores, na pecuária, no armazenamento de grãos e sementes e, principalmente, na agricultura (INCA, 2010). Assim, como a utilização desses compostos é maior nesse último setor, os agricultores constituem a população mais exposta a esses produtos (MEYER *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 2006).

Somado a tal fato, os danos causados pelos agrotóxicos a saúde são tão severos que o trabalho agrícola já é considerado uma das mais perigosas ocupações da atualidade, uma vez que os riscos ocupacionais são compostos por intoxicações agudas, doenças crônicas, aparecimento de cânceres, alterações imunológicas e problemas reprodutivos (FARIA, FASSA, FACCHINI, 2007; BRASIL, 2006).

Os quadros de intoxicação aguda caracterizam-se por um período de exposição breve a doses elevadas de compostos muito tóxicos, com aparecimento dos sintomas de forma rápida e em apenas algumas horas após a exposição. Os efeitos podem incluir cefaléia, irritação cutaneomucosa, hipersensibilização, náusea, discreta tontura podendo levar a arritmias cardíacas, insuficiência respiratória, edema agudo de pulmão, pneumonia química, convulsões, alterações da consciência, choque e coma evoluindo para óbito. Assim, a intoxicação aguda pode ocorrer de forma leve, moderada ou grave, dependendo da quantidade de agrotóxico absorvida e o diagnóstico é de fácil estabelecimento (ABRASCO, 2015; INCA, 2010; LONDRES, 2011).

Já nos quadros de intoxicação crônica, os efeitos apresentam surgimento tardio, aparecendo meses ou anos após a exposição. Normalmente os sintomas são subjetivos e manifestam-se através de inúmeras patologias, que podem ser imunológicas, hematológicas, hepáticas, renais, neurológicas e tumorais (BRASIL, 2006; INCA, 2010). O diagnóstico da intoxicação crônica é difícil de ser estabelecido e os danos muitas vezes são irreversíveis (LONDRES, 2011).

Desta forma, mesmo com o crescimento das pesquisas no Brasil, visando investigar o impacto do uso dos agrotóxicos sobre a saúde humana, não se conhece de forma suficiente a dimensão dos danos causados à saúde, e em menor grau, a extensão da carga química de exposição ocupacional. Isso se deve, provavelmente, a insuficiência dos dados

sobre o consumo dos agrotóxicos no país e sobre as intoxicações (FARIA, FASSA, FACCHINI, 2007).

No Brasil existe uma série de sistemas de notificação e registro sobre intoxicações causadas por agrotóxicos, mas os principais são: o Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas - SINITOX, gerenciado pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), o Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN, gerenciado pelo Ministério da Saúde e o Sistema de Notificações para a Vigilância Sanitária – NOTIVISA, gerenciado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Entretanto, o maior problema são as subnotificações, já que apenas os casos agudos e mais graves são registrados e os agravos não são de notificação compulsória, além de não existir uma integração entre os sistemas de notificação dificultando a análise dos dados (LONDRES, 2011). Outro aspecto importante são os diagnósticos realizados de maneira incorreta e à dificuldade de acesso dos trabalhadores rurais aos centros de saúde e diagnóstico especializados (SIQUEIRA & KRUSE, 2008).

Nesse contexto, existem dois modos principais dos trabalhadores rurais entrarem em contato com os agrotóxicos. O primeiro é de forma direta quando desempenham as atividades de preparo da formulação líquida (conhecida como calda), de aplicação e de limpeza dos equipamentos e o segundo que é de forma indireta, ocorre durante a reentrada (capinas, manutenção das plantações e colheitas) (FARIA *et al*, 2004; FLACK *et al*, 2008). Porém, em ambos os modos, a exposição pode ocorrer por meio das vias digestiva, respiratória, dérmica ou por contato ocular (THUNDIYIL *et al*, 2008).

Além disso, a escassez de instrução ou falta de recursos dos trabalhadores rurais os leva ao não seguimento das regras de segurança e de saúde, levando a utilização de quantidades excessivas de pesticidas e a ausência do uso de equipamentos de proteção individual (EPI's), durante o manuseio dos agrotóxicos (ANVISA, 2006; DAMALAS & ABDOLLAHZADEH, 2016).

No estudo apresentado por KUYE e colaboradores (2007), no qual trabalhadores rurais foram questionados com relação a toxicidade dos agrotóxicos, 80% dos entrevistados responderam que acreditavam que a inalação era o maior fator de toxicidade/via de exposição para os pesticidas e que, quanto mais forte é o odor do produto, mais tóxico ele é. Entretanto, a toxicidade dos agrotóxicos não apresenta relação com a intensidade do odor e nem todos os pesticidas possuem odor forte. Assim, esse pensamento equivocado pode levar à manipulação dos produtos sem os cuidados adequados, como a utilização dos EPIs, aumentando a exposição cutânea e suas

consequências à saúde (KUYE *et al.*, 2007). Outros trabalhos também apontam a via dérmica como a principal via de exposição, sendo esta significativamente maior do que a exposição pela via inalatória (MUTTRAY *et al.*, 2006; TÁCIO, OLIVEIRA, MACHADO, 2008; FENSKE *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2013; AN *et al.*, 2014; TSAKIRAKIS *et al.*, 2014; CAO *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2015).

Atrelado a isso, a experiência do trabalhador é apontada como um dos fatores que mais influenciam na exposição. De forma que os trabalhadores inexperientes se apresentam de 7 a 8 vezes mais expostos do que os trabalhadores experientes, realizando a atividade de aplicação nas mesmas condições ambientais e de trabalho (GAO *et al.*, 2013). Em igual modo, a técnica de pulverização e o comportamento do operador, apresentam papel fundamental na exposição dérmica, uma vez que operadores que andam para frente, dentro da nuvem de agrotóxicos recém aplicada, apresentam média geométrica de exposição dérmica consideravelmente maior do que os operadores que andam para trás, não sendo atingidos pela nuvem de agrotóxicos (MUTTRAY *et al.*, 2006; MACHERA *et al.*, 2009; TSAKIRAKIS *et al.*, 2011; CAO *et al.*, 2015).

Fatores, ainda, como as condições climáticas, a velocidade e direção do vento, a temperatura, a umidade (FLACK *et al.*, 2008), (BAHARUDDIN *et al.*, 2011), (GAO *et al.*, 2013); o volume pulverizado, o tempo de aplicação (MACHERA *et al.*, 2009), (TSAKIRAKIS *et al.*, 2011), (GAO *et al.*, 2013); o tipo e a forma de uso de EPI (MUTTRAY *et al.*, 2006), (BAHARUDDIN *et al.*, 2011), (FLACK *et al.*, 2008); a formulação do pesticida (GAO *et al.*, 2013); a densidade e a superfície da folhagem (CAO *et al.*, 2015); o tipo do pesticida e a sua concentração aplicada (AN *et al.*, 2014) podem interferir na exposição aos agrotóxicos.

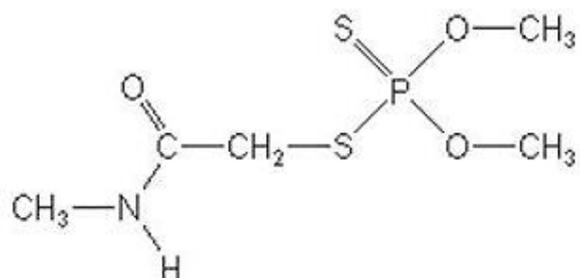
Em contrapartida, à medida que procedimentos de proteção são adotados e as regras de segurança obedecidas, a exposição individual torna-se menor e conseqüentemente ocorre a diminuição da incidência de intoxicações e da gravidade dos efeitos adversos para a saúde (DELGADO & PAUMGARTTEN, 2004; TSAKIRAKIS *et al.*, 2014; DAMALAS & ABDOLLAHZADEH, 2016).

3.1.3 Dimetoato

O dimetoato (figura 01), que é um dos inseticidas e acaricidas mais importantes da classe dos organofosforados, teve seu uso introduzido em 1956 e desde então, tem sido utilizado em todo o mundo. Seu espectro de ação abrange uma ampla variedade de insetos

como pulgões, gafanhotos e moscas domésticas, bem como ácaros (IPCS, 1989). No Brasil seu uso é regulamentado para aplicação foliar e em solo, nas culturas de algodão, citros, maçã, rosa, tomate e trigo (ANVISA, 2020).

Figura 01 - Estrutura química do dimetoato.



Fonte: Universidade de Hertfordshire, 2020.

Denominado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) como O,O-dimetil S-metil-carbamoil-metil-fosforoditioato possui fórmula molecular $C_5H_{12}NO_3PS_2$, CAS 60-51-5 e massa molecular de 229,26g/mol. Apresenta-se na forma sólido cristalino incolor com um odor semelhante à cânfora e normalmente é comercializado como concentrado emulsionável. Possui faixa de fusão entre 45 a 52,5°C, solubilidade em água de 2,08 mg/mL, log P 1,21 e pKa 15,93, além de ser estável em água, em solução ácida e instável em solução alcalina (FAO, 2004; THE TOXIN AND TOXIN TARGET DATABASE, 2019; WHO, 2004). Pertence a classe toxicológica II, sendo considerado altamente tóxico (ANVISA, 2020).

Em relação à absorção, dimetoato é bem absorvido pela pele, trato respiratório e trato gastrointestinal, condição muitas vezes favorecida pelos solventes utilizados nas formulações bem como pelas temperaturas elevadas ou pela presença de lesões, no caso da absorção cutânea (SEIZI, CAMARGO, BATISTUZZO, 2014). Por meio do intestino, sua absorção é rápida e extensiva sendo eliminado rapidamente pela via renal já que estudos demonstram seu aparecimento na urina no período de 24h, não existindo evidências de acúmulo no tecido adiposo. Além disso, quatro metabólitos com atividade anticolinesterase foram identificados em ratos e humanos e parecem resultar da oxidação tiona, levando à formação do análogo de oxigênio do dimetoato, o ometoato (maior toxicidade em relação ao dimetoato). Esta etapa é seguida por hidrólise para um produto tiocarboxil, considerado o principal metabólito em ratos e humanos (FAO & WHO, 1997).

O mecanismo de toxicidade primário do dimetoato pode ocorrer por meio da inibição de duas enzimas: a primeira encontrada nas junções sinápticas e nas hemácias é a acetilcolinesterase (AChE), e a segunda encontrada no sangue é a butirilcolinesterase, também conhecida como pseudocolinesterase (PChE) ou colinesterase plasmática. Essas enzimas são responsáveis pela quebra da acetilcolina, e uma vez o dimetoato ligado a AChE ocorre o acúmulo dessa substância nos receptores muscarínicos, nos receptores nicotínicos e no sistema nervoso central (SNC). A ligação entre o dimetoato e a AChE rapidamente se transforma em covalente, gerando a inibição irreversível da enzima e assim, prolongando seus efeitos tóxicos (OLSON, 2014).

A exposição aguda ao dimetoato, bem como a outros organofosforados, pode levar ao aparecimento da síndrome colinérgica caracterizada por náuseas, vômito, salivação excessiva, sudorese, bradicardia, hipotensão, colapso e convulsões. Caso ocorra o acúmulo de acetilcolina nos nervos motores e conseqüente superestimulação da expressão nicotínica, sintomas como fraqueza muscular, fadiga, fasciculação e paralisia também podem ser observados. Quando a superestimulação é no sistema nervoso central, sintomas como ansiedade, dor de cabeça, convulsões, ataxia, depressão respiratória, tremor, fraqueza geral e potencial coma, podem ser percebidos. Na superestimulação muscarínica, os sintomas são distúrbios visuais, aperto no peito, sibilos devido à broncoconstrição, aumento das secreções brônquicas, aumento da salivação, lacrimação, sudorese, peristaltismo acelerado e micção involuntária (FAO, 2004; THE TOXIN AND TOXIN TARGET DATABASE, 2019).

O dimetoato pode ainda, causar danos testiculares, alteração na produção de espermatozoides e redução dos níveis de testosterona em ratos adultos. Bem como a diminuição das concentrações de tiroxina e alterações no metabolismo da tireóide em mamíferos. Além de poder causar a diminuição da adrenal e da hipófise também em ratos adultos (SAYIM, 2007).

3.1.4 Região do Vale do São Francisco

A zona do semi-árido, composta por cerca de 900 municípios pertencentes ao Distrito Federal e aos estados de Minas Gerais, Bahia, Goiás, Pernambuco, Sergipe e Alagoas é conhecida como Vale do São Francisco. A região apresenta características de pluviosidade baixa e irregular (concentrada num período de 3 a 5 meses), temperaturas altas e elevadas taxas de evapotranspiração. O solo da região é originado de rochas

crystalinas, predominantemente rasas, pouco permeáveis e naturalmente férteis (EMBRAPA, 2020).

Desta forma, o Vale do São Francisco apresenta-se como uma extensa área com potencial irrigado e divide-se em quatro regiões fisiográficas: Alto, Médio, Submédio e Baixo São Francisco (CODEVASF, 2020). A região, que contempla as cidades de Petrolina em Pernambuco e Juazeiro na Bahia, localizadas no Submédio, possui aproximadamente 120 mil hectares irrigados e constitui uma das principais áreas de exportação da hortifruticultura do Brasil (MAPA, 2019).

O Município de Petrolina, um dos principais centros do submédio, encontra-se a aproximadamente 700 km de Recife e possui uma população de 293.962 habitantes, sendo a população residente em área rural um total de 74.747 habitantes representado 25,42% da população da cidade (Censo, 2010).

Deste modo, considerando que o agronegócio em Petrolina é a forma de desenvolvimento econômico de sua população, diversos são risco para a saúde do trabalhador local, devido a suas condições de trabalho na zona rural do município (ABRASCO, 2015).

3.2. MÉTODOS ALTERNATIVOS

Desde a Grécia antiga, Hipócrates (450 a.C.), conhecido como “pai da medicina”, já praticava a experimentação para comparar os aspectos de órgãos humanos doentes com os de animais sadios. De semelhante modo, a fim de verificar a anatomia e a fisiologia, alguns anatomistas como Herophilus (330-250 a.C.) e Erasistratus (305-240 a.C.), realizavam vivissecções em modelos animais. Já Aristóteles (384-322 a.C.), estabelecia uma hierarquia natural na qual os seres com menor capacidade de raciocínio deveriam beneficiar aqueles considerados mais racionais, realizando desta forma experimentos comparativos entre órgãos humanos e os órgãos animais. Do mesmo modo, muito outros cientistas, como Galeno (131-201 d.C.), Vesalius, William Harvey, René Réaumur e Stephen Hales seguiram, contribuindo de forma importante com a experimentação animal (MIZIARA *et al.*, 2012).

Porém, o ato de realizar intervenções em animais vivos ou recém-abatidos visando o benefício do conhecimento científico, ainda que desenvolvido desde a antiguidade, é capaz de ferir a sensibilidade humana e de estimular a discussão entre a comunidade acadêmica e a sociedade protetora dos animais (RUSSELL & BURCH, 1959).

Nesse contexto, apenas no início do século XX, a Associação Médica Americana realizou a sua primeira publicação relacionada aos aspectos éticos da experimentação animal (MIZIARA *et al.*, 2012). E mais tarde, em 1959 com a publicação do livro intitulado, *Os princípios da técnica experimental humana - "The Principles of Humane Experimental Technique"* - pelo zoologista William M.S. Russell e pelo microbiologista Rex L. Burch foi estabelecido o princípio dos três "R" da pesquisa em animais: *replace*, *reduce* e *refine* (substituir, reduzir e refinar), dando um grande passo ao estabelecimento da ética na pesquisa com animais (RUSSELL & BURCH, 1959).

Assim, o primeiro R (*Replace*) preconiza substituir a utilização de animais vertebrados por outros métodos apropriados, como experimentos simulados, modelos matemáticos ou mesmo por formas de vida filogeneticamente mais primitivas, como plantas e micro-organismos. O segundo R (*Reduce*) indica a redução do número de animais utilizados, para o alcance dos objetivos propostos com a prática experimental, somado a um tratamento estatístico de maior qualidade e por último o terceiro R (*Refine*) indica o refinamento das técnicas utilizadas com o objetivo de diminuir a dor e o sofrimento causado aos animais oferecendo-lhes o maior conforto possível (MIRANDA *et al.*, 2011; RUSSELL & BURCH, 1959).

Por semelhante modo, em 1978, durante evento realizado em Bruxelas, a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO), firmou a *Declaração Universal dos Direitos dos Animais*, levando a sociedade a debater, de forma ainda mais intensa, a necessidade da experimentação animal (UNESCO, 1978).

No Brasil, após tornar-se evidente a carência por uma regulamentação que eliminasse os atos de crueldade em animais, a Lei 6.638, de 8 de maio de 1979 foi publicada permitindo que as instituições de ensino superior realizassem pesquisas com experimentação animal, desde que esses não fossem mantidos em condições que lhes causassem sofrimento (BRASIL, 1979).

Atualmente, a Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, também conhecida como lei Arouca, estabelece os procedimentos para o uso científico de animais no país. Somada a tal publicação, foram criadas ainda as comissões de ética para uso de animais (CEUA) em instituições de pesquisa, bem como o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que possui como principal função a regulamentação de todas as discussões referentes à criação e ao uso de animais em laboratórios científicos (BRASIL, 2008).

Em julho de 2009, com Decreto nº 6.899, os métodos alternativos foram considerados no Brasil, procedimentos validados e internacionalmente aceitos. Uma vez que garantem resultados semelhantes e reprodutíveis para atingir a mesma meta dos procedimentos que substituem por metodologias que, não utilizem animais, usem espécies de ordens inferiores, empreguem menor número de animais, utilizem sistemas orgânicos *ex vivo* ou diminuam/eliminam o seu desconforto (BRASIL, 2009).

Por conseguinte, através da portaria 491 de 03 de Julho de 2012, foi estabelecida pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC) a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA). Essa que é composta por duas categorias de laboratórios, os centrais e os associados, permitiu a existência de uma infraestrutura laboratorial e de recursos humanos especializados capazes de implantar métodos alternativos ao uso de animais e de desenvolver e validar novos métodos no Brasil (BRASIL, 2012). Neste contexto, vale salientar que o NUDFAC, laboratório de realização do referido estudo, faz parte da RENAMA na qualidade de laboratório associado.

No ano de 2013 foi criado oficialmente o Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (*BraCVAM, Brazilian Center for Validation of Alternative Methods*) através de Portaria da Direção do Instituto Nacional Controle Qualidade em Saúde (INCQS) (FIOCRUZ, 2020). Em 2014, o CONCEA, por meio da Resolução Normativa Nº18 reconheceu dezessete métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil (BRASIL, 2014) e em 2016, por meio da Resolução Normativa Nº 31 reconheceu outros sete métodos alternativos (BRASIL, 2016). Já por meio da Portaria 3.586 de 30 de junho de 2017, renovou a Rede Nacional de Métodos Alternativos – RENAMA (BRASIL, 2017). Entre os métodos alternativos aprovados e validados estão os ensaios de permeação *in vitro*.

3.2.1 Permeações utilizando pele/mucosa bucal suína e mucosa ocular bovina

A exposição a produtos químicos pode ocorrer, além de outras vias, através das rotas: oral, inalatória, oftálmica e dérmica. Em contextos ocupacionais, as principais formas de exposição são através das três últimas vias citadas. Entretanto, devido a melhorias tecnológicas, a exposição através da via inalatória tem diminuído e conseqüentemente, a rota dérmica e a rota por mucosa ocular têm sido consideradas as principais vias de exposição ocupacional a agrotóxicos e a produtos químicos industriais (OECD, 427; INCA, 2010). Nestas circunstâncias, existem duas formas de se avaliar a

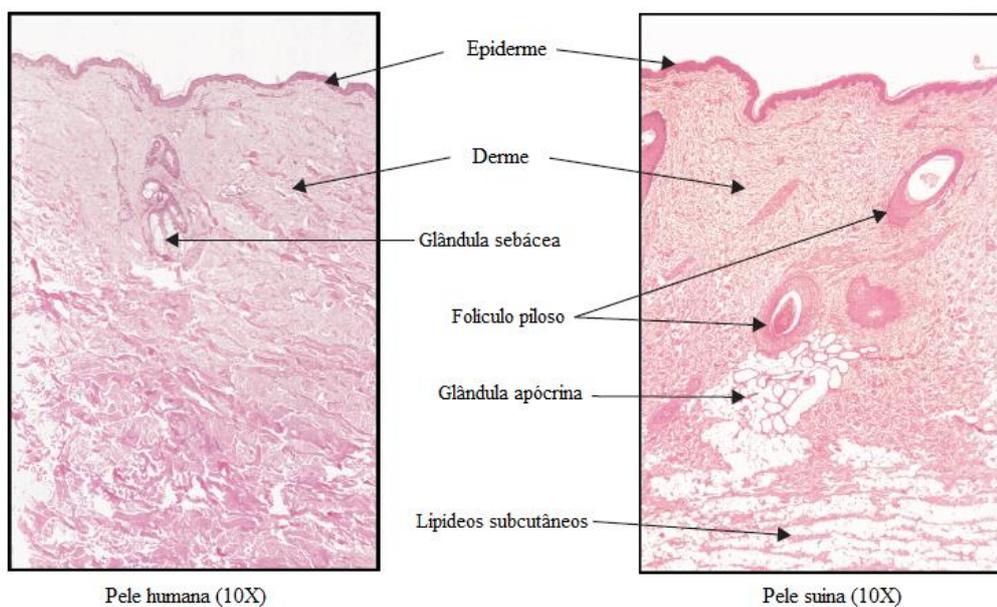
passagem dérmica, que são os ensaios *in vivo* e os ensaios *in vitro* (OECD, 2004). Porém, pouco se sabe a respeito da permeação desses compostos através da via oftálmica.

Os estudos de permeação da pele que tradicionalmente, desempenham um papel essencial na seleção de medicamentos para a aplicação tópica ou transdérmica, tem se tornado uma importante forma de avaliação da exposição ocupacional a agrotóxicos e a outras substâncias químicas. Desta maneira, a escolha do modelo preditivo de permeação *in vitro* é de suma importância (OECD, 2004; SCHMOOK, MEINGASSNER, BILLICH, 2001; FREDERIKSEN, 2018). Idealmente, usar-se-ia pele humana proveniente de descartes cirúrgicos para esta avaliação. No entanto, espécimes de pele humana de tamanho e qualidade suficientes para experimentos de permeação não são facilmente acessíveis e na grande maioria das vezes, não estão disponíveis em quantidades suficientes, para os pesquisadores (SCHMOOK, MEINGASSNER, BILLICH, 2001; FREDERIKSEN, 2018).

Assim, embora a pele animal e a pele humana não tenham as propriedades de permeabilidade idênticas, alguns modelos animais como os de roedores, de primatas e de suínos apresentam semelhanças significativas em relação à espessura da epiderme, à composição lipídica, as características morfológicas e fisiológicas e entre a permeabilidade aos diferentes compostos (GODIN & TOUITOU, 2007; FRIEND, 1992; SEKKAT *et al.* 2002; SONGKRO *et al.*, 2003).

Deste modo, dentre os modelos animais, o que mais se assemelha a pele humana é a pele de porco (figura 02). Sendo, os parâmetros biofísicos tais como a difusividade e o coeficiente de permeabilidade da água através da pele do porco *in vitro* e da pele humana *in vivo* correlacionáveis (SONGKRO *et al.*, 2003), além de apresentar o estrato córneo mais semelhante ao estrato córneo humano, em termos de composição lipídica. Ademais, a pele de porco é facilmente obtida a partir de matadouros e suas propriedades bioquímicas e histológicas foram repetidamente demonstradas como semelhantes à pele humana (CILURZO, MINGHETTI, SINICO, 2007; GODIN & TOUITOU, 2007).

Figura 02 - Comparação histológica entre a pele suína e a humana.



Fonte: adaptado de Sullivan *et al.* (2001).

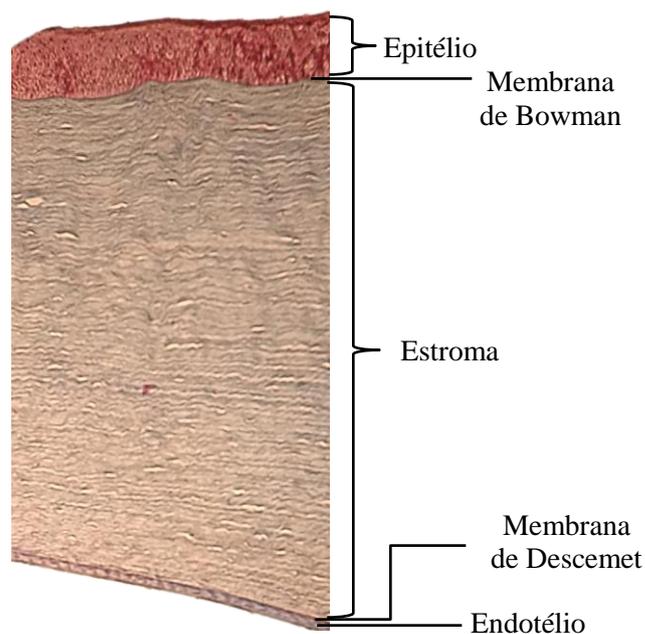
Em relação aos olhos bovinos, além de também serem facilmente obtidos em matadouros, são utilizados há anos para demonstrações laboratoriais em anatomia comparada, exercícios de biologia, fisiologia ou bioquímica para estudantes, bem como para exercícios de dissecação, para o treinamento de técnicas oftalmológicas, além de sua utilização em métodos alternativos validados internacionalmente como o BCOP (DOUGHTY, PETROU, MACMILLAN, 1995). Outrossim, os olhos bovinos apresentam estruturas semelhantes aos olhos humanos, diferindo apenas em pequenas estruturas como a coróide modificada que permite a visão noturna para estes animais (CHERUVU & KOMPELLA, 2006).

Estudos demonstram que apesar da presença da coróide modificada, os olhos bovinos comportam-se de modo semelhante ao modelo suíno (escolha para ensaios comparativos às estruturas humanas) em relação ao transporte transescleral de solutos. Do mesmo modo, as espessuras das escleras na região equatorial apresentam-se também semelhantes (CHERUVU & KOMPELLA, 2006).

Nesse contexto, a córnea bovina é composta por cinco camadas: o epitélio, a membrana de Bowman, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (figura 03). Seu diâmetro é de cerca de 11,7 mm e sua espessura está entre 0,5 a 0,7 mm, sendo a córnea mais espessa no centro em relação ao limbo. A principal barreira que, normalmente, restringe a absorção de compostos pelos olhos, é o epitélio (espessura 50 a 90 μm), uma

vez que o estroma e endotélio, devido a suas naturezas aquosas, dificultam a permeação de compostos altamente lipofílicos (MUN *et al.*, 2014). De semelhante modo, a córnea humana apresenta sua estrutura composta pelo epitélio (50 μm), pela membrana de Bowman (10 μm a 15 μm), pelo estroma (500 μm), pela membrana de Descemet (2,2 nm - 4,5 nm) e pelo endotélio (densidade celular 400 células/ mm^2) (FRANCO, 2005).

Figura 03 - Estrutura da córnea bovina (Aumento de 10x).



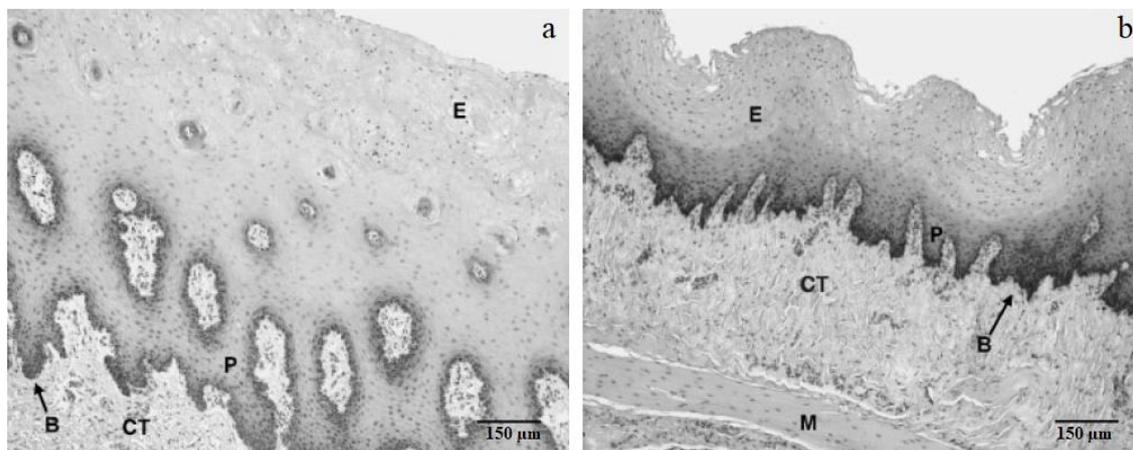
Fonte: autoria própria.

Nesse cenário, a avaliação da exposição através da via oral, mesmo ocorrendo em menor proporção, pode ser realizada por meio de estudos de permeação *in vitro* utilizando mucosas bucais. No caso da avaliação de medicamentos, os epitélios da bochecha e da língua de suínos são os substratos não queratinizados, mais utilizados para esta finalidade, uma vez que esses tecidos apresentam-se semelhantes às mucosas humanas em termos de barreira limitante à penetração de compostos, organização histológica, permeabilidade e composição lipídica (CONSUELO *et al.*, 2005; MONTAN *et al.*, 2015).

Porém, mesmo disponíveis em maior superfície, a separação da mucosa bucal do tecido subjacente é difícil e demorada, além de apresentar baixa qualidade devido aos danos causados pela mastigação. Desta forma, a mucosa esofágica suína tem sido proposta como uma alternativa ao uso de mucosas bucais. Pois, além de possuir uma maior superfície disponível aos estudos, apresenta uma extensão de trauma físico menor, fácil

preparo e, semelhante à mucosa bucal, é composta por epitélio escamoso estratificado não queratinizado (figura 04) (DEL CONSUELO *et al.*, 2005).

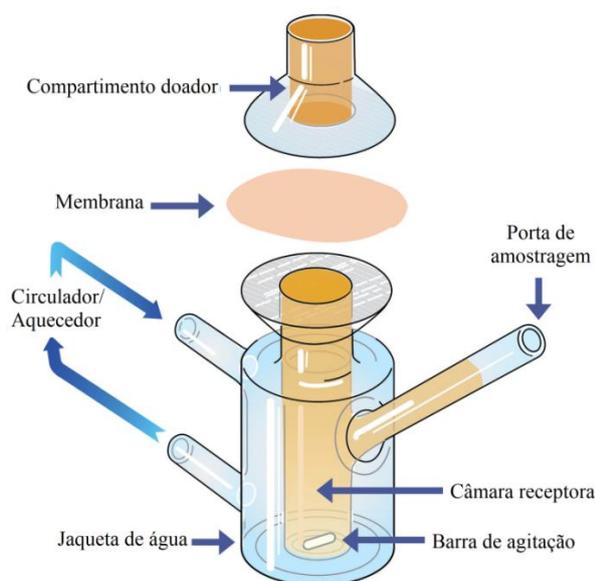
Figura 04 – Estrutura da mucosa suína bucal (a) e esofágica (b). **E**: epitélio escamoso estratificado; **B**: lâmina basal; **CT**: tecido conjuntivo; **P**: papilas; **M**: mucosas musculares; 100X.



Fonte: adaptado de DEL CONSUELO *et al.*, (2005).

Destarte, para a realização dos ensaios de avaliação da permeação *in vitro* mediante o uso de pele ou mucosa, são utilizadas, via de regra, células de difusão vertical, também conhecidas como células de Franz (figura 05). Uma célula de difusão, por sua vez, consiste em um compartimento doador e um compartimento receptor entre os quais a membrana natural é posicionada. Em torno dela, a célula deve fornecer uma vedação eficiente a visando permitir uma fácil amostragem, um completo contato entre a porção inferior da pele/mucosa e o líquido receptor, além do controle adequado de temperatura da célula e de seus componentes (OECD, 2004).

Figura 05 – Representação esquemática da célula de difusão vertical.



Fonte: adaptado de <https://permegear.com/franz-cells/> - acessado em 29/01/2020.

Desta forma, a seleção de um meio receptor adequado deve ser realizada buscando-se a escolha de um meio semelhante aos fluidos fisiológicos, embora outros também possam ser utilizados. A composição do meio deve demonstrar ainda, ser capaz de manter as condições *sink*, que precisam ser avaliadas para que, entre outros fatores, a concentração de saturação da substância química no meio receptor, não seja atingida durante o experimento. Para que essas condições sejam atendidas a concentração do fármaco deve ser 5 a 10 vezes menor do que a concentração de saturação do fármaco no meio receptor (COSTA, 2011). Além disso, o fluido receptor não deve alterar a integridade da membrana natural utilizada no estudo (OECD, 2004; COSTA, 2001).

Outro aspecto essencial para a realização dos testes de permeação *in vitro*, é o manuseio adequado da membrana natural. Para tanto, a integridade desta deve ser assegurada através de medidas como a perda de água transepidérmica (TEWL), o fluxo de água tritiado (TWF) ou a resistência elétrica (ER) são indicados (COSTA, 2001).

3.2.2 Teste de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP)

Descrito pela primeira vez por Gautheron em 1992, que se baseou em métodos originalmente descritos por Muir e Tchao (VERSTRAELEN *et al.*, 2013), o teste de opacidade e permeabilidade da córnea bovina (BCOP) é um modelo organotípico que fornece a manutenção em curto prazo, da função fisiológica e bioquímica normal da córnea

bovina *in vitro*. Assim, o dano causado à córnea pelo produto em teste é avaliado por meio das medidas quantitativas de alterações na opacidade e na permeabilidade à fluoresceína da córnea bovina com um opacitômetro e um espectrofotômetro de luz visível, respectivamente (OECD, 2013).

Entretanto, o BCOP apresenta algumas limitações que se baseiam nos falsos negativos (compostos como lauril sulfato de sódio e alguns álcoois de cadeia média) e nos falsos positivos (álcoois e cetonas) para certas classes químicas e físicas (GAUTHERON, 1992; ICCVAM, 2006).

Em 2009 foi aceito internacionalmente através da publicação do guia oficial TG 437 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), mas foi revisto e atualizado em 2013. O método possui uma precisão geral de 79% quando usado para classificar a categoria 1 do sistema globalmente harmonizado de classificação quando comparado ao teste de Draize. Entretanto, a perda de precisão foi associada às altas taxas de falsos positivos para álcoois, cetonas e materiais de teste sólidos, mas quando estes compostos são excluídos, a precisão do BCOP aumenta para 85% (OECD, 2009). Desta forma, o BCOP não é recomendado para à avaliação de produtos com baixo potencial irritante, uma vez que possui boa capacidade de predição apenas para produtos corrosivos ou com potencial irritante severo (OECD, 2013).

3.2.3 Ensaios em membrana cório-alantóide (HET-CAM/CAM-TBS)

Desde 1940, através de experimentos com animais de laboratório, o potencial irritante de diversos produtos e substâncias químicas, como cosméticos, medicamentos e agrotóxicos, tem sido avaliado. E neste sentido, por muito tempo, o teste em olhos de coelhos baseado no protocolo desenvolvido por Draize foi à única alternativa para se determinar o potencial de irritação ocular de uma substância (OCDE, 2012).

Entretanto, procedimentos severos que afetam diretamente os animais, como o teste de Draize, resultaram em críticas e discussões por parte de organizações não governamentais. E assim, os métodos alternativos ganharam força e vem sendo cada vez mais investigados como forma de minimizar tais conflitos e ampliar a segurança dos animais (WILSON, AHEARNE, HOPKINSON, 2015).

Por conseguinte, ao se considerar a redução, o refinamento e a substituição da experimentação animal é de suma importância reconhecer que os testes em ovos embrionados de galinha estão na “fronteira” entre os sistemas *in vivo* e *in vitro*. E, desta

forma, não conflitantes com os aspectos éticos e legais, especialmente em relação às leis de proteção animal (LUEPKE & KEMPER, 1986).

O ensaio de HET-CAM (*Hens Egg Test- Chorion Allantoide Membrane*) utiliza a membrana corioalantóide (CAM) de ovo de galinha da raça Leghorn fertilizado e incubado por 10 dias. A CAM é uma membrana altamente vascularizada, que envolve o embrião em desenvolvimento que é considerado insensível à dor (WILSON & STECK, 2000). À vista disso, este ensaio é apontado por alguns, como um substituto aceitável para o teste de irritação ocular de Draize revelando-se especialmente útil (LUEPKE & KEMPER, 1986).

Assim, de acordo com o protocolo geral, o ensaio tem início com a exposição da CAM seguida da aplicação do produto teste na sua superfície da membrana e de um enxágue. Após isso segue-se com a observação das alterações morfológicas da membrana que são avaliadas e registradas. A maioria dos protocolos observa o tempo em segundos, que uma substância leva para causar hemorragia, vasoconstrição e/ou coagulação dos vasos sanguíneos presentes na CAM. Em relação ao sistema de pontuação de irritação ele pode variar de acordo com o protocolo seguido (VINARDELL & MITJANS, 2008).

Já o ensaio CAM-TBS (*Chorionallantoic membrane – trypan blue staining*), que é uma modificação do HET-CAM, utiliza a adsorção do corante azul de tripan como um indicador de lesão da membrana corioalantóide apresentando uma boa correlação com o teste irritação ocular de Draize (HAGINO *et al.*, 1993).

Os ensaios utilizando membrana corioalantóide de ovo de galinha HET-CAM e CAM-TBS demonstram uma maior sensibilidade e capacidade de predição para substâncias ou produtos com baixo/nenhum potencial irritante (SCHEEL *et al.*, 2011). O método HET-CAM teve seu guia oficial TG 437 publicado em 2017 pela OECD (OECD, 2017) e o CAM-TBS teve seu guia oficial TG 460 publicado pela OECD em 2017 (OECD, 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSUMOS

O agrotóxico Dimetoato 500 EC[®] produto comercial foi obtido da Nortox, São Paulo, Brasil e utilizado para a realização dos experimentos, conforme as indicações de uso contidas na bula. Já o dimetoato adquirido da AccuStandard[®], Inc. New Haven, EUA, lote: 217011077, apresentando pureza de 100,0%, foi utilizado como substância química de referência. A água deionizada utilizada no estudo foi obtida em sistema de ultra purificação Purelab, Elga, EUA. Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico e as vidrarias previamente calibradas.

4.2 SELEÇÃO DO AGROTÓXICO

O agrotóxico avaliado no estudo foi selecionado de acordo com um levantamento bibliográfico realizado para a verificação dos agrotóxicos mais utilizados na região do Vale do São Francisco em Pernambuco, local onde foi realizado o estudo *in vivo* (ANINGER, 2018).

4.3 QUANTIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DO AGRÓTOXICO DIMETOATO

4.3.1 Desenvolvimento do método bioanalítico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) para quantificação das amostras de dimetoato

O método bioanalítico utilizado para a quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Shimadzu Corp. Kyoto, Japão) acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo AB Sciex-3200 (MDS-SCIEX, Toronto, Canadá) foi validado conforme a RDC nº 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA Brasil, 2003). Foram avaliados os parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), especificidade, seletividade, exatidão, precisão e efeito matriz.

4.3.1.1 Solução padrão

A solução estoque do dimetoato foi obtida pipetando-se o equivalente a 2.000 ng do padrão que foi transferido para tubo de ensaio onde, em seguida, foram adicionados 2 mL

de solução água: metanol (80:20). A solução foi homogeneizada com o auxílio de vortex, de modo a obter uma solução na concentração de 1000 ng/mL. A curva de calibração do dimetoato nas concentrações de 10, 40, 80, 100, 500, 700 e 1000 ng/mL foi preparada em uma solução de água: metanol (80:20) contendo estrato córneo para mimetizar as condições normais das amostras.

4.3.1.2 Preparo das amostras utilizadas na otimização cromatográfica e da fonte de ionização

As amostras utilizadas nos experimentos de otimização cromatográfica e da fonte de ionização foram preparadas diluindo-se a solução padrão até obter a concentração de 20 ng/mL do dimetoato. As amostras foram sempre preparadas imediatamente antes do início dos experimentos, colocadas em frascos para HPLC (1,5 mL) e analisadas.

4.3.1.3 Condições espectrométricas

A otimização das condições espectrométricas para a análise do dimetoato foi realizada através da adequação da fonte de ionização, da temperatura de dessolvatação do gás, da distância entre o capilar e o cone de extração e do fluxo de gás, entre outros aspectos relacionados ao processo de ionização que foram ajustados para maior sensibilidade ao método.

Para a otimização do monitoramento de reações múltiplas (MRM), a fim de maximizar o sinal e minimizar o ruído, aumentando a relação sinal/ruído avaliou-se a influência da velocidade de transmissão dos íons pelos quadropolos bem como a energia de colisão empregada para a fragmentação do íon precursor (dimetoato).

4.3.1.4 Condições cromatográficas

Em relação às condições cromatográficas, a fase móvel foi estabelecida a partir de variações das concentrações de cada componente para que estes proporcionassem melhor separação cromatográfica do dimetoato bem como simetria de pico no menor tempo de análise. O solvente orgânico metanol foi avaliado variando sua concentração entre 15 e 90% em água, em acetato de amônio 5mM e em tampão de formiato de amônio a 5mM. O ácido fórmico adicionado para aumentar a ionização foi fixado na concentração de 0,1%. O fluxo da fase móvel foi avaliado de 0,4 a 0,8 mL/min. Foram testadas ainda, duas colunas cromatográficas C18 de 3,5 μ m SunFire[®] 2,1 x 50 mm (Waters, EUA) e a C18 de 1,7 μ m ACQUITY[®] 2,1x 50 mm (Waters, EUA). O volume de injeção foi avaliado no intervalo de 2 a 20 μ L.

4.3.2 Procedimento de extração e preparo das amostras dos estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Para extração, tanto as fitas adesiva utilizadas para a remoção do estrato córneo do estudo *in vivo* quanto as do estudo *in vitro*, foram agrupadas em primeira e segunda (1-2) fitas adesivas removidas com EC e da terceira a quinta (3-5) fita adesiva removida com EC e o dimetoato foi então extraído por agitação (300 rpm) em uma mesa agitadora com 1 mL de solução água: metanol (80:20) em frascos fechados com capacidade para 1,5mL (eppendorfs[®]) por 15 min. Após agitação, as amostras foram sonicadas por 15 min. As amostras foram então filtradas com filtros de seringa de 0,45µm (Millipore[®]) e analisadas. Para extração do dimetoato da pele após a remoção das fitas (avaliação da retenção) e das córneas as amostras foram cortadas em seções menores com o auxílio de uma tesoura e seguiram o mesmo procedimento de extração realizado para as fitas adesivas, para as amostras de saliva, bem como para as amostras de algodão.

4.3.3 Processamento e Análise dos dados

Os dados foram obtidos utilizando software Analyst[®] 1.7 (Applied Biosystems, SCIEX, Toronto, Canadá) e processados através do software MultiQuant[®]3.0 (Applied Biosystems, SCIEX, Toronto, Canadá).

A análise estatística envolveu os testes t de Student bicaudais e o teste de Mann Whitney, os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4.4 ESTUDO IN VIVO

Os experimentos de absorção cutânea *in vivo* foram aprovados pelo Comitê de Ética e Deontologia de Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco - Pernambuco - Brasil, com número CAAE 55309516.4.0000.5196.

O estudo de caso avaliou três trabalhadores rurais (aplicadores de agrotóxico) na faixa etária de 30 a 40 anos, com peso e altura médios de 70 ± 2 kg e $1,68 \pm 0,03$ m, respectivamente, da cidade de Petrolina, Pernambuco, que fica na região do Vale de São Francisco, Brasil.

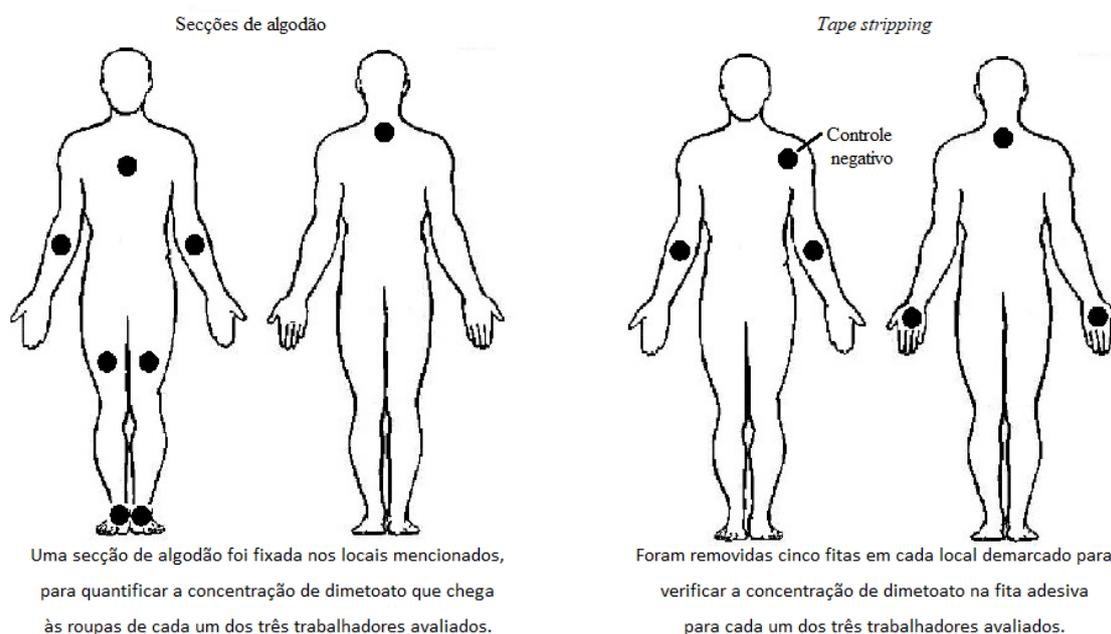
Uma diluição da concentração de 750 µg/mL da formulação de dimetoato foi preparada por cada um dos três trabalhadores, de acordo com as recomendações do fabricante para o uso do produto, adicionando 30mL do produto em 20L de água. O aparelho de aplicação utilizado foi a bomba de spray costal, conhecida popularmente como "mochila", onde cada trabalhador possuía sua própria bomba.

Cada trabalhador afirmou que estava vestindo suas roupas de trabalho habituais. Sendo o aplicador normalmente responsável pela aquisição e uso de roupas de proteção individual, cabendo a ele julgar se é adequado para o manuseio e aplicação do pesticida.

O trabalhador 01 usava roupas de proteção e segurança pessoal, conforme orientação do fabricante do produto dimetoato, composto por macacão de algodão impermeável, com mangas compridas sobre os punhos das luvas e pernas das calças sobre as botas; botas de borracha, avental impermeável, máscara combinada de filtro (filtro de vapor orgânico e filtro mecânico), óculos de segurança com proteção lateral; boné árabe (cobre o couro cabeludo e o pescoço, deixando apenas o rosto exposto) e luvas de nitrila. O trabalhador 02 estava vestido com uma camisa de algodão de mangas compridas, jeans, botas de borracha e chapéu. O trabalhador 03 vestia camisa de algodão de mangas curtas, jeans e sapatos fechados de material permeável.

A aplicação do dimetoato ocorreu durante o tempo de pulverização convencional (das 5h às 9h). O período total foi de 4 horas contínuas, equivalente a meia jornada de trabalho. Todas as aplicações foram feitas no mesmo dia em áreas adjacentes lateralmente (em 100m de cada) com a mesma temperatura, pressão, umidade, área e velocidade de vento (área de plantação de maçã/aproximadamente 1ha). O estudo foi realizado utilizando-se duas abordagens diferentes para cada trabalhador: 1) uma secção de algodão (1mm de espessura) (Cremer[®], Brasil), imitando uma peça de roupa, foi fixada sobre papel alumínio e em seguida fixado nas roupas do trabalhador, em diferentes regiões com área exposta específica (100cm²) para investigar a exposição/absorção dérmica do dimetoato; 2) para a segunda abordagem, a quantificação do EC foi realizada pela técnica de *tape-stripping*, conforme a figura 06, para avaliar a absorção dérmica do dimetoato.

Figura 06 - Locais em que as amostras foram coletadas com secções de algodão e com as fitas adesivas para avaliar a distribuição do pesticida dimetoato.



Fonte: autoria própria.

Trinta minutos antes do início da aplicação do pesticida, uma fita adesiva foi utilizada para remover uma amostra de EC na área de controle negativo para cada um dos três trabalhadores com a finalidade de garantir que nenhum produto havia entrado em contato com os trabalhadores antes do momento da aplicação. As secções de algodão foram aderidas aos locais específicos de vestuário de cada trabalhador depois que a mistura de pesticidas foi colocada na bomba de pulverização e imediatamente antes do início da pulverização. Ao final da aplicação do pesticida, para cada trabalhador, todas as amostras de algodão foram cuidadosamente removidas e armazenadas, após as quais o dimetoato foi extraído e analisado. Após esse estágio, a remoção do EC foi realizada em locais específicos, após a limpeza das áreas a serem amostradas com dois *swab* de álcool isopropílico 70% (Biosoma®). Foi ainda realizada a coleta de saliva (cuspe em tubo de ensaio) no início e final da aplicação, visando avaliar uma possível presença de dimetoato na saliva dos mesmos.

Cinco moldes (4cm²) com área exposta de 1,77cm² foram confeccionados e aplicados em locais específicos. Utilizou-se um número reduzido de fitas (apenas 5) quando comparado ao número (de até 30) normalmente aplicados em estudos com *tape stripping* para avaliação de medicamentos em humanos (CORDERY *et al.*, 2017) com o

objetivo de minimizar possíveis danos causados pelo agrotóxico ao trabalhador rural. Cada fita foi removida sequencialmente e armazenada, bem com os *swabs* (Biosoma®) utilizados na limpeza das áreas e as amostras de saliva coletadas. Posteriormente, o dimetoato foi extraído e analisado pelo método analítico desenvolvido no estudo.

O potencial de exposição dermal do dimetoato foi calculado de acordo com o guia da OECD de 1997 para o método de adesivos (OECD, 1997). Resumidamente, o valor de dimetoato $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ foi multiplicado pelas áreas corporais regionais correspondentes para chegar à $\mu\text{g}/\text{região}$ corporal. Então, a exposição dérmica potencial total foi calculada somando os dados com base nas secções de algodão.

Depois disso, de acordo com a OMS, 1982, o percentual de dose tóxica foi calculado pela equação 1 (OMS, 1982):

$$[\text{Equação 1}] \quad \frac{\text{Exposição dermal (mg.h}^{-1}) + \text{Exposição respiratória (mg.h}^{-1}) \times 10}{\text{Dérmica LD50 (mg.kg}^{-1}) \times 70} \times 100$$

O fator de penetração (FP) do dimetoato no EC foi estimado usando o cálculo descrito para o método de corpo inteiro no guia da OECD de 1997 (modificado). A equação 2, descrita abaixo, foi utilizada para avaliar o dimetoato medido na parte de trás do pescoço, no braço, em algodão e no EC:

$$[\text{Equação 2}] \quad \text{Fator de penetração (PF)} = \frac{\text{Dimetoato na fita}}{\text{Dimetoato algodão} + \text{Dimetoato fita}} \times 100$$

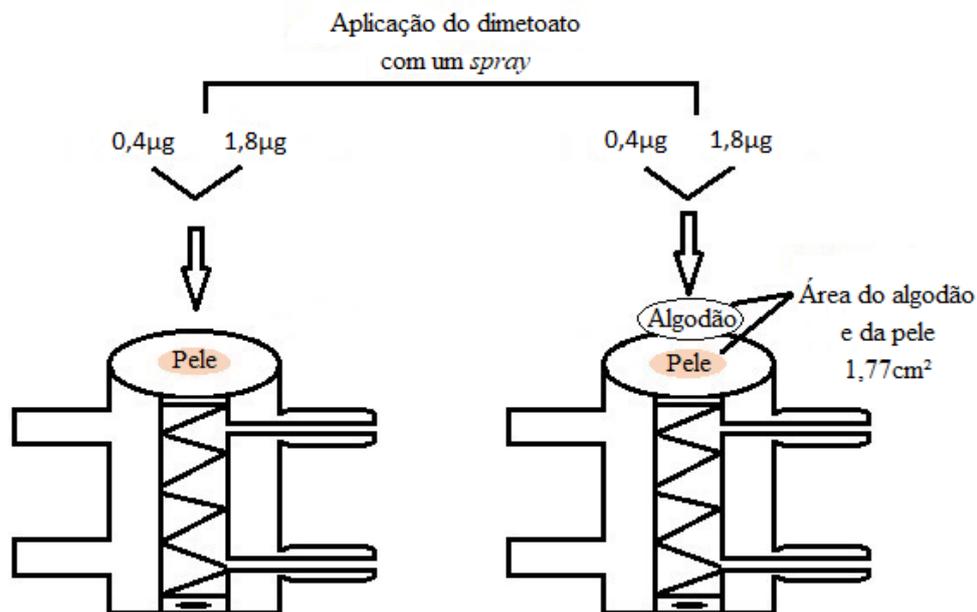
Para selecionar as quantidades de dimetoato a serem usadas no estudo *in vitro*, dois cálculos foram feitos: a) o da quantidade média aproximada de pesticidas (ng/cm^2) nas secções de algodão fixadas nas roupas dos três trabalhadores, independente do local de amostragem no corpo; b) o da maior quantidade aproximada de pesticida encontrada nas amostras de fita (ng/cm^2), independente do local de amostragem no corpo dos trabalhadores.

4.5 ESTUDO *IN VITRO* UTILIZANDO PELE SUÍNA

Para reproduzir a realidade vivida pelos trabalhadores rurais, o estudo *in vitro* foi realizado utilizando células de Franz para a avaliação de duas situações: 1) as soluções de pesticidas foram pulverizadas diretamente sobre a pele do porco e 2) as soluções de

pesticidas foram pulverizadas em uma secção de algodão para imitar a "roupa", que foi colocada sobre pele do porco, como mostrado na figura 07.

Figura 07 - Concentrações aplicadas no estudo *in vitro* em células de difusão vertical.



Fonte: autoria própria.

Conforme descrito anteriormente, com base na média e na quantidade mais alta de dimetoato encontrada no estudo *in vivo* (análise do algodão e do *tape-stripping* respectivamente), as quantidades aplicadas foram 226 ng/cm^2 ($0,4\mu\text{g}$) e $1,017\text{ng/cm}^2$ ($1,8\mu\text{g}$). As soluções aquosas do dimetoato (2 e $9 \mu\text{g/mL}$) foram preparadas de acordo com as informações contidas na bula do produto. Um aplicador de spray para mãos (DREX[®], Brasil) com capacidade de 10 mL foi utilizado para a aplicação das soluções. Cada jato de *spray* continha o volume $100 \mu\text{L}$. A altura da aplicação foi padronizada a uma distância de $2,0\text{cm}$ entre o bocal de pulverização e a pele ou o algodão. Tais medidas foram adotadas para minimizar a perda da solução aplicada na superfície interna do compartimento doador das células Franz. Para cada local, $200 \mu\text{L}$ de cada solução foram aplicados, para obter-se a quantidade desejada de aplicação.

Os experimentos de absorção cutânea *in vitro* foram realizados utilizando um sistema automático de células de difusão (Vision[®] Microette[™]) com volume de meio receptor de $6,0\text{mL}$ e área de $1,77 \text{ cm}^2$. A pele da região dorsal do porco obtida de um matadouro local (Paulista, Pernambuco, Brasil), foi lavada com água e qualquer pelo visível foi aparado com o auxílio de tesouras. Em seguida, a pele foi dermatomizada

(~750 μ m, Zimmer, EUA). Água destilada a pH 6,0 ($32\pm 1^\circ\text{C}$) foi utilizada como solução receptora, uma vez que não é possível usar tampão fosfato pH 7,4 ou qualquer outra solução contendo sal, para realizar a quantificação pelo equipamento analítico proposto no estudo. Esta solução foi amostrada em 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2; 2,5 e 4 h. Para o procedimento de *tape stripping*, um molde com área interna de 1,77 cm² foi utilizado para delimitar área a ser amostrada, bem como foram usadas 5 secções de fita adesiva (Scotch Book Tape, 3M Co., St. Paul, MN, USA) em sequencia para a remoção do estrato córneo, seguindo o protocolo do estudo *in vivo*.

A absorção total *in vitro* de dimetoato foi determinada, após as 4h de experimento (período equivalente a meia jornada de trabalho), como um somatório da quantidade de pesticida presente no EC obtido pelas fitas adesivas, no restante da epiderme/derme (retenção) e pela quantidade permeada. Para o experimento em que o ativo foi aplicado através das secções de algodão, o dimetoato também foi extraído do algodão, bem como dos *swabs* (Biosoma[®]) utilizados para a limpeza das áreas amostradas antes da coleta do EC utilizando as fitas adesivas e analisado de acordo com o método descrito. Já o fluxo (J) foi calculado no estado de equilíbrio a partir do coeficiente angular da equação da reta gerada pelo gráfico da quantidade permeada por área versus tempo. O coeficiente de permeabilidade (K_p) foi calculado, por sua vez, dividindo-se o valor do J no estado de equilíbrio pela concentração de dimetoato aplicada no compartimento doador (ÖZGÜNEY, *et al.*, 2006).

4.6 ESTUDOS *IN VITRO* E *EX VIVO* UTILIZANDO OLHOS BOVINOS E MUCOSAS SUINAS

4.6.1 Preparo da solução de dimetoato

Para o preparo da solução de dimetoato, pipetou-se 1 ml do produto comercial (Nortox[®]) em um balão volumétrico que teve seu menisco aferido para 100 mL após ser sonificado por 15 minutos. A solução emulsionada obtida possuía concentração de 5 mg/mL.

4.6.2 Transporte e armazenamento dos olhos bovinos e das mucosas suínas

Os olhos inteiros de boi e as mucosas suínas foram obtidas em um matadouro local (Paulista, Pernambuco - Brasil). Os olhos bovinos foram mantidos em cultura *Essential*

Average Eagle Medium (EMEM) (Sigma-Aldrich®) para manter a viabilidade do tecido por no máximo uma hora a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ até a córnea ser excisada ou usada por inteiro. Os olhos inteiros frescos também foram mantidos sob refrigeração ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), por 24h em um béquer de vidro contendo solução salina a 0,9% (Fresenius®), para avaliação da influência da temperatura de armazenamento na estrutura da mucosa e na permeação do agrotóxico.

As mucosas suínas, por sua vez, foram mantidas em solução salina (Fresenius®) a 0,9% por no máximo uma hora a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ para manutenção das características dos tecidos até o momento do uso. As mucosas sublinguais foram dermatomizadas na espessura de $250\mu\text{m}$ e mantidas em saliva artificial a $37\pm 1^\circ\text{C}$, até o momento do experimento. A mucosa esofágica foi higienizada com solução salina (Fresenius®) e mantida em saliva artificial a $37\pm 1^\circ\text{C}$, até o momento do experimento.

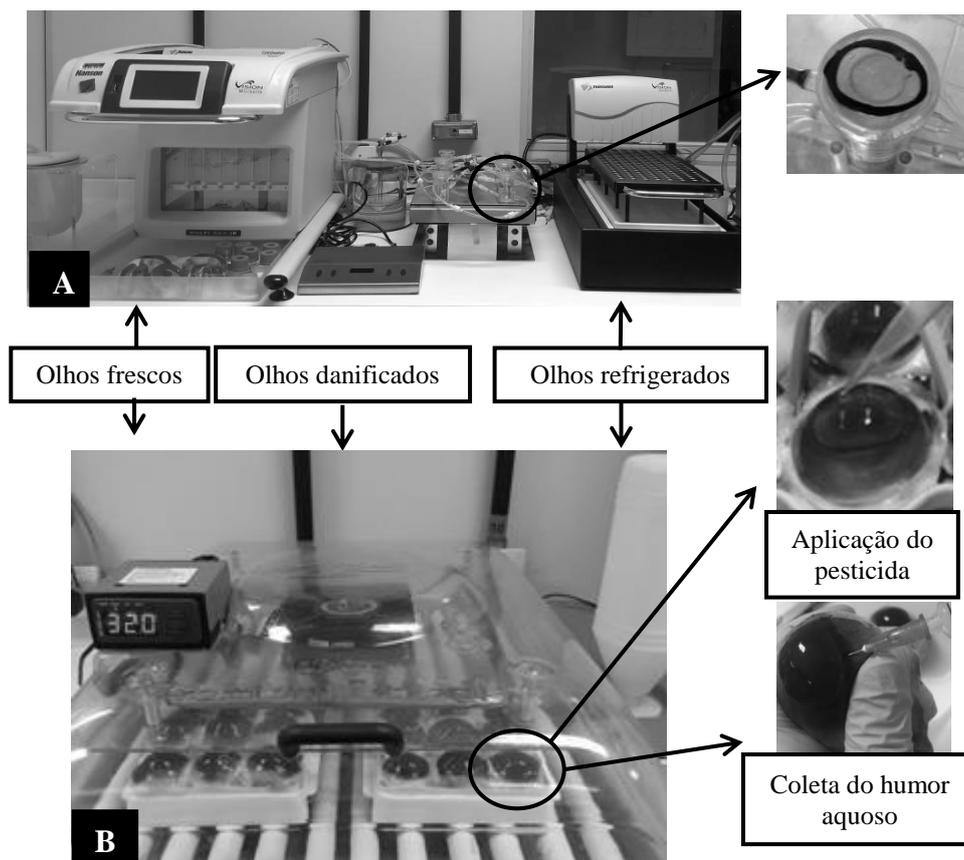
4.6.3 Olhos bovinos danificados para estudo de olhos inteiros

Após o transporte descrito acima, as córneas danificadas foram obtidas colocando-se olhos bovinos inteiros em contato com uma solução de hidróxido de sódio (Synth®) 0,1N por 10 minutos (OECD, 2013). Após esse tempo de contato, os olhos inteiros foram lavados com solução salina (Fresenius®) a 0,9% e utilizados para permeação *ex vivo* de agrotóxico.

4.6.4 Estudo de permeação *in vitro* utilizando córnea bovina excisada fresca e refrigerada por 24h

Os experimentos foram realizados utilizando um sistema automático de células de difusão vertical (Vision® Microette™) com volume de 6,0 mL de humor aquoso (obtido de olhos bovinos inteiros), utilizado como solução receptora e área de permeação de $1,77\text{ cm}^2$ (figura 08). O humor aquoso ($32\pm 1^\circ\text{C}$) foi amostrado em 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5 e 2h filtrado e analisado. A aplicação da solução de dimetoato foi realizada por gotejamento com o auxílio de uma pipeta automática. Os experimentos foram realizados em seis repetições para o volume aplicado ($50\mu\text{L}$ de solução de 5mg/mL). Ao final do experimento, o dimetoato contido nas córneas foi extraído e analisado. O fluxo e o coeficiente de permeabilidade foram calculados conforme descrito no item 5.4.

Figure 08 - Esboço do estudo *in vitro* (A) e do estudo *ex vivo* (B) utilizando olhos bovinos.



Fonte: autoria própria.

4.6.5 Estudo de permeação e retenção *in vitro* do dimetoato utilizando mucosa esofágica e sublingual frescas provenientes de suínos

Os experimentos foram realizados utilizando um sistema automático de células de difusão vertical (Vision[®] Microette[™]) seguindo a mesma metodologia descrita no item 5.6.4 modificando o líquido receptor (água destilada) e a temperatura de realização do experimento ($37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$).

4.6.6 Delineamento do estudo de permeação *ex vivo* utilizando olhos bovinos inteiros frescos, refrigerados por 24h e danificados

O delineamento da proposta de avaliação de permeação *ex vivo* utilizando olhos bovinos inteiros, seguiram conforme descrito abaixo.

Os olhos foram encaixados, um a um, nos espaços específicos de suportes de plástico de forma a manter as córneas voltadas para cima, e colocados em uma incubadora

de ovos (Premium eco-friendly IP 70D) com temperatura e umidade controladas de 32°C e 65 ± 2%, respectivamente, durante todo o experimento.

A solução de dimetoato foi gotejada na córnea bovina com o auxílio de uma pipeta automática (50µL de uma solução de 5mg/mL), sendo realizadas seis repetições para cada tempo avaliado (figura 08).

A cada tempo de coleta, (0,25; 0,50; 0,75; 1.0; 1,5 e 2 h), todo o humor aquoso de cada olho foi coletado com o auxílio de uma seringa (5 mL - Descarpack® com agulha 25x7mm) e quantificado posteriormente. Para cada tempo de contato, foram utilizados três olhos bovinos inteiros, frescos, refrigerados e danificados. No final do experimento, as córneas de todos os olhos foram excisadas e cortadas. O procedimento de extração e análise foi realizado conforme descrito no item 5.2.2.

4.6.7 Avaliação histológica das córneas bovinas

As amostras da córnea fresca, refrigerada por 24 horas e danificada por solução de hidróxido de sódio (Synth®) 0,1N por 10 minutos foram mantidas em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas e depois enxaguadas em água corrente. Elas foram posteriormente desidratadas em etanol na sequência ascendente de 70, 80, 90 e 100, diafanizados em xilol e embebidos em parafina histológica para obtenção dos cortes transversais de aproximadamente 5 µm. Estes foram corados com hematoxilina-eosina (HE). Imediatamente após os preparos, as córneas foram montadas em entellan®, observadas e foto micrografadas sob um microscópio (LABOMED LX 400-USA), com uma câmera digital QUIMIS do MOTICAM 1000 1.3M Pixel - USB 2.0, para captura e gravação das imagens (SANTOS *et al.*, 2014).

4.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade do agrotóxico dimetoato foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por SANTOS *et al.*, 2018. Foram avaliadas quatro concentrações diferentes de soluções de dimetoato: 750.000ng/mL, 250.000ng/mL, 125.000ng/mL e 62.500ng/mL.

4.7.1 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

O sangue (30 ml) de seis voluntários saudáveis (23 a 35 anos), sem doença infecciosa recente, imunossupressão e/ou doença autoimune, foi coletada em tubos de heparina (Vacuette[®]) para obter os PBMCs através de técnica de gradiente de concentração (Ficoll-Paque[™] Plus; GE Healthcare Life Sciences, Suécia). As células foram lavadas duas vezes com solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS 1X) e, após centrifugação (400g, 30 min, 20 °C), um anel de PBMCs foi obtido, coletado e as células foram contadas em uma câmara de Neubauer. A viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripam (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram utilizadas apenas quando a viabilidade foi > 98% (SANTOS *et al.*, 2018).

4.7.2 Cultura de linfócitos e estimulação *in vitro* com dimetoato

Os linfócitos foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementados com Soro fetal bovino a 10% (p/v) (Sigma-Aldrich[®]) em placas de 24 poços a uma densidade de 10⁶ células/poço. As células foram então tratadas com soluções de dimetoato nas concentrações 750.000ng/mL, 250.000ng/mL, 125.000ng/mL e 62.500ng/mL, esse estímulo foi mantido por 24 h. Os controles foram realizados utilizando células não tratadas em meio de cultura (SANTOS *et al.*, 2018).

4.7.3 Análise da viabilidade celular

As culturas de linfócitos tratadas com as soluções de dimetoato, bem como as células não tratadas foram centrifugadas a 450 x g a 4°C por 10 min. Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 1 ml de PBS 1X e as células foram centrifugadas novamente (450 x g, 4°C, 10 min). O sedimento foi ressuspenso em 300 µl de tampão de ligação (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e 1,8 mM CaCl₂), transferido para um tubo de citômetro marcado e incubado com anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína(FITC) (1: 500) e iodeto de propídio (PI, 20µg/ml). A citometria de fluxo foi realizada em um FACSCalibur plataforma e os resultados analisados usando o CellQuest Pro software (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). As células anexos-FITC negativo / PI positivo foram consideradas como necróticas

e as células Anexina-FITC positivas / PI negativas foram consideradas na fase inicial do apoptose. Os negativos duplos foram considerados células viáveis (SANTOS *et al.*, 2018).

4.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO E CORROSÃO OCULAR

A avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular do dimetoato foi realizada por três métodos alternativos ao teste *in vivo* ocular de Draize. Os testes utilizados foram: Teste de opacidade e permeabilidade da córnea bovina (BCOP), Teste de membrana corioalantóide de ovo de galinha (HET-CAM) e Teste de coloração com azul de Trypan (Sigma-Aldrich[®]). em membrana corioalantóide- (CAM-TBS). Como controles, a solução 0,1 N de hidróxido de sódio (Synth[®]) (NaOH - 0,1 N) e a solução salina (Fresenius[®]) a 0,9% p/v (NaCl 0,9% p/v) foram usadas como controle positivo e negativo. O pesticida comercial testado, dimetoato, foi diluído para uma concentração de 0,5 g/mL, de acordo com o rótulo do produto.

4.8.1 Teste de Permeabilidade e Opacidade da Córnea Bovina (BCOP)

Os testes foram realizados com olhos recém-excisados, de acordo com o protocolo TG 437 estabelecido pela OECD, 2013.

Após inspeção visual, para avaliação da integridade, as córneas foram cuidadosamente excisadas. Estas foram montadas em suportes de opacitômetro previamente calibrados, que tiveram suas câmeras preenchidas com meio EMEM (Sigma-Aldrich[®]) e foram incubadas por 1 hora a 32 ± 1 °C. A linha de base foi corrigida após a remoção do meio EMEM (Sigma-Aldrich[®]) usando o opacitômetro BASF-OP 3.0. Em seguida, as córneas foram expostas a 750µL de uma solução de dimetoato de 5.000 µL/mL por um período de 10 minutos. Após esse período, as córneas foram lavadas com EMEM (Sigma-Aldrich[®]) contendo vermelho de fenol e incubadas novamente a 32 ± 1 °C por 2 horas, após as quais a opacidade foi medida.

Para avaliação da permeabilidade, as córneas foram tratadas com 1mL de solução de fluoresceína de sódio (Sigma-Aldrich[®]) a 0,4% e incubadas a 32 ± 1 °C por 90 minutos. Após o período de incubação e exposição à fluoresceína (Sigma-Aldrich[®]), a densidade óptica a 490 nm (OD490) da solução EMEM (Sigma-Aldrich[®]) foi determinada na parte traseira da câmara. O valor da irritação *in vitro* (IVIS) foi calculado para cada grupo de tratamento usando a equação: $IVIS = \text{valor médio de opacidade} + (15 \times \text{valor médio de OD490 da permeabilidade})$ (OECD, 2013). De acordo com o protocolo OECG

TG 437, nenhuma previsão pode ser feita quando os valores de IVIS são abaixo de 55 e acima desse valor, todas as substâncias são classificadas como irritantes da categoria 1.

4.8.2 Teste de ovo de galinha - Membrana cório-alantóide (HET-CAM)

Para a avaliação do dimetoato, foram utilizados quatro ovos SPF (Specific Pathogen Free) fertilizados de galinhas Leghorn. Os ovos foram incubados a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com umidade relativa de $65 \pm 2\%$ durante um período de 10 dias 12. No décimo dia de incubação, a membrana da casca foi removida para que a membrana corioalantóide (CAM) fosse exposta, e o teste foi realizado conforme estabelecido pelo protocolo do Comitê de Coordenação Interinstitucional para Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM).

Com o auxílio de uma lente de aumento, foi realizada análise visual da CAM para verificar a integridade e adequação da membrana para a realização do teste. Em seguida, 300 μL da solução de dimetoato 5 mg/mL foram aplicados na superfície da CAM. Após 20 segundos de contato, a formulação foi removida usando solução salina (Fresenius[®]) a 0,9% p/v. A CAM foi observada por 5 minutos para determinar a ocorrência de efeitos irritantes nos vasos sanguíneos da CAM (lise vascular, sangramento e/ou coagulação) (ICCVAM, 2010). Os efeitos vasculares foram observados de acordo com os critérios descritos no método de teste Protocolo ICCVAM HET-CAM.

Para classificação do potencial irritante, as formulações foram classificadas de acordo com os seguintes parâmetros: 0 a 0,99 corresponde ao produto não irritante, 1,00 a 4,99 corresponde ao produto irritante leve, 5,00 a 8,99 corresponde a um produto irritante moderado (MI) e de 9.00 a 21.00 corresponde a um produto irritante grave (SI) (ICCVAM, 2006).

4.8.3 Teste Membrana cório-alantóide - Coloração com Azul de Trypan (CAM-TBS)

A fase inicial do teste foi semelhante ao teste da membrana corioalantóide do ovo da galinha (HET-CAM). Após a exposição ao CAM, 300 μL da formulação de dimetoato foram então aplicados à superfície do CAM em uma área previamente delimitada por um anel de silicone. Após 20 segundos, o pesticida foi removido com solução salina (Fresenius[®]) a 0,9% e foram adicionados 500 μL de uma solução a 0,1% de azul de trypan (Sigma-Aldrich[®]) em tampão fosfato de sódio (Sigma-Aldrich[®]) usado como indicador de possíveis lesões CAM. O excesso de corante foi removido por lavagem com água destilada

e a área CAM delimitada pelo anel de silicone foi removida com a ajuda de pinças e tesouras, colocadas em um tubo contendo 5 mL de formamida (Sigma-Aldrich®), depois submetidas a vórtice e centrifugadas (1500 g por 10 min).

A absorção do sobrenadante foi medida por espectrofotometria a 595 nm. A quantidade de azul de trypan (Sigma-Aldrich®) absorvida pela membrana corioalantóide foi calculada usando a equação: corante absorvido = absorbância \times 5nmol / 1000 \times 109. O produto testado foi classificado de acordo com os seguintes parâmetros: 0 a 6,99 corresponde a não irritante / levemente irritante (NI/LI), 7,00 a 14,50 corresponde a moderadamente irritante (como primário) e maior que 14,50 corresponde a irritante grave (IS) (LAGARTO, 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS) PARA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DIMETOATO

O método validado demonstrou ser seletivo e específico uma vez que não houve interferência de outros compostos no sinal do dimetoato, todos os interferentes apresentaram-se com sinal inferior a 20% da resposta do limite inferior de quantificação (LIQ) do método que é de 10ng/ml. As curvas de calibração, por sua vez construídas em cada uma das matrizes avaliadas apresentaram-se lineares e com coeficientes de determinação $r^2 \geq 0,9998$.

Em relação à precisão todos os coeficientes de variação (CV%) para o LIQ apresentaram-se inferiores a 20% dos valores nominais com faixa de variação de 18,5 - 19,7%, bem como os CV% das amostras do controle de qualidade de baixa concentração (CQB), do controle de qualidade de média concentração (CQM) e do controle de qualidade de alta concentração (CQA) com uma faixa de variação de 13,6-14,7% encontrando-se de acordo 15% menores ou iguais ao valor nominal. Para os valores de exatidão todos os valores de Erro Padrão Relativo (EPR) para o LIQ apresentaram na faixa de 86,4 – 114,2% (85-115% estabelecido pela legislação) e para o CQB, CQM e CQA na faixa de 84,5 – 119,7% (80-120% estabelecido pela legislação).

Em relação à capacidade de recuperação do método de extração, independente da matriz avaliada todos os percentuais de recuperação encontraram-se na faixa de 73,97-96,45%. O método não demonstrou sofrer influência das matrizes analisadas.

5.1.1 Condições espectrométricas

Os parâmetros da espectrometria de massas foram otimizados para que se obtivesse a máxima sensibilidade. Após a definição do fragmento mais intenso do dimetoato, o método de monitoramento de reações múltiplas (MRM) foi obtido, através da otimização automática disponibilizada pelo Analyst[®], assim como os valores para uma série de parâmetros, nominalmente, *declustering potencial* (DP), *entrance potencial* (EP), *collision energy* (CE), *cellexit potencial* (CXP), foram obtidos conforme mostrado na tabela 02.

Tabela 02 - Valores dos parâmetros do MS-MS obtidos através da otimização automática.

ID	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)	Tempo (mseg)
Dimetoato 1	230	125,00	61,00	10	29	4	337,5
Dimetoato 2	230	199,10	61,00	10	13	4	337,5

Assim, a ionização dos compostos foi realizada à pressão atmosférica por eletro pulverização no modo positivo e a transição de massas pelo monitoramento de múltiplas reações (MRM) para detecção de dimetoato foi de m/z 230 > 125.

5.1.2 Condições cromatográficas

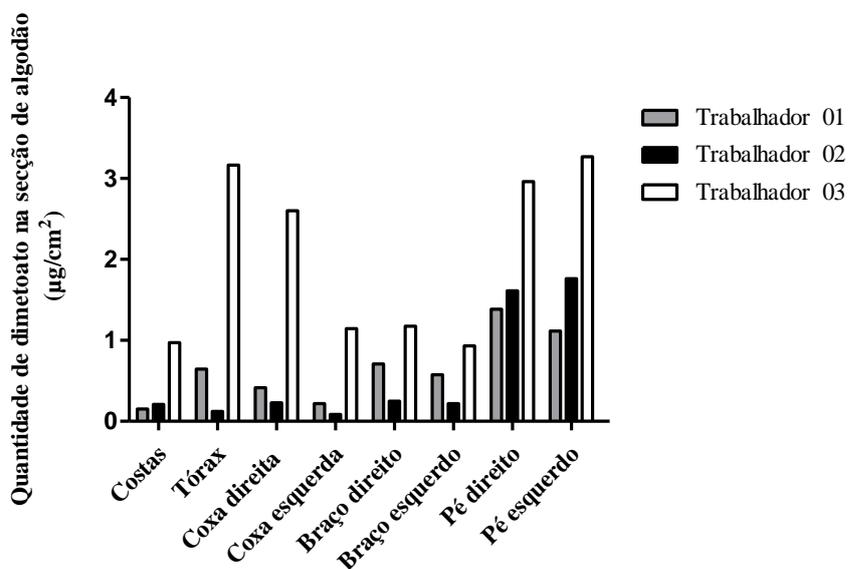
A coluna cromatográfica selecionada foi a C18 de 3,5 μ m SunFire 2,1 x 50 mm (Waters, EUA) e em uma pré-coluna C18 4 x 4 mm (5 μ m) a 40 ° C. A fase móvel foi uma mistura 90:10 de água + ácido fórmico a 0,1% e metanol + ácido fórmico a 0,1%; o fluxo foi de 0,8 mL/min, o volume de injeção 2 μ L e curva de calibração 10ng/mL-1000ng/mL. O tempo de retenção para o dimetoato foi de 1,6 minutos e a corrida analítica foi de 4,5 minutos.

5.2 ESTUDO *IN VIVO*

5.2.1 Estudo *in vivo* – Secções de algodão

A figura 09 mostra a quantidade de dimetoato (μ g/cm²) extraída de cada secção de algodão para cada trabalhador e local, respectivamente. Neste estudo, mesmo com as mesmas condições ambientais, as concentrações de dimetoato observadas foram muito diferentes na comparação entre os locais no corpo e entre os três trabalhadores, demonstrando os altos níveis e variabilidade das concentrações de agrotóxico aos quais os agricultores estão expostos.

Figura 09 - Quantidade de dimetoato ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) encontrada no retalho de algodão para os três locais e trabalhadores avaliados.



Em relação à agricultura familiar, a aplicação pode ser considerada a tarefa que proporciona maior exposição cutânea ao trabalhador, quando comparada às atividades de mistura e carregamento do pesticida (FLACK *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2015; LESMES-FABIAN *et al.*, 2012). Fatores ambientais, como condições climáticas, velocidade e direção do vento, temperatura e umidade, tipo de cultura, densidade e superfície da folhagem, tipo de pesticida, bem como a concentração aplicada, podem influenciar a exposição cutânea (FLACK *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2014; MACHERA *et al.*, 2009; TSAKIRAKIS *et al.*, 2011; MUTTRAY *et al.*, 2006; CAO *et al.*, 2015; An *et al.*, 2014; PINHEIRO & ADISSI, 2014) e, conseqüentemente, a absorção do pesticida.

Além do mencionado, estudos indicam que a técnica de pulverização e o comportamento do operador desempenham um papel fundamental na exposição cutânea. MACHERA *et al.* (2009) descobriram que, para o que aplicadores que caminham para a frente, dentro da nuvem de pulverização aplicada recentemente, a exposição cutânea foi consideravelmente superior ao resultado obtido para o operador que caminhou para trás, sem passar pela nuvem de pulverização (TSAKIRAKIS *et al.*, 2011; MUTTRAY *et al.*, 2006; CAO *et al.*, 2015; AN *et al.*, 2014; PINHEIRO & ADISSI, 2014; DURHAM & WOLFE, 1962).

Outro aspecto importante quando se trata de exposição aos agrotóxicos durante o trabalho rural é a lateralização, sugerindo a ocorrência de maior exposição ao produto em um lado do corpo (LESMES *et al.*, 2012; MACHERA *et al.*, 2009). De acordo com os

dados apresentados na figura 09, esse fenômeno foi observado nos braços e coxas direitos dos três trabalhadores em relação ao lado esquerdo, possivelmente pelo fato de todos os trabalhadores avaliados aqui serem destros.

A potencial exposição dérmica total do dimetoato e a porcentagem de dose tóxica por hora são demonstradas na tabela 03. A secção de algodão cobriu 5% da superfície corporal (TSAKIRAKIS *et al.*, 2011; BAHARUDDIN *et al.*, 2011). Neste método, assume-se que a distribuição do pesticida ocorra uniformemente por todas as áreas da superfície corporal e isso constitui sua principal desvantagem. No entanto, esse método é capaz de determinar a exposição dérmica a agrotóxicos, de forma custo-efetiva (DURHAM & WOLFE, 1962).

Tabela 03 - Exposição dos trabalhadores ao dimetoato durante a pulverização de maçãs.

Área amostrada	Dermal (mg/pessoa/h)	Respiratória (mg/pessoa/h)	Total (Porcentagem da dose tóxica por hora)*
Trabalhador 01	2,35	NE	0,009
Trabalhador 02	0,87	NE	0,003
Trabalhador 03	1,65	NE	0,006

* Calculado para o corpo de 70 kg com base no LD50 dérmico para rato (WHO, 1982).

NE - Não avaliado neste estudo.

A porcentagem de dose tóxica por hora obtida foi semelhante ao clortion, ao malation, ao gution e ao paration metílico (ANVISA, 2019); pesticidas com uso suspenso no Brasil (ELHALWAGY *et al.*, 2010). Isso provavelmente sugere que os riscos a que esses trabalhadores estão expostos sem o uso de equipamento de proteção adequado não são insignificantes, considerando a possibilidade de síndrome colinérgica, caracterizada principalmente por sudorese e salivação, secreção brônquica grave, broncoconstrição, miose, aumento da motilidade gastrointestinal, diarreia, tremores e espasmos musculares. Vale dizer que esses resultados (estudo de caso *in vivo*) não são suficientes para representar a população-alvo. No entanto, são suficientes para estabelecer os parâmetros para o estudo do pesticida *in vitro*.

5.2.2 Estudo *in vivo* - Quantificação no estrato córneo e na saliva

As concentrações de dimetoato encontradas no EC pelo procedimento de *tape stripping*, para os três trabalhadores avaliados, são apresentadas na tabela 04.

Tabela 04 - Dimetoato no EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por área amostrada para os três trabalhadores avaliados.

Área amostrada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Trabalhador 01	Trabalhador 02	Trabalhador 03
Parte de trás do pescoço	-	0,091	0,245
Braço direito	-	0,006	0,133
Braço esquerdo	-	0,004	0,065
Mão direita	-	0,100	0,073
Mão esquerda	-	0,073	0,045

O dimetoato não foi encontrado no EC do trabalhador 01 (o limite de detecção para o analito era de $1\text{ng}/\text{mL}$ ou $0,56\text{ ng}/\text{cm}^2$), possivelmente devido ao uso da roupa proteção adequada durante a aplicação do agrotóxico. O trabalhador 03 apresentou a maior concentração total (soma de todas as áreas analisadas) do agroquímico avaliado (mais de 3 vezes maior) em relação ao trabalhador 02, provavelmente demonstrando o impacto das roupas de proteção. Dessa forma, a falta de equipamento de proteção e o acúmulo de pesticidas nas roupas levaram a uma fonte potencialmente significativa de absorção dérmica de agrotóxico, que muitas vezes é desconhecida ou ignorada pelos trabalhadores, aumentando os riscos decorrentes da exposição, conforme descrito por BAHARUDDIN (2011) em que 79,7% dos trabalhadores disseram que não trocam de roupa após aplicar os agrotóxicos (BAHARUDDIN *et al.*, 2011).

Para o trabalhador 3, a maior concentração de dimetoato no EC foi observada na região posterior. A região costal é onde o dispositivo de aplicação mochila permanece em contato com o corpo do trabalhador durante todo o processo de pulverização do agrotóxico e onde qualquer vazamento entraria em contato com o trabalhador.

Em relação as amostras de saliva coletadas o dimetoato não foi encontrado para o trabalhador 01 (o limite de detecção para o analito era de $1\text{ng}/\text{mL}$ ou $0,56\text{ ng}/\text{cm}^2$). Para os trabalhadores 02 e 03 as concentrações encontradas foram de $47,83\text{ng}/\text{mL}$ e de $63,35\text{ng}/\text{mL}$ respectivamente.

Os resultados do fator de penetração do dimetoato no EC medidos na parte de trás do pescoço e no braço são mostrados na tabela 05.

Tabela 05 – FP de dimetoato no EC (%) analisado para os três trabalhadores avaliados.

Área amostrada	Trabalhador 01	Trabalhador 02	Trabalhador 03
Parte de trás do pescoço	0,00 %	48,32 %	54,03 %
Braços	0,00 %	0,48 %	28,93 %

Os fatores de penetração do dimetoato, encontrados por Protano, foram de 0,2% para o pescoço e 2,9% para os braços de trabalhadores vestidos com roupas que não

atendiam a todas as exigências de segurança (PROTANO *et al.*, 2009). Embora o cálculo da FP tenha sido estabelecido para o método de corpo inteiro e, neste estudo, tenha sido modificado pela substituição da análise interna do algodão pela análise do EC, esses dados corroboram o fato de que o uso incompleto, inadequado ou inexistente do equipamento de proteção gera uma quantidade maior de pesticida em contato com o corpo dos trabalhadores.

Sugerindo claramente que, em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde a maior parte da agricultura é familiar e embora o uso correto dos equipamentos de proteção individual seja obrigatório pela legislação, seu uso fica aquém do uso seguro, o que pode ser um dos motivos pelo aumento de problemas de saúde associados à exposição crônica, como o câncer (SILVA *et al.*, 2018; PARRÓN *et al.*, 2014; ALAVANJA *et al.*, 2004; WIKLUND *et al.*, 1989). Assim, por uma questão de urgência, é necessária uma discussão com a agência reguladora, visando maior controle da saúde desses trabalhadores.

5.3 ESTUDO *IN VITRO* UTILIZANDO PELE DE PORCO

Neste estudo *in vitro*, a absorção total de dimetoato no EC foi determinada após um teste de permeação de 4 horas. As tabelas 06 e 07 mostram, separadamente, a quantidade de pesticida recuperada no EC, no restante da epiderme + derme (retenção), e a quantidade permeada pela pele, após aplicação de 0,4 µg e 1,8 µg de dimetoato nas secções de algodão ou diretamente na pele, respectivamente.

As concentrações analisadas por *tape stripping* do EC neste estudo *in vitro* ($52,63 \pm 10,73$ e $135,15 \pm 31,80$ ng /cm²) mostraram uma estreita concordância com os resultados obtidos no estudo de caso *in vivo* (55,06 e 112,09 ng/cm²).

Como esperado, a quantidade de dimetoato recuperada quando o produto foi aplicado diretamente sobre a pele foi maior do que quando aplicado na secção de algodão (~ 3-6 vezes).

Tabela 06 - Quantidade encontrada no estudo de permeação realizado após aplicação de dimetoato (200 μ L) no algodão nas concentrações de 2 μ g / mL e 9 μ g / mL.

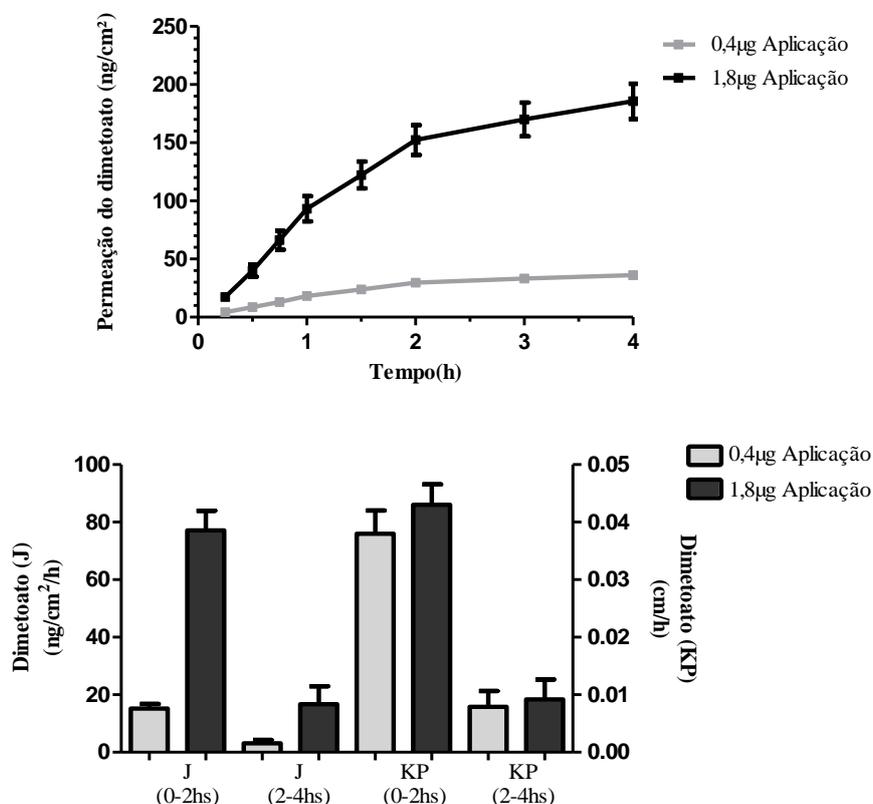
Quantidade de dimetoato aplicada	226 ng/cm ²			1.017 ng/cm ²		
	Média	SD	CV%	Média	SD	CV%
Dimetoato na secção de algodão (ng/cm ²)	179,91	4,12	2,30	871,24	63,87	7,33
Dimetoato no EC (ng/cm ²)	18,25	2,18	11,96	48,62	5,22	10,74
Retenção (ng / cm ²)	8,48	1,11	13,11	16,36	3,30	20,15
Total permeado (ng/cm ²)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Quantidade total de dimetoato recuperada (%)	91,43	2,27	2,50	92,05	6,07	6,60

Tabela 07 - Quantidade encontrada no estudo de permeação realizado após aplicação de dimetoato (200 μ L) diretamente na pele de porco em concentrações de 2 μ g / mL e 9 μ g / mL.

Quantidade de dimetoato aplicada	226 ng/cm ²			1.017 ng/cm ²		
	Média	SD	CV%	Média	SD	CV%
Dimetoato no swab (ng/cm ²)	108,60	8,25	7,60	552,00	50,01	5,43
Dimetoato em EC (ng/cm ²)	52,63	10,73	20,39	135,15	31,80	23,50
Retenção (ng/cm ²)	9,19	2,97	32,3	48,24	4,30	8,92
Total permeado (ng/cm ²)	36,08	3,55	9,85	185,70	15,08	8,12
Quantidade total de dimetoato recuperado (%)	91,36	3,76	4,12	90,57	4,91	5,43

O perfil do dimetoato permeado através da pele de porco quando os 0,4 e 1,8 μ g foram aplicados diretamente sobre a pele (1,77 cm²) é mostrado na figura 10. Nenhum dimetoato foi medido (o limite de quantificação do método é de 10 ng/mL) na solução receptora após experimentos de 4 horas quando o pesticida foi aplicado na secção de algodão.

Figura 10 - Perfil cumulativo do dimetoato permeado (ng/cm^2) em experimento de 4 horas com aplicação da solução de dimetoato diretamente na pele do porco ($N = 6$) (painel A). Fluxo calculado de dimetoato (J) ($\text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$) e coeficiente de permeabilidade (K_p) (cm/h) (painel B).



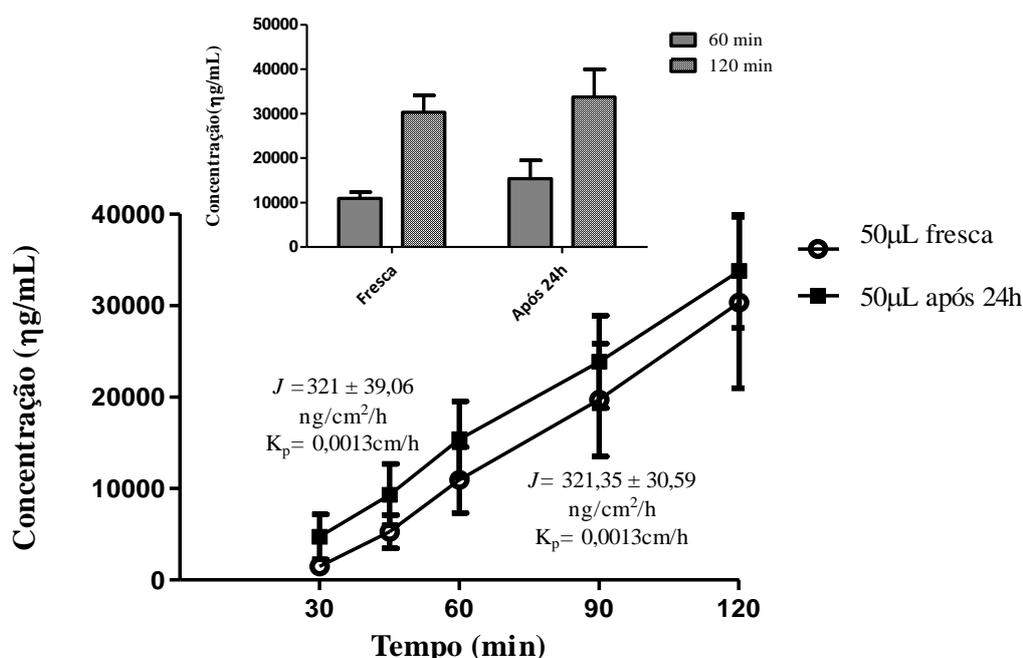
Com base no perfil cumulativo da permeação do dimetoato (figura 10A), o fluxo (J) e o coeficiente de permeabilidade (K_p) calculado para as duas horas finais do experimento diminuíram aproximadamente 4 vezes em comparação às duas horas iniciais, independentemente da quantidade de pesticida aplicado. No entanto, mesmo com diferentes fluxos e quantidade de dimetoato aplicados, os K_{ps} calculados são semelhantes ($p < 0,05$) entre os períodos de 0-2hs e 2-4hs (figura 10B). Isso significa, que é improvável que a permeabilidade do agroquímico mude na faixa de aplicação avaliada.

5.4 ESTUDOS *IN VITRO* E *EX VIVO* UTILIZANDO OLHOS BOVINOS

5.4.1 Estudo de permeação *in vitro* utilizando córnea bovina excisada fresca e refrigerada por 24h

Os resultados obtidos para as permeações realizadas em células de difusão com córneas bovinas excisadas frescas e refrigeradas por 24 horas são mostrados na figura 11 para o volume aplicado avaliado (50 μ L).

Figura 11 - Perfil de permeação comparativo da córnea, do fluxo calculado (J) (ng/cm²/h) e do coeficiente de permeabilidade (K_p) (cm/h) do dimetoato no líquido receptor com aplicação de 50 μ L para córnea fresca e refrigerada. A inserção mostra a concentração de dimetoato (ng/mL) na solução receptora aos 60 e 120 minutos.



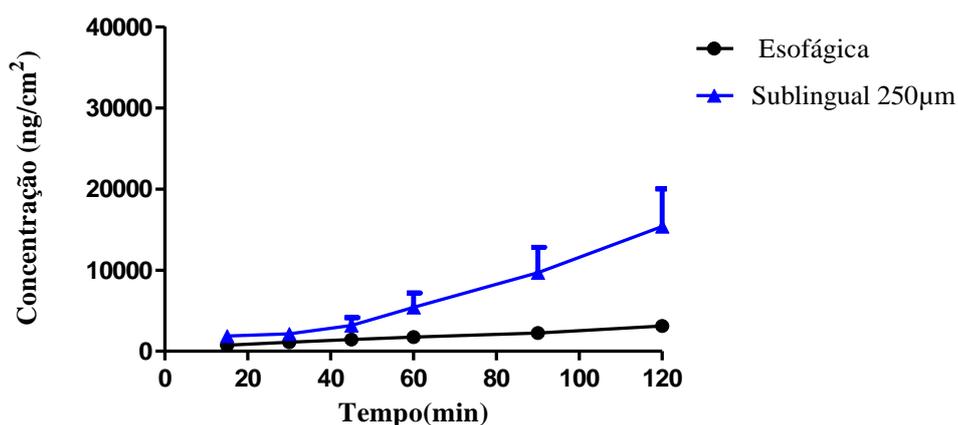
Como pode ser visto na figura 11, o perfil de dimetoato encontrado no líquido receptor, para a permeação realizada com aplicação de 50 μ L do agrotóxico na córnea fresca e na córnea mantida a 2°C por 24h, não apresenta diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Outro aspecto importante está relacionado aos fluxos e aos K_{ps} que não apresentam diferenças estatisticamente significantes, demonstrando que a permeação não é alterada pelo processo de refrigeração da córnea. Da mesma forma, não foi observada diferença estatisticamente significativa na quantidade de pesticida retido na córnea após 2 horas de experimento (tabela 07).

Assim, de acordo com os resultados do estudo *in vitro* com córnea excisada o fluxo e a retenção foram semelhantes, provavelmente devido ao processo de excisão, porque em ambos os casos foram gerados danos não intencionais. Isso corrobora os resultados obtidos através da avaliação histológica. Além disso, quando essa mucosa foi montada em uma célula de Franz, foi possível verificar um inchaço do estroma. Isso provavelmente ocorreu devido à hidratação causada pelo fluido receptor em contato com o endotélio (MUN *et al.*, 2014). O dano causado pela refrigeração foi imperceptível comparado ao dano gerado pelo processo de excisão da córnea, montagem e remoção das células Franz.

5.4.2 Estudo de permeação *in vitro* do dimetoato utilizando mucosa esofágica e sublingual frescas provenientes de suínos

Os resultados obtidos para as permeações realizadas em células de difusão com a mucosa esofágica e sublingual frescas são mostrados na figura 12 para o volume aplicado 50 μ L. Como pode ser observado, o perfil de dimetoato encontrado no líquido receptor, para a mucosa esofágica e para a mucosa sublingual apresentam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre si.

Figura 12 – Perfil cumulativo do dimetoato permeado (ng/cm^2) na mucosa esofágica e na sublingual.



A exposição ocupacional pela via oral ocorre, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2007 *apud* KIMA, KABIR, JAHAN, 2016), quando os trabalhadores rurais manipulam o agrotóxico ou os equipamentos para sua aplicação e não lavam as mãos antes de se alimentar ou fumar, ou ainda quando limpam o *spray* ou bico de pulverização soprando com a boca (KIMA, KABIR, JAHAN, 2017).

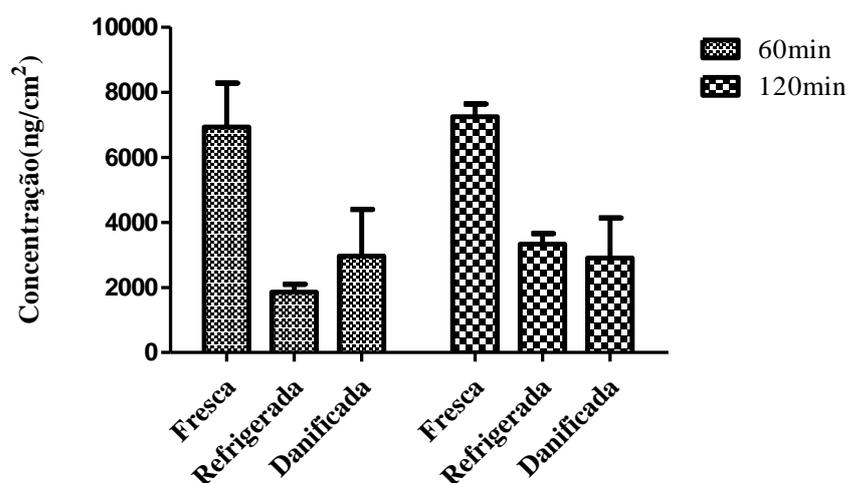
Desta forma, os estudos de permeação *in vitro* realizados com mucosas orais, embora avalie uma exposição pouco frequente, são de extrema importância para mensurar as quantidades de agrotóxicos passíveis de absorção por esta via. Mais estudos devem ser realizados visando validar a utilização da mucosa esofágica para fins de avaliação de agrotóxicos.

5.4.3 Estudo de permeação *ex vivo* utilizando olhos bovinos inteiros frescos, refrigerados por 24h e danificados

A figura 13 mostra os resultados obtidos após a análise do humor aquoso, quando da aplicação de 50 μ L do agrotóxico no estudo de permeação *ex vivo* desenvolvido, utilizando córneas frescas, refrigeradas e danificadas nos tempos de 60 e 120 minutos.

De acordo com os dados encontrados no estudo de permeação em olhos bovinos inteiros com a aplicação de 50 μ L, existe uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre a concentração encontrada no humor aquoso nas três condições (olhos inteiros frescos, olhos inteiros refrigerados e olhos danificados) nos dois tempos avaliados: 60 e 120 minutos. O dano pode ser evidenciado pelos resultados obtidos na avaliação histológica de ambas as córneas (figura 14).

Figura 13 - Concentração de dimetoato (ng/cm²) no humor aquoso com aplicação de 50 μ L para as permeações com córneas frescas, refrigeradas e danificadas, após tempos de permeação de 60 e 120 minutos.



Considerando este estudo *ex vivo*, como o globo ocular foi mantido intacto, os resultados mostram que os danos gerados, tanto pelo processo de refrigeração quanto pela

exposição a produtos irritantes, levaram a uma redução de duas vezes na quantidade de pesticida permeado pela córnea (figura 13), bem como um aumento de duas vezes na retenção quando comparado com o estudo *ex vivo* usando olhos inteiros frescos (tabela 08).

Tabela 08 - Dados de retenção em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para permeação *in vitro* com córnea excisada e para permeação *ex vivo* com olhos inteiros com volume de aplicação de $50\mu\text{L}$ após 2 horas de avaliação.

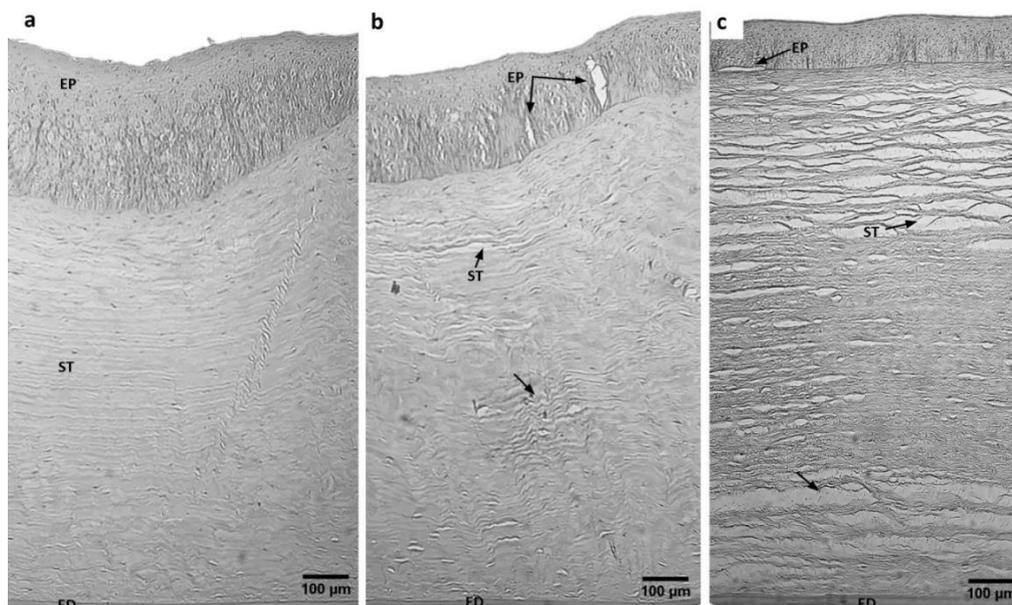
	<i>Córnea excisada</i>		<i>Olhos inteiros</i>		
	<i>Córnea fresca</i>	<i>Refrigerada 24h</i>	<i>Córnea fresca</i>	<i>Refrigerada 24h</i>	<i>Danificada</i>
Permeação média \pm SD	303,31 \pm 11,02	337,51 \pm 15,25	7,18 \pm 3,39	3,28 \pm 0,30	2,85 \pm 1,22
CV%	36,36	45,19	4,73	9,23	42,92
Retenção média \pm SD	2,70 \pm 3,35	2,83 \pm 55,43	0,16 \pm 0,073	0,44 \pm 0,045	0,48 \pm 0,076
CV%	1,24	1,96	44,23	10,10	15,80

Considerando os resultados obtidos, fica claro que não é possível usar olhos resfriados ou danificados em vez de olhos frescos, uma vez que os resultados obtidos são estatisticamente diferentes entre refrigerados/danificados e frescos. Portanto, sugere-se que o método mais adequado, consistente com os processos de permeação biológica para avaliação do dimetoato, sejam permeações *ex vivo* realizadas com olhos inteiros frescos.

5.4.4 Avaliação histológica das córneas bovinas

A figura 14 mostra os resultados dos cortes histológicos obtidos de amostras de córneas frescas, córneas refrigeradas por 24h e córneas mantidas em contato por 10 minutos com hidróxido de sódio 0,1N.

Figura 14 - Secções histológicas: (a) córnea fresca ($\pm 979 \mu\text{m}$) (b) córnea refrigerada por 24h ($\pm 1006 \mu\text{m}$) e (c) córnea danificada ($\pm 1378 \mu\text{m}$) 10X.



EP: epitélio; ST: estroma; ED: endotélio.

Fonte: autoria própria.

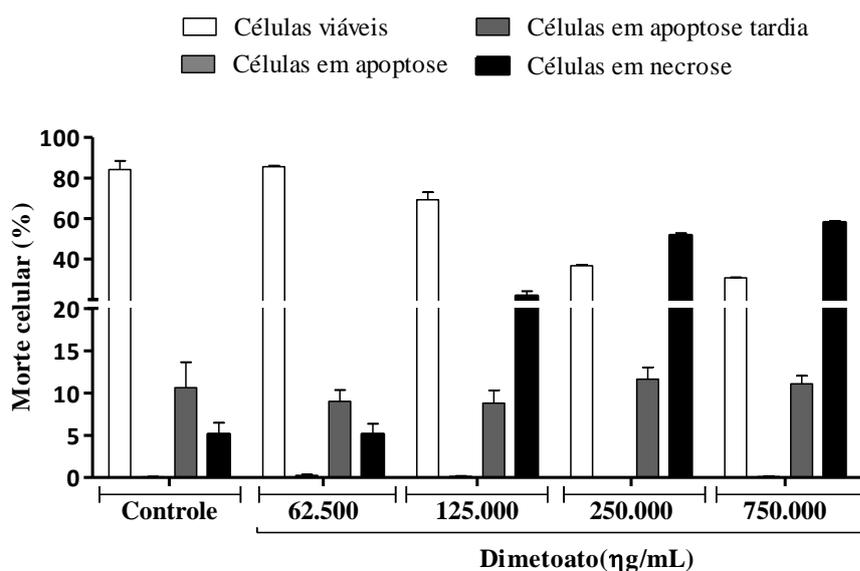
A Figura 14(a) mostra a estrutura da córnea bovina fresca mostrando a estrutura epitelial (EP) preservada, sem evidência de edema ou outras alterações estromais (ST) e endotélio aparentemente intacto (ED). Na figura 14(b), após o período de refrigeração, é possível observar pequenas alterações no epitélio (EP), bem como leve edema e desorganização do estroma (ST) e endotélio preservado (ED). Isso demonstra a inviabilidade de usar córneas bovinas refrigeradas para realizar a avaliação de pesticidas e provavelmente de outros compostos. Finalmente, na figura 14(c) o epitélio (EP) está levemente danificado, com o estroma (ST) mostrando edema e desorganização estrutural das fibras e edema endotelial (ED).

5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A análise pela citometria de fluxo mostrou que quanto maior a concentração da solução de agrotóxico em contato com linfócitos humanos, maior a porcentagem de necrose celular, com 62% de necrose celular por 750.000ng / mL aplicada, 50% por 250.000ng / mL, 20% por 125.000ng / mL e 5% para a concentração de 62.500ng / mL, respectivamente. Comparado ao controle, a porcentagem de necrose celular obtida foi cerca de 12 vezes maior para a concentração avaliada de 750.000 ng / mL (figura 15). Em

relação às células em apoptose e apoptose tardia, as porcentagens encontradas para as soluções de dimetoato foram semelhantes ao controle.

Figura 15- Viabilidade de linfócitos humanos tratados com solução aquosa de dimetoato em concentrações de 62.500ng / mL, 125.000ng / mL, 250.000ng / mL e 750.000ng / mL. Barras verticais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicado. $p = 0,0001$.



5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO E CORROSÃO OCULAR

Os resultados obtidos para o teste BCOP estão apresentados na tabela 09. Nenhuma inferência pode ser feita, visto que o resultado foi classificado como indeterminado. O BCOP, mesmo sendo um método validado, não alcançou, ainda, aceitação regulatória como alternativo aos testes em animais, posto que, como a maioria dos testes *in vitro*, o ensaio não foi validado como preditivo da resposta humana a substâncias irritantes. Sendo, por este motivo, necessárias avaliações complementares ao BCOP visando caracterizar um composto em irritante ocular ou não. Somado a tal fato, o BCOP demonstra-se preditivo apenas para compostos com potencial irritante severo (UBELS *et al.*, 2000).

Tabela 09 - Resultados do teste BCOP.

Produto	BCOP	
	Média ± D.P.	Classe
Dimetoato	39.52 ± 19.89	Não determinado
NaOH 0.1 M	328.87 ± 49.13	Categoria 1
NaCl 0.9%	0	Sem categoria

DP - Desvio padrão

Em relação aos resultados dos testes HET-CAM e CAM-TBS apresentados na tabela 10, o dimetoato não foi considerado irritante de acordo com os escores obtidos.

Tabela 10 - Resultados dos testes HET-CAM e CAM-TBS.

Produto	HET - CAM		CAM-TBS	
	Média ± D.P.	Classe	Média ± D.P.	Classe
Dimetoato	2.67 ± 1.51	Não irritante	3.91 ± 0.48	Não irritante
NaOH 0.1 N	28.00 ± 1.15	Irritante severo	17.48 ± 0.23	Irritante severo
NaCl 0.9%	-	-	0	Não irritante

DP - Desvio padrão

É essencial que os pesticidas sejam avaliados usando estratégias de teste ocular, pois uma grande variedade de estudos foi apresentada para a avaliação de fármacos oftálmicas e seus processos de permeação na mucosa ocular (SHORT *et al.*, 2008; TEGTMEYER *et al.*, 2001; REICHL *et al.*, 2004; AHMED *et al.*, 1987; URTTI *et al.*, 2006; CHRAI *et al.*, 1974; SIEG *et al.*, 1976; REICHL *et al.*, 2005), mas poucos estudos abordam substâncias tóxicas que irritam os olhos humanos.

Esta investigação é especialmente importante para substâncias que não tem seus efeitos irritantes de contato percebidos visualmente pelos trabalhadores, que continuam a lidar com os agrotóxicos, na maioria das vezes, sem proteção (SHALINI, PROSUN, SUJATA, 2016; JAGA & DHARMANI, 2006). Como pode ser visto nos resultados obtidos pela avaliação com os métodos alternativos, nenhuma predição pode ser feita para o dimetoato utilizando-se o BCOP e de acordo com o HET-CAM e o CAM-TBS mesmo o dimetoato sendo classificado com não irritante, métodos adicionais de avaliação são necessários já que essas metodologias, mesmo válidas, não são ainda validadas internacionalmente. Além disso, de acordo com a citotoxicidade por citometria de fluxo realizada, esse composto se torna extremamente perigoso quando em contato direto ou indireto com seres humanos, reforçando a necessidade de mais estudos nessa área.

O desenvolvimento de estudos *in vitro/ex vivo* visando substituir a avaliação *in vivo* é um grande desafio, independentemente da via de administração estudada, devido às limitações inerentes ao uso de membranas biológicas após a excisão (MOSERA, *et al.*, 2001). Isso ocorre porque fatores como o grau de hidratação e a exposição a agentes químicos e/ou físicos podem perturbar e alterar as características de permeabilidade não apenas da luz, mas também de compostos externos, demonstrando os danos gerados (HAYES *et al.*, 2001; COX *et al.*, 1970).

6 CONCLUSÃO

- O método bioanalítico desenvolvido por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) para detecção de resíduos de dimetoato em pele e outras mucosas de suíno, estrato córneo humano, humor aquoso/córnea bovina e em secções de algodão apresentou confiabilidade e segurança, uma vez que atendeu as especificações para os parâmetros avaliados apresentando-se, portanto, validado conforme a RDC nº 27/2012 da ANVISA;
- O estudo de caso *in vivo*, apesar de compreender apenas três indivíduos, demonstrou, que as avaliações pretendidas (exposição dérmica e avaliação da absorção dérmica de agrotóxicos) são adequadas e apresentam uma estreita concordância com os resultados obtidos nos estudos de permeação *in vitro* com aplicação direta/indireta em pele suína. Corroborando com o fato de que em países em desenvolvimento como Brasil, onde a maior parte da agricultura é familiar, o uso correto dos equipamentos de proteção individual, fica aquém do uso seguro. Esta pode ser uma das razões para o aumento dos problemas de saúde associados à exposição crônica, como o câncer;
- Os resultados obtidos nos estudos *in vitro* com córnea bovina excisada demonstram que não é viável utilizar olhos resfriados ou danificados em detrimento dos olhos frescos, uma vez que os resultados obtidos são estatisticamente diferentes entre refrigerados/danificados e frescos. Sendo o fluxo e a retenção semelhantes, provavelmente devido ao processo de excisão, em que ambos os casos geram danos não intencionais à córnea. Corroborando com os resultados obtidos por meio da avaliação histológica;
- Os resultados obtidos para as permeações realizadas em células de difusão utilizando a mucosa esofágica e sublingual frescas apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre si. Estudos complementares devem ser realizados, visando padronizar a mucosa bucal para fins de avaliação desta forma de exposição ocupacional.
- Na ausência de um guia nacional ou internacional para padronizar os ensaios de permeação de produtos através da mucosa ocular, o método desenvolvido neste trabalho (permeações *ex vivo* com olhos bovinos inteiros frescos) demonstrou-se adequado e consistente com os processos de permeação biológica para avaliação do

dimetoato. No entanto, outros agrotóxicos devem ser utilizados visando validar o uso deste método ora desenvolvido, de forma segura, confiável e representativa da realidade;

- Após a avaliação da citotoxicidade do dimetoato, conclui-se que o composto apresenta amplo potencial de gerar danos às células, tornando-se extremamente perigoso quando em contato direto ou indireto com seres humanos;
- Os resultados obtidos para o teste de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP) não permitem que inferências sejam feitas, uma vez que os resultados obtidos enquadram-se na categoria não determinado. Provavelmente, devido ao dimetoato não ser caracterizado como irritante severo, sendo o teste preditivo apenas para este último caso;
- Em relação aos testes em membrana corioalantóide (HET-CAM) e de quantificação de azul de trypan em membrana corioalantóide (CAM-TBS) o dimetoato foi classificado como não irritante.

6.1 PERSPECTIVAS

- Realizar estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro* por meio da aplicação direta e indireta (algodão) de agrotóxicos com características físico-químicas distintas do dimetoato na pele dorsal de porco dermatomizada;
- Realizar estudo de permeação e retenção *in vitro* de agrotóxicos com características físico-químicas distintas do dimetoato, utilizando córnea bovina excisada fresca e refrigerada;
- Realizar estudo de permeação *in vitro* de agrotóxicos com características físico-químicas distintas do dimetoato, através de mucosa esofágica e sublingual frescas, congeladas e tratadas, provenientes de suínos;
- Realizar melhoramentos no procedimento de permeação *in vitro* em olho inteiro, desenvolvido neste trabalho, mediante o uso de diferentes concentrações do dimetoato, e mimetização do fluxo de renovação lacrimal.
- Avaliar também o impacto do uso de olhos bovinos inteiros danificados e refrigerados na reprodutibilidade do teste.

REFERÊNCIAS

- ABRASCO - Associação Brasileira de Saúde Coletiva. **Dossiê ABRASCO** – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2015.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA- Brazil, 2019: Acessado em 21 de agosto de 2019, disponível em: www.portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos.
- AHMED, I., GOKHALE, R.D., SHAH, M.V. AND PATTON, T.F. (1987), Physicochemical determinants of drug diffusion across the conjunctiva, sclera, and cornea. **J. Pharm. Sci.** DOI: 76: 583-586. doi:10.1002/jps.2600760802.
- AKTAR, W., SENGUPTA, D., CHOWDHURY, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdiscip. Toxicol.** 2 (1), 1e12. <http://dx.doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>.
- ALAVANJA, M. C. R.; HOPPIN, J. A; KAMEL, F. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. **Annual review of public health**, v. 25, p. 155–197, 2004.
- ANINGER, P. R. L. C.,. Dissertação de mestrado os impactos do Agronegócio à Saúde e ao Ambiente em um Perímetro Irrigado, apresentada ao programa Pós Graduação em Ciências da Saúde e Biológicas da Universidade Federal do Vale do São Francisco – Petrolina, 2018.
- AN, X. et al. Risk assessment of applicators to chlorpyrifos through dermal contact and inhalation at different maize plant heights in China. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, n. 29, p. 7072–7077, 2014.
- ARAÚJO et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, 2007;12(1 Supl):115-130.
- AVWIORO, G., 2011. Histochemical uses of haematoxylin: a review. **JPCS** 1, 24 e 34.
- BAHARUDDIN, M. R. B. et al. Pesticide risk assessment: a study on inhalation and dermal exposure to 2,4-D and paraquat among Malaysian paddy farmers. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v. 46, n. 7, p. 600–607, 2011.
- BEDOR, C. N. G. **Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na fruticultura e sua implicação para a vigilância da saúde**. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, 2008.
- BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº 18, de 24 de Setembro de 2014. Diário Oficial da União 25 de setembro de 2014.

- BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº 31, de 18 de Agosto de 2016. Diário Oficial da União 19 de Agosto de 2016.
- BRASIL. Decreto Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989.
- BRASIL. Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Diário Oficial da União. 16 de Julho de 2009.
- BRASIL. Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Diário Oficial da União, 9 outubro de 2008.
- BRASIL. Lei nº 7.802, 11 de julho de 1989. Diário oficial da União, Brasília, DF, 12 de jul. 1989.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Diretrizes para Atenção Integral à Saúde do Trabalhador de Complexidade Diferenciada:** Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a agrotóxicos. Brasília, DF, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. SVS (Secretaria de Vigilância Sanitária). Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Ministério da Saúde. Brasília, DF: OPAS/MS, 1997. 69p.
- BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Norma Regulamentadora de Segurança no Trabalho na Agricultura, Pecuária, Silvicultura, Exploração florestal e aquicultura - NR31. Portaria nº 86, de 03 de março de 2005. Brasília - Diário Oficial da União 2005.
- BRASIL. Portaria Nº - 3.586 de 30 de junho de 2017. Diário oficial da União, Brasília, DF, 6 de julho de 2017.
- BRASIL. Portaria nº - 491, de 3 de julho de 2012. Diário Oficial da União. 5 de julho de 2012
- BRASIL. Presidência da República. Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979. Diário Oficial da União. Brasília; 10 maio 1979.
- BRITO et al. Trabalho e exposição aos agrotóxicos em uma pequena comunidade agrícola no município do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Coletiva**, 2006. 14(3):531-548.
- CAMPANHOLA, C., BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário.
- CAO, L. et al. Assessment of potential dermal and inhalation exposure of workers to the insecticide imidacloprid using whole-body dosimetry in China. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 27, n. C, p. 139–146, 2015.
- CHERUVU, P. S. N., Kompella, U. B. Bovine and Porcine Transscleral Solute Transport: Influence of Lipophilicity and the Choroid–Bruch’s Layer. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, October 2006, Vol. 47, Nº. 10.

CHRAI, SUKHBIR S. *et al.* Corneal Permeation of Topical Pilocarpine Nitrate in the Rabbit. **American International Journal**, May 1974 Volume 77, Issue 5, Pages 735–739. DOI: [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(74\)90541-8](https://doi.org/10.1016/0002-9394(74)90541-8).

CODEVASF - Companhia de desenvolvimento do Vale do São Francisco e Parnaíba. Os Vales: Vale do São Francisco, Impactos ambientais. Extraído de [<https://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/o-desenvolvimento-do-vale-do-sao-francisco-uma-historia-de-mais-de-70-anos>], acesso em [26 de março de 2020].

CONSUELO, I. D. D., PIZZOLATO, G.P., FRANC, O.F., GUY R. H., JACQUES Y. Evaluation of Pig Esophageal Mucosa as a Permeability Barrier Model for Buccal Tissue. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, VOL. 94, NO. 12, DECEMBER 2005.

CORDERY, S.F., PENSADOA, A., CHIU, W.S., SHEHABA. M.Z., A.L. BUNGE, M.B. CHARRO, DELGADO- GUY, R.H. Topical bioavailability of diclofenac from locally-acting, dermatological formulations. **International Journal of Pharmaceutics** 529 (2017) 55–64.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.13, p.123-133, 2001.

COX, BY J. L.; FARRELL, R. A.; HART, R. W.; LANGHAM, M. E. The transparency of the mammalian cornea. **J. Phyeiol**, 210, pp. 601-616, 1970.

DAMALAS, C. A.; ABDOLLAHZADEH, G. Farmers' use of personal protective equipment during handling of plant protection products: Determinants of implementation. **Science of the Total Environment**, 2016.

DEL CONSUELO *et al.* .Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. **Archives of Oral Biology** (2005) 50, 981-987.

DELGADO, I.F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 20(1):180-186, jan-fev, 2004.

DOUGHTY, M. J., PETROU, S., MACMILLAN H. Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. **Can. J. Zool.** 73: 2159-2165 (1995).

DRAIZE, J.H. ; WOODARD, G. ; CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, **J.Pharmacol. Exp. Ther.** 82 (1944) 377–390.

DURHAM, W.F.; WOLFE, H.R.B.S. Measurement of the Exposure of Workers to Pesticides. **Bull. Org. mond. Sanhte** 1962, 26, 75-91.

ELHALWAGY, M. E. A. et al. Risk assessment induced by knapsack or conventional motor sprayer on pesticides applicators and farm workers in cotton season. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 110–115, 2010.

ESECHIE, J. O.; IBITAYO, O. O. Pesticide use and related health problems among greenhouse workers in Batinah Coastal Region of Oman. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 18, n. 5, p. 198–203, 2011.

FAO/WHO (1997) Pesticide residues in food — 1996 evaluations. Part II — Toxicological. Geneva, World Health Organization, Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (WHO/PCS/97.1).

FARIA, N. M. X. et al. Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 5, p. 1298–1308, 2004.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A.C. G; FACCHINI, L A. **Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos**. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12(1): 25-38, 2007.

FENSKE, R. A. et al. Contributions of inhalation and dermal exposure to chlorpyrifos dose in Egyptian cotton field workers. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 18, n. 3, p. 198–209, 2012.

FERREIRA, H. S. Pesticidas no Brasil: impacto ambiental e possíveis consequências de sua interação com a desnutrição humana. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, São Paulo, v. 80, n. 21, p. 51-60. 1999.

FLACK, S. et al. Development and application of quantitative methods for monitoring dermal and inhalation exposure to propiconazole. **Journal of environmental monitoring : JEM**, v. 10, n. 3, p. 336–344, 2008.

FRANCO, SANDRA MARIA DE BRAGA. Tese de doutorado intitulada Determinação Óptica da Estrutura Tridimensional da Córnea apresentada a Universidade do Minho – Portugal, 2005.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Acessado em 18/01/2020 em https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1188&Itemid=214.

GAO, B. et al. Measurement of operator exposure to chlorpyrifos. **Pest Management Science**, v. 70, n. 4, p. 636–641, 2014.

GARCIA EG. Pesticides control experiences in Brazil . **Pesticide Safety** 1997; 2:5.

GARCIA, E. G.; BUSSACOS, M. A.; FISCHER, F. M. Impacto da legislação no registro de agrotóxicos de maior toxicidade no Brasil. **Rev. Saúde Pública** 2005; 39(5):832-9.

GAUTHERON, Pierre et al. Bovine corneal opacity and permeability test: an in vitro assay of ocular irritancy. **Toxicological Sciences**, v. 18, n. 3, p. 442-449, 1992.

HAYES, SALLY; *et al.* Comparative Study of Fibrillar Collagen Arrangement in the Corneas of Primates and Other Mammals. **The Anatomical Record** 290:1542–1550, 2007.

ICCVAM. Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication 10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2010.

ICCVAM. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods- In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Vigilância do Câncer Relacionado ao Trabalho e ao Ambiente. Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2e. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2010.

JAGA, K.; DHARMANI, C. Ocular toxicity from pesticide exposure: a recent review. **Environ. Health Prev. Med.** 11, 102-107, 2006.

KIM, K.H., KABIR, E., JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of The Total Environment**. Volume 575, 1 January 2017, Pages 525-535.

KOZIOSKI, G.V.; CIOCCA, M.L.S. Energia e Sustentabilidade Em Agro ecossistemas **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p.737-745, 2000.

KUYE, R. et al. Pesticide Handling and Exposures Among Cotton Farmers in The Gambia. **Journal of Agromedicine**, v. 12, n. 3, p. 57–69, 2008.

LAGARTO, A., *et al.* In vitro quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue taining as alternative to eye irritation test. **Toxicol In Vitro** 20: 699–702, 2006.

NAEGEL *et al.* / **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 68 (2008) 368–379.

LESMES-FABIAN, C. et al. Dermal exposure assessment of pesticide use: The case of sprayers in potato farms in the Colombian highlands. **Science of the Total Environment**, v. 430, p. 202–208, 2012.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: RJ; 2011.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 495-496, 1986.

MACHADO NETO JG, MATUO T, MATUO YK. **Semiquantitative evaluation of dermal exposure to granulated insecticides in coffee (Coffea arábica L.) crop and efficiency of individual protective equipment.** Bull En v i ron Contam Toxicol 1996; 5 7 : 9 4 6 - 5 1 .

MACHERA, K. et al. Dermal exposure of pesticide applicators as a measure of coverall performance under field conditions. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 53, n. 6, p. 573–584, 2009.

Manual de toxicologia clínica [recurso eletrônico] - OLSON, R. K. *et al.*, 6. ed. Dados eletrônicos – Porto Alegre : AMGH, 2014.

MEYER A, CHRISMAN J, et al. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research**, v.93, p.264-271. 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Agricultura Familiar. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/agricultura-familiar/agricultura-familiar-1>. Acesso em: 08 de jan. 2020.

MIRANDA, *et al.*, Ética em experimentação animal: reflexões sobre o laboratório didático de Análise do Comportamento. **Psicologia: Teoria e Prática** – 2011, 13(1):198-212.

MIZIARA, I. D.; MAGALHÃES, A.T.M.; SANTOS, M.A.; GOMES, E.F.; OLIVEIRA, R.A. Ética da pesquisa em modelos animais. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, 78(2), 128-131, 2012.

MONTAN. M. FRANZ *et al.* Evaluation of different pig oral mucosa sites as permeability barrier models for drug permeation studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 81 (2016) 52–59.

MOREIRA, C. J. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, RJ, vol.7(2):299-311, 2002.

MOSERA, KATRIN; *et al.* Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Volume 52, Issue 2, September 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00166-7](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00166-7).

MUN EA, *et al.* On the Barrier Properties of the Cornea: A Microscopy Study of the Penetration of Fluorescently Labeled Nanoparticles, Polymers, and Sodium Fluorescein **Mol Pharm**. 2014 Oct 6;11(10):3556-64. doi: 10.1021/mp500332m. Epub Aug 28, 2014.

MUTTRAY, A. *et al.* External and internal exposure of winegrowers spraying methyl parathion. **Toxicology Letters**, v. 162, n. 2–3 SPEC. ISS., p. 219–224, 2006.

OECD - Guidance Document for the Conduct of Studies of Occupational Exposure to Pesticides During Agricultural Application. Series on Testing and Assessment n° 9. Paris, 1997.

OECD, 2002. Guideline for the Testing of Chemicals 405: Acute Eye Irritation/ Corrosion. 2nd revision, adopted: 24th April 2002.

OECD. 2005. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. Number 34. ENV/JM/MONO(2005)14. Paris, France.

OECD. Guideline for the testing of chemical, n° 428. Skin Absorption: *in vitro* Method, Paris, France, 2004.

OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Section 4: Health Effects. 2013.

OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals. Test N°460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. OECD, 2017.

OLIVEIRA-SILVA J J , ALVES SR, MEYER A, PEREZ F, SARCINELLI PN, MATTOS RCO, *et al.* Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Rev Saúde Pública** 2001; 35: 1 3 0 - 5 .

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA. DECLARAÇÃO UNIVERSAL DOS DIREITOS DOS ANIMAIS. Bruxelas:

Unesco; 27 jan 1978 [acesso 11 março de 2018].Disponível:<http://www.urca.br/ceua/arquivos/Os%20direitos%20dos%20animais%20UNESCO.pdf>

ÖZGÜNEY, I.S., KARASULU, H.Y., KANTARCI, G. *et al.* **AAPS PharmSciTech** (2006) 7: E39. <https://doi.org/10.1208/pt070488>

PARRÓN, T., REQUENA, M., HERNÁNDEZ, AF., ALARCÓN, R. Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. **Toxicol Lett.** 2014 Oct 15;230(2):157-65.

PELAEZ, V., TERRA, F. H. B., SILVA, L. R, regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v. 36, n. 1 (ano 34), p. 27-48, jan./abr. 2010. Editora UFPR.

PERES, F. J., MOREIRA, C., DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: Peres, F.; Moreira, J. C. (Org.) **É Veneno ou é Remédio? - agrotóxicos, saúde e ambiente**, 1. ed. Rio de Janeiro: ed. FIOCRUZ. 2003.

PERMEGEAR, 2020. Acessado em 29/01/2020 disponível em:<https://permegear.com/franz-cells/>

PIGNATI, W. et al. Acidente rural ampliado: o caso das “chuvas” de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do rio Verde – MT. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 299-311, 2007.

PIGNATI, W.A.; FRANCCO, A.N.S.L.; SOMMERFELD, S.L.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J.R.; LEÃO, L. H. C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, 22(10):3281-3293, 2017. DOI: 10.1590/1413-812320172210.1774 2017.

PINHEIRO, F. A.; ADISSI, P. J. Pesticide exposure: The case of workers on growing grapes in San Francisco Valley. Petrolina/Brazil. **Agricultural Sciences**, v. 5, p. 805 - 812, 2014

PROTANO, C.; GUIDOTTI, M.; VITALI, M. Performance of different work clothing types for reducing skin exposure to pesticides during open field treatment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 1, p. 115–119, 2009.

REICHL S, BEDNARZ J, MÜLLER-GOYMANN CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. **British Journal of Ophthalmology** 2004;88:560-565.

REICHL. STEPHAN, *et al.* **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Volume 60, Issue 2, July 2005, Pages 305-308 July 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.09.016>.

RIGOTTO, R. M.; ROSA, S. F. Agrotóxicos. In: CALDART. R. et al. (Org.). **Dicionário de educação do campo**. São Paulo: **Expressão Popular**, 2012. p. 86-94.

RUSELL, W.M.S.; BURCH, R.L.; **Principles of Human Experimental Technique**, UFAW, England: Hyperion Books Inc., 1959.

- SANTANA, E. L., MACHINSKI JUNIOR, M. O uso de praguicidas por trabalhadores do setor agrícola atendidos ambulatoriamente em Maringá no período de 2002 a 2003. **Acta Scientiarum**. Health Sciences Maringá, v. 26, n. 2, p. 325–329, 2004.
- SANTOS, SL., et al., Metodologia e equipamentos. In: Guia ilustrado da morfologia do tecido uretral de ratas [online]. São Paulo: Editora UNESP, 2014, pp. 13-26. ISBN 978-85-68334-51-5.
- SANTOS; D.K.D.N. *et al.* Evaluation of cytotoxic, immunomodulatory and antibacterial activities of aqueous extract from leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus (Combretaceae) Royal Pharmaceutical Society, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2018.
- SAYIM, F. Histopathological Effects of Dimethoate on Testes of Rats. **Bull Environ Contam Toxicol** (2007) 78:479–484. DOI 10.1007/s00128-007-9196-5.
- SCHEEL, J.; KLEBER, M.; KREUTZ, J.; LEHRINGER, E.; MEHLING, A.; REISINGER, K.; STEILING, W. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). **Regul Toxicol Pharmacol**, 59: 471-492, 2011.
- SEIZI, O., CAMARGO, M.M. A., BATISTUZZO. Fundamentos de Toxicologia - 4ª Ed., Atheneu Sp 2014
- SHALINI, SANYAL; PROSUN, DAS; SUJATA, LAW CELL. Effect of chronic pesticide exposure on murine cornea: a histopathological, cytological and flow cytometric approach to study ocular damage by xenobiotics **Biol Toxicol** (2016) 32:7–22DOI 10.1007/s10565-016-9314-4.
- SHORT, BRIAN G. Safety Evaluation of Ocular Drug Delivery Formulations: Techniques and Practical Considerations. **Toxicologic Pathology**, 36:49-62, 2008.
- Sieg, James W.; Robinson, Joseph R. Mechanistic Studies on Transcorneal Permeation of Pilocarpine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. Volume 65, Issue 12, December 1976. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.2600651230>.
- SILVA, J. M.; SILVA, E. N.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M.M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciências & Saúde Coletiva**, 10(4):891-903, 2005.
- Silva, M. G. P., Bedor, C.N. G., Alencar, K. M. S. A., Curado M. Paula, Moura, L. T. R.; Tendências da morbimortalidade por câncer infantojuvenil em um polo de fruticultura irrigada **Cad. Saúde Colet.**, 2018, Rio de Janeiro, 26 (1): 38-44.
- SIQUEIRA, L.S.; KRUSE, M.H.L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Ver. Esc. Enferm USP**, 2008; 42(3):584-90.
- SOARES, W. L.; PORTO, M. F. S. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, 12(1): 131-143, 2007.
- SOUZA, M. M. O.; Folgado, C. A. R. **Agrotóxicos – violações socioambientais e direitos humanos no Brasil.**– Anápolis: Editora Universidade Estadual de Goiás, 2016.
- SULLIVAN, T. P., *et al.* The pig as a model for human wound healing. **Wound Repair**

Regen. v. 9, p. 66-76, 2001.

TÁCIO, M. B.; OLIVEIRA, M. L. DE; MACHADO N., J. G. Eficiência de vestimentas hidrorrepelentes novas na proteção do tratorista em pulverizações de agrotóxicos em goiaba com o turbopulverizador. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 106–111, mar. 2008.

TEGTMEYER, STEFANIE *et al.* Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Volume 51, Issue 2, March 2001 [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00123-0](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00123-0).

The Toxin and Toxin Target Database, 2019. The Toxin and Toxin Target Database. Acessado em 16/01/2020 disponível em www.t3db.ca/toxins/T3D0229.

THUNDIYIL, JG, et al. Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool. **Bulletin of The World Health Organization**. March 2008, 86(3).

TSAKIRAKIS, A. et al. Determination of operator exposure levels to insecticide during bait applications in olive trees: Study of overall performance and duration of application. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 1, p. 71–78, 2011.

TSAKIRAKIS, A. N. et al. Dermal & inhalation exposure of operators during fungicide application in vineyards. Evaluation of overall performance. **Science of the Total Environment**, v. 470–471, p. 282–289, 2014.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 2007. **Pesticides: Health and Safety. National Assessment of the Worker Protection Workshop #3.** (Available at:) <http://www2.epa.gov/pesticide-worker-safety>.

UNIVERSIDADE DE HERTFORDSHIRE, 2020. Acessado em 16/01/2020 disponível em <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/244.htm>.

URTTI, ARTO. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Volume 58, Issue 11, 15 November 2006, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.07.027>.

VERSTRAELEN, S.; JACOBS, A.; DE WEVER, B.; VANPARYS, P. Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Toxicology in Vitro**, 27(4), 1298-1311, 2013.

VINARDELL MP, MITJANS M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: An overview. **J Pharm Sci**. 2008; 97 (1): 46-59.

WHO, World Health Organization, 1982, Field Surveys of Exposure to Pesticides. Standard Protocol, VBC/82.1, WHO, Geneva.

WHO, World Health Organization, 1982, Field Surveys of Exposure to Pesticides. Standard Protocol, VBC/82.1, WHO, Geneva.

WIKLUND, K., DICH, J, HOLM,I., EKLUND, G. Risk of cancer in pesticide applicators in Swedish agriculture. **British Journal of Industrial Medicine**, 1989, 46: 809-814.

WILSON, T. D. and STECK, W. F.; A modified HET±CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts **Fytokem Products Inc.**, Research Drive, Saskatoon, Canada S7N 3R3 2000

ZHAO, M.-A. et al. Potential Dermal Exposure to Flonicamid and Risk Assessment of Applicators During Treatment in Apple Orchards. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 12, n. 8, p. D147–D152, 2015.

APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ARTIGOS PUBLICADOS:

- Thalita Pedon de Araujo Cardoso, José Wellithom Viturino da Silva, Juliana Kishishita, Cheila Nataly Galindo Bedor, Danilo Cesar Galindo Bedor, Davi Pereira de Santana, Leila Bastos Leal. Pesticide dermal absorption: Case study x in vitro study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Volume 75, 2020, 103313, ISSN 1382-6689. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103313>.
- Thalita Pedon de Araujo Cardoso, Juliana Kishishita, Asley Thalia Medeiros Souza, Jeymesson Raphael Cardoso Vieira, Cristiane Moutinho Lagos de Melo, Davi Pereira de Santana, Leila Bastos Leal. A proposed eye ex vivo permeation approach to evaluate pesticides: Case dimethoate. **Toxicology in Vitro**, 2020, 104833, ISSN 0887-2333. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104833>.

ARTIGO SUBMETIDO:

- Cardoso, T. P. A.; Linhares, M. E. A., Souza A. T. M., Santana, D. P.; Leal, L. B. Exposição dérmica a resíduos de agrotóxicos: uma abordagem dos métodos de avaliação e das formas de exposição. (Submetido à Revista Saúde em Debate em fevereiro/2020).

ARTIGO EM CONSTRUÇÃO:

- *In vitro* permeation assessment of dimethoate in different porcine oral mucosa.

ANEXO A – SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA E APROVAÇÃO DO ESTUDO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO VALE DO SÃO
FRANCISCO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: OS IMPACTOS DO AGRONEGÓCIO À SAÚDE, AO TRABALHO E AO AMBIENTE EM UM PERÍMETRO IRRIGADO

Pesquisador: Cheila Nataly Galindo Bedor

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55309516.4.0000.5196

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.640.247