



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA**

**AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E GENOTOXICIDADE  
EM TRABALHADORES RURAIS DE MUNICÍPIOS GOIANOS COM  
INTENSA ATIVIDADE AGRÍCOLA**

**CAROLINNE BORGES KHAYAT**

GOIÂNIA, GO  
2012



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA**

**AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E GENOTOXICIDADE  
EM TRABALHADORES RURAIS DE MUNICÍPIOS GOIANOS COM  
INTENSA ATIVIDADE AGRÍCOLA**

**CAROLINNE BORGES KHAYAT**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela de Melo e Silva.

GOIÂNIA, GO  
2012

Khayat, Carolinne Borges.

K45a Avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade em trabalhadores rurais de municípios goianos com intensa atividade agrícola [manuscrito] / Carolinne Borges Khayat. – 2012.

47 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2012.

“Orientadora: Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva”.

Bibliografia: p. 30-35

1. Testes de mutagenicidade. 2. Nucléolo. 3. Produtos químicos agrícolas. I. Título.

CDU: 575.224.4(043.2)



PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1305 - Setor Universitário  
Casa Postal 85 - CEP 74605-910  
Goiânia - Goiás - Brasil  
Fone: (62) 2946.1070 - Fax: (62) 2946.1070  
www.pucgoias.edu.br - prp@pucgoias.edu.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA  
DA PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
DEFENDIDA EM 13 DE ABRIL DE 2012 E APROVADA  
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA

9,0 (nove pontos)

Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva / PUC Goiás  
(presidente)

Prof. Dr. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura / PUC Goiás  
(membro)

Prof. Dr. Daniela de Melo e Silva / UFG  
(membro)

Prof. Dr. Ângela Adamski da Silva Reis / UFG  
(membro)

*Dedico este trabalho aos meus pais Jorge e Rosimary,  
pelo apoio incondicional em todos os momentos,  
tranquilos e difíceis ,  
sempre presentes com palavras sábias e de conforto  
orientando esta caminhada.  
E ao meu namorado Diogo Andrade, pela paciência diária  
e por me mostrar o que é a perseverança.  
A vocês o meu muito obrigada.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à maior de todas as forças, Deus, que me trouxe até aqui e que me ajuda a caminhar todos os dias.

Aos meus pais Jorge, Rosimary e à minha irmã querida Vívian, que me apoiaram em todos os momentos não medindo esforços nem dificuldades em busca desta conquista.

À Pontifícia Universidade Católica de Goiás e, em especial, ao Núcleo de Pesquisa Replicon, pela disponibilização de suas instalações para que este trabalho pudesse se concretizar.

À minha orientadora Dra. Daniela de Melo e Silva, que mesmo com tantas tarefas a realizar, confiou em aceitar-me como orientanda.

Aos professores e coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela oportunidade de aprendizagem e incentivo.

A toda a equipe do Núcleo de Pesquisa Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, em especial, Damiana Cunha, Aldaires Vieira, Alex Silva Cruz, Lunara, Launa Diniz, Macks Wendhell, Rafael Veloso, Silonardo Oliveira, Wanessa Carvalho, Alex Hanusch, entre outros colegas que contribuíram e foram fundamentais para a realização dessa pesquisa.

A todos meus queridos e essenciais amigos, que estão sempre presentes em todos os momentos especiais da minha vida.

Aos trabalhadores rurais, que gentilmente colaboraram com este projeto.

Muito obrigada!

*“Não é o cérebro o que mais importa,  
mas sim o que o orienta: o caráter,  
o coração, a generosidade, as idéias”*

Fiódor Dostoiévski

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1 Agrotóxicos .....	5
2.2 Pesticidas Como Agentes Genotóxicos .....	6
2.3 Testes de Genotoxicidade .....	7
2.3.1 Ensaio cometa .....	7
2.3.2 Teste do micronúcleo.....	8
<b>3. OBJETIVOS E METAS</b> .....	10
3.1. Objetivo Geral .....	10
3.2. Objetivos Específicos .....	10
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	11
4.1. Delineamento do Estudo .....	11
4.2. Grupo Amostral .....	11
4.3 Ensaio Cometa.....	12
4.4 Teste de Micronúcleo .....	14
4.5 Análise Estatística.....	15
<b>5. RESULTADOS</b> .....	17
5.1 Distribuição do Grupo Amostral .....	17
5.2 Principais Atividades Agrícolas dos Municípios Amostrados .....	17
5.3. Estatística Descritiva do Grupo Amostral .....	18
5.4 Ensaio Cometa.....	20
5.5 Teste de Micronúcleo .....	22
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	29
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	30
<b>ANEXOS</b> .....	36

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Mapa ilustrativo dos municípios do Estado de Goiás, nos quais foram realizadas as coletas de material biológico, dos trabalhadores rurais envolvidos nessa pesquisa. ....	12
Figura 2 - A) Micronúcleo (seta); B) Célula binucleada (seta).....	15
Figura 3 - Desvios padrão dos grupos exposto e controle quanto ao parâmetro PDCA. UA: unidades arbitrárias; GE: grupo exposto; GC: Grupo controle. ....	21
Figura 4 - Desvios padrão dos grupos exposto e controle quanto ao parâmetro MC. GE MC: grupo exposto quanto ao momento da cauda; GC MC: Grupo control quanto ao momento da cauda. ....	21
Figura 5 - Distribuição dos MNs nos grupos exposto e controle. ....	22
Figura 6 - Distribuição de células binucleadas nos grupos exposto e controle.	23
Figura 7 - Associação entre a quantidade de MN e o uso de EPI's. À esquerda: com EPI's; à direita: sem EPI's.....	24

**LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1– Classificação dos pesticidas pela Organização Mundial da Saúde ....6

QUADRO 2– Principais atividades agrícolas desenvolvidas nos municípios dos trabalhadores entrevistados ..... 17

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1– Distribuição do grupo amostral por município .....	17
Tabela 2 - Sexo, Idade e hábitos de vida dos 41 trabalhadores rurais selecionados. ....	18
Tabela 3 - Tempo de exposição dos agricultores aos pesticidas .....	19
Tabela 4 - Quantidade de pesticidas aos quais os trabalhadores selecionados foram expostos.....	19
Tabela 5 - Descrição dos principais pesticidas a que os agricultores foram expostos .....	19
Tabela 6 - Avaliação do ensaio cometa nos trabalhadores expostos a pesticidas e grupo controle .....	20

## RESUMO

O termo pesticida é usado para denominar uma ampla variedade de produtos químicos utilizados para destruir ervas daninhas, insetos e fungos. No Brasil, o uso de pesticidas na agricultura vem se ampliando de forma contínua e, conseqüentemente, a análise sobre os efeitos deste tipo de exposição ambiental começa a documentar um perfil epidemiológico da distribuição de câncer tanto em populações ocupacionalmente expostas a estes agentes químicos, como na população geral indiretamente afetada por contaminação alimentar e dos recursos hídricos. Os possíveis efeitos tóxicos de tais exposições ainda são desconhecidos e as informações da toxicidade relacionada apenas aos ingredientes ativos não são suficientes para avaliar o risco dos efeitos adversos dos pesticidas à saúde humana e ambiental. Os trabalhadores expostos a pesticidas, quando comparados ao grupo controle, tiveram aumento de 8 vezes mais micronúcleos e 20 vezes mais células binucleadas e maior dano ao DNA avaliado pelo ensaio cometa, em relação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ), como demonstrado pelo teste t e análises de regressão linear simples. Nesse estudo, variáveis como tabagismo, consumo de álcool, idade, sexo, tempo de exposição e tipo de pesticida não influenciaram o aparecimento de danos genéticos. Entretanto, houve aumento de micronúcleos em trabalhadores que não utilizavam equipamentos de proteção pessoal ( $p = 0,006$ ). Assim, a exposição a pesticidas, independente do tempo e tipo de agente utilizado, pode causar genotoxicidade e mutagenicidade aos indivíduos que os manipulam.

**Palavras-chave:** pesticidas, micronúcleo, cometa, mutagenicidade e genotoxicidade.

## **ABSTRACT**

The term pesticide is used to refer to a wide variety of chemicals used to kill weeds, insects and fungi. In Brazil, the use of pesticides in agriculture has been expanding continuously, and therefore the analysis of the effects of this type of environmental exposure begins to document an epidemiological profile of the distribution of cancer in both populations occupationally exposed to these chemicals as in the general population indirectly affected by contaminated food and water resources. The possible toxic effects of such exposures are unknown and the information related only to the toxicity of active ingredients are not sufficient to assess the risk of adverse effects of pesticides on human health and the environment. Workers exposed to pesticides when compared with the control group showed increased 8 times more micronucleus and 20 times more binucleated cells and increased DNA damage measured by comet assay. Variables such as smoking, alcohol consumption, age, sex, duration of exposure and type of pesticide did not affect the appearance of genetic damage. However, there was an increase of micronucleus in workers who did not use personal protective equipment. Pesticide exposure can cause genotoxicity and mutagenicity to individuals who deal with such agents.

**Keywords:** pesticides, micronuclei, comet assay, mutagenicity and genotoxicity.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, o homem tem continuamente se esforçado para melhorar sua condição de vida. Seu esforço para aumentar a produção em quantidades suficientes de alimentos contrapôs às devastações causadas pelas pragas, dando origem, então, aos compostos denominados de agroquímicos, incluindo fertilizantes e agrotóxicos (Silva & Fay, 2004).

O termo pesticida é usado para denominar uma ampla variedade de produtos químicos utilizados para destruir ervas daninhas (herbicidas), insetos (inseticidas) e fungos (fungicidas). O contato do ser humano com estes produtos decorre principalmente do seu amplo uso na agricultura, horticultura, reflorestamento e manuseio no processamento secundário dos pesticidas nas indústrias (McDuffie *et al.*, 2001).

O consumo de agrotóxicos cresce de forma correspondente ao avanço do modelo do agronegócio, que concentra a terra e utiliza grande quantidade de venenos para garantir a produção em escala industrial (SINDIAGRI, 2011). Nesse quadro, os agrotóxicos de uso agrícola já ocupam o segundo lugar no registro de intoxicações, com 5645 casos humanos documentados em 2009 (SINITOX, 2009).

Atualmente, o Brasil está em quarto lugar entre os dez principais países que representam 70% do mercado mundial de agrotóxicos e, entre os anos de 1964 a 1991, o consumo nacional aumentou 276%, sendo o aumento da área plantada de 76% (Gonzaga & Blank, 2005).

A exposição a pesticidas tanto ocupacionalmente e ambientalmente provoca uma série de problemas à saúde humana. Estima-se cerca de 10 mil mortes por ano devido ao uso de pesticidas químicos em todo o mundo, sendo que cerca de 75% destes ocorrem nos países em desenvolvimento (Chitra *et al.*, 2006)

Geralmente a exposição ocupacional dos trabalhadores agrícolas ocorre por falta de informação ou por falta de recursos. Desta forma, os equipamentos de proteção individual (EPI's) tendem a não ser utilizados no momento do preparo e utilização dos agrotóxicos, até porque nem sempre estão adequados à realidade e ao clima que os trabalhadores brasileiros enfrentam. Apesar da obrigatoriedade do fornecimento de equipamentos de proteção, como luvas e

perneiras (NR4, 1978), nem todos os empregadores rurais as observam. Mesmo quando estes equipamentos estão disponíveis, a inadequação dos mesmos acaba constituindo em outras cargas laborais. Os EPI's em geral são confeccionados com material não adequado ou que não apresentam muitas opções de tamanho, acabam se tornando obstáculos para o trabalhador, antes de serem instrumentos de segurança, pois podem atrapalhar os movimentos requeridos durante o trabalho, prejudicando a sua produtividade. (Peres & Moreira, 2007) Outro agravante desse processo é que, devido ao ritmo do trabalho, o desgaste desses equipamentos durante a safra é grande. Apesar disto, geralmente, não são fornecidos equipamentos em número suficiente para a reposição no decorrer da safra, ficando sob a responsabilidade do trabalhador a aquisição de novos equipamentos, quando necessário (Alessi & Navarro, 1997).

A contaminação ocupacional aos pesticidas se caracteriza pela contaminação dos trabalhadores que manipulam essas substâncias. Esta contaminação é observada tanto no processo de formulação (mistura e/ou diluição dos agrotóxicos para o uso) quanto no processo de utilização (pulverização, auxílio na condução das mangueiras dos pulverizadores e descarte de resíduos e embalagens contaminadas, etc.) e na colheita (onde os trabalhadores manipulam/entram em contato com o produto contaminado). Embora atinja uma parcela mais reduzida da população (os trabalhadores agrícolas ou guardas de endemias, por exemplo – que manipulam estes produtos em seu processo de trabalho), esta via é responsável por mais de 80% dos casos de intoxicação por agrotóxicos, dada à intensidade e à freqüência com que o contato entre este grupo populacional e o produto é observado (Moreira *et al.*, 2002).

A notificação e a investigação das intoxicações por agrotóxicos ainda são muito precárias no Brasil. Dificuldades de acesso dos trabalhadores rurais aos centros de saúde e diagnósticos incorretos são alguns dos fatores que influenciam a falta de registro dos casos e, que na maioria dos estados brasileiros, estes agravos não são de notificação compulsória aos sistemas de vigilância epidemiológica e/ou sanitária (Peres & Moreira, 2007).

No caso de trabalhadores agrícolas com exposição ocupacional aos pesticidas, afecções do trato reprodutivo masculino têm aumentado nos últimos

cinquenta anos, incluindo a incidência de câncer testicular. Em consequência de tal exposição, os filhos desses indivíduos podem apresentar algumas anomalias congênitas, como a hipospádia e o criptorquidismo. No Brasil, o uso de pesticidas na agricultura vem se ampliando de forma contínua e, conseqüentemente, a análise sobre os efeitos deste tipo de exposição ambiental começa a documentar um perfil epidemiológico da distribuição de câncer tanto em populações ocupacionalmente expostas a estes agentes químicos, como na população geral indiretamente afetada por contaminação alimentar e dos recursos hídricos (Santos *et al.*, 2008).

Os possíveis efeitos tóxicos de tais exposições ainda são desconhecidos e as informações da toxicidade relacionada apenas aos ingredientes ativos não são suficientes para avaliar o risco dos efeitos adversos dos pesticidas à saúde humana e ambiental. Em relação à genotoxicidade, a determinação das alterações genéticas nos indivíduos expostos aos pesticidas pode ser utilizada como marcador de efeito biológico precoce fornecendo um quadro geral da exposição genotóxica aos pesticidas (Falck *et al.*, 1999).

Vários estudos relatam os efeitos prejudiciais dos agrotóxicos na saúde humana. No entanto, no Estado de Goiás, ainda não há pesquisas que tenham utilizado várias classes de marcadores genéticos, em trabalhadores agrícolas, ocupacionalmente expostos a agentes químicos. Dessa forma, o presente estudo se propõe a avaliar o efeito biológico da exposição ocupacional aos agrotóxicos sobre o patrimônio genético dessa classe de trabalhadores, podendo contribuir para se compreender os riscos de agravo à saúde humana decorrente da exposição individual, fornecendo subsídios para reforçar a necessidade da adesão do trabalhador às condições de segurança ocupacional que visam à manutenção da saúde física e a proteção contra o desenvolvimento das doenças ocupacionais. Assim, compreender os aspectos biológicos subjacentes à exposição do sistema celular humano aos agrotóxicos permitirá uma maior proteção da saúde de trabalhadores agrícolas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A utilização dos agrotóxicos na agricultura iniciou-se em 1920, época em que eram pouco conhecidos do ponto de vista toxicológico. Durante a Segunda Guerra Mundial foram utilizados como arma química, tendo seu uso se expandido enormemente a partir de então, chegando a serem produzidos, em escala industrial, dois milhões de toneladas de agrotóxicos por ano. No Brasil o uso dos agrotóxicos se intensificou a partir de 1960 (OPAS, 1997).

No mundo, a exposição dos indivíduos a agentes químicos é cada vez mais comum, devido à disseminação de substâncias como: produtos químicos industriais, fármacos, pesticidas, metais pesados e poluentes do ar. Muitas dessas substâncias apresentam efeitos prejudiciais à saúde. Neste sentido, diversas iniciativas voltadas para a realização de estudos epidemiológicos vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de se determinar a magnitude da associação entre a exposição a uma substância química específica e seus efeitos na saúde dos indivíduos expostos, como é o caso dos pesticidas (Santos *et al.*, 2008).

A aplicação indiscriminada de agrotóxicos afeta tanto a saúde humana quanto ecossistemas naturais. Os impactos na saúde podem atingir tanto os aplicadores dos produtos, os membros da comunidade e os consumidores dos alimentos contaminados com resíduos, mas, sem dúvida, a primeira categoria é a mais afetada por estes (Soares *et al.*, 2003). Os efeitos da exposição em curto prazo têm sido bem documentados. Pequenas quantidades de alguns desses químicos podem levar à morte, perturbar os hormônios e reduzir a habilidade de uma reprodução bem – sucedida além de terem sido associados com cânceres específicos (Alavanja *et al.* 2004).

Em 1990, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que mundialmente ocorreriam cerca de três milhões de intoxicações agudas por agrotóxicos com 220 mil mortes por ano. Das quais cerca de 70% ocorreriam em países em desenvolvimento. No Brasil, não dispomos de dados que reflitam a realidade do número de intoxicações e mortes por agrotóxicos, porém estima-se que este seja um problema grave, uma vez que somos um dos maiores consumidores mundiais e, muitas vezes, requisitos básicos de segurança para

a aplicação, armazenamento a disposição final dos mesmos não são respeitados (OPAS, 1997).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), o Brasil é o quarto maior consumidor mundial de agrotóxicos (Peres & Moreira, 2007). Estudos realizados no Brasil têm mostrado uma enorme quantidade de problemas de saúde relacionados com o manejo de agrotóxicos, alguns desses estudos mostram a baixa adesão aos equipamentos de proteção individual, um dos principais fatores que influencia diretamente na vulnerabilidade dos trabalhadores rurais frente aos efeitos nocivos do uso de agrotóxicos nos processos produtivos rurais (Chester *et al.*, 1993).

## **2.1 Agrotóxicos**

O termo agrotóxico é usado no seu mais amplo sentido, sendo qualquer composto manufaturado utilizado na agricultura visando prevenir ou reduzir efeitos adversos de pragas, com o objetivo final de aumentar a produção das culturas, aumentar a qualidade e reduzir custos de mão de obra (Silva & Fay, 2004).

Os agrotóxicos são divididos em diferentes classes, dentre as três principais encontram-se os inseticidas, fungicidas, herbicidas. Há ainda os rodenticidas, moluscicidas, acaricidas, algicidas e larvicidas. Ou ainda classificados a partir de seus princípios ativos, tais como: organofosforados, carbamatos, piretróides, organoclorados, dietilditiocarbamatos, bupiridilos, ácidos fenoxiacéticos, cloros e nitrofenóis e outros, como cumarinas, brometo de metila etc. (Chaves, 2007).

Entretanto, A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), sugere a classificação dos pesticidas quanto ao risco à saúde, baseados na dose letal de 50% (DL50) da população de ratos tratados por via oral ou dérmica (em mg/kg de peso vivo), sendo assim classificados no quadro 1.

QUADRO 1– Classificação dos pesticidas pela Organização Mundial da Saúde

DL 50 para ratos (mg/kg de peso vivo)					
Classe	Toxicidade	Oral		Dérmica	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia	Extremamente tóxico	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Ib	Altamente tóxico	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 – 400
II	Moderadamente tóxico	50 - 500	200 – 2000	100 – 1000	400 – 4000
III	Levemente tóxico	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

\*FONTE: OMS (2010)

As funções básicas dos agrotóxicos na agricultura incluem a elevação da produção com aumento da produtividade, a melhoria da qualidade dos produtos e redução de custos. Sem dúvida esses objetivos foram alcançados nas últimas décadas. No entanto, o uso indiscriminado e pouco criterioso de agrotóxicos trouxe e continua trazendo problemas muito sérios para o ambiente e à saúde humana (Coutinho *et al.*, 2005).

## 2.2 Pesticidas Como Agentes Genotóxicos

Os pesticidas são classificados como carcinógenos completos por serem genotóxicos e modificarem qualitativa e quantitativamente a informação genética celular (Trosko, 2001). Em altas doses, causam toxicidade e proliferação celular, aumentando a replicação do DNA e influenciando a atividade carcinogênica. Entretanto, o surgimento da célula neoplásica e a localização tumoral dependerão principalmente da via de absorção (e metabolização), de alguns fatores ambientais e dos fatores inerentes ao indivíduo (Santos *et al.*, 2008).

Estudos de monitoramento genético apontam que trabalhadores expostos aos pesticidas possuem dano genético associado a altos níveis de exposição e uso intensivo, devido à má utilização e falta de mecanismos de

controle. Além disso, a extensão do efeito genotóxico pode ser influenciada pela dose e duração da exposição a produtos químicos altamente reativos (Bolognesi & Morasso, 2000). Nesse contexto, os pesticidas também podem alterar o funcionamento de diversos sistemas, como o endócrino (McKinlay *et al.*, 2008).

## 2.3 Testes de Genotoxicidade

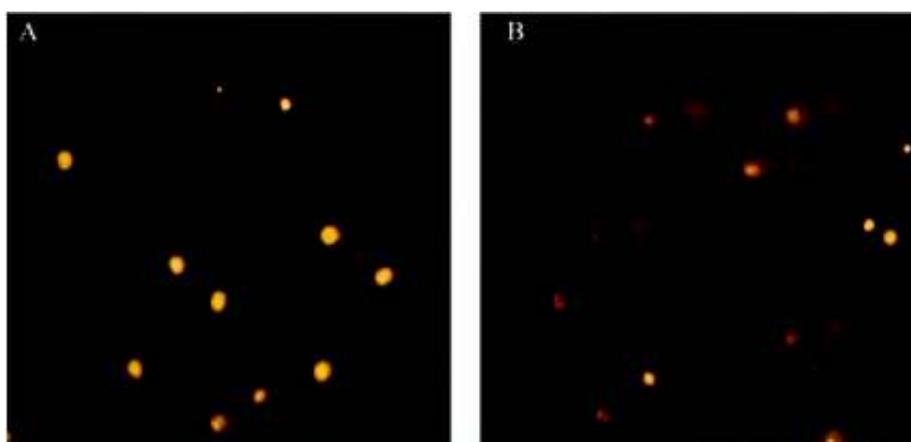
### 2.3.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa é utilizado para detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Uma vez que danos no DNA são frequentemente célula e tecido específicos, uma metodologia como o ensaio do cometa que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos. O ensaio do cometa consiste na lise celular, relaxamento do DNA e eletroforese, sendo possível observar após coloração, os fragmentos de DNA provindos da quebra causada pelo agente xenobiótico, que, ao serem submetidos à eletroforese “correm” formando uma cauda (Collins *et al.*, 1995).

O teste do cometa também é conhecido como SCGE (*single cell gel electrophoresis*) e foi introduzido primeiramente por Östling & Johanson em 1984 como uma técnica micro-eletroforética para visualização direta de danos no DNA em células individuais. Desde a sua introdução, o teste sofreu algumas modificações dentre a mais notável, destaca-se a versão alcalina, a qual a corrida eletroforética é realizada em pH>13 devido ao elevado pH, a dupla fita do DNA se desnatura e conseqüentemente, possibilita avaliar também quebras de fita simples além de sítios álcali-labeis que são suscetíveis a altos pHs, rompendo a ligação fosfodiéster do esqueleto do DNA, gerando quebras de fitas simples e/ou duplas. Contudo, essas lesões primárias são passíveis de reparo e podem ou não resultar em alterações genéticas (Collins *et al.*, 1997).

Durante a última década, o teste tem sido extensivamente utilizado para a avaliação e identificação de atividades genotóxicas ou protetoras de diversos compostos químicos. Além disso, o teste também é muito útil para avaliação de risco de populações ocupacional ou ambientalmente expostas a diversos xenobióticos (Fairbairn *et al.*, 1995)

Este teste possui vantagens como simplicidade, rapidez e relativo baixo custo, além de diferir de outros ensaios que detectam danos no DNA por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo assim, sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas. Além disso, o fato do ensaio possibilitar o acesso às quebras do DNA de uma única célula, poucos milhares de células (de 1 a 10.000 células) são suficientes para sua realização (Gontijo & Tice, 2003).



### 2.3.2 Teste do micronúcleo

O micronúcleo (MN) é formado durante a mitose por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que não foram incorporados ao núcleo durante este processo, sendo o MN um núcleo adicional e separado do núcleo principal. A sua formação ocorre devido a alterações espontâneas na estrutura do cromossomo ou a fatores ambientais (Fenech *et al.*, 1999).

O teste do micronúcleo permite identificar um aumento na frequência de mutação em células, que são expostas a diferentes agentes genotóxicos. Diversos estudos comprovaram a eficácia do teste do micronúcleo como indicador de danos citogenéticos em células do epitélio de revestimento oral,

onde, um aumento da frequência de micronúcleos na mucosa oral, é indicativo de elevação das taxas de mutação e está relacionada ao desenvolvimento de carcinomas da mucosa oral (Carvalho *et al.*, 2002) e também pelo epitélio oral estar em constante contato com agentes ambientais (genotóxicos), portanto é um sítio alvo importante para substâncias tóxicas inaladas ou ingeridas (Carrard *et al.*, 2009).

O teste do micronúcleo é considerado um procedimento rápido, barato, não invasivo e permite o monitoramento de danos genéticos em populações humanas (Ceppi *et al.*, 2010).

O uso de biomarcadores que determinem relações entre a exposição a contaminantes genotóxicos e o aumento do risco em indivíduos e populações pode ser um meio para diminuir os danos à saúde (Chaves, 2007; Majer *et al.*, 2001).

As principais vantagens do teste do micronúcleo em relação ao da análise de aberrações cromossômicas são simplicidade e rapidez com a mesma sensibilidade (Kliesch & Adler, 1980). Além disso, o micronúcleo pode ser visualizado durante a interfase quando um número ilimitado de células é contado. Os micronúcleos formados durante a divisão celular persistem pelo menos, até a interfase seguinte, de modo que a fase de coleta do material é menos crítica e a frequência espontânea de micronúcleos é baixa e quase uniforme nas diferentes espécies; também, não é necessário um cariótipo favorável para a análise. O micronúcleo é facilmente reconhecido em análise citogenética e permite avaliar efeitos clastogênicos e aneugênicos (Heddle *et al.*, 1983), tornando-se prioritário em análise epidemiológica de mutagenicidade. O teste do micronúcleo também pode ser utilizado para monitorar indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes genotóxicos, apontando para a necessidade de implementação de medidas de segurança e remanejamento de tarefas.

### **3. OBJETIVOS E METAS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Realizar análises de genotoxicidade e mutagenicidade em trabalhadores de cooperativas agrícolas de municípios goianos, expostos ocupacionalmente a pesticidas, a fim de verificar prováveis alterações genéticas e genômicas.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar prováveis danos ao DNA dos trabalhadores pelo ensaio cometa;
- Avaliar o potencial mutagênico dos agrotóxicos em trabalhadores rurais pela técnica de micronúcleo;
- Analisar o tempo e os tipos de agrotóxicos mais utilizados pelos trabalhadores rurais por meio de um questionário de estilo de vida;
- Realizar um levantamento do uso de EPI's e correlacionar com a frequência das alterações encontradas;
- Associar hábitos sociais e dados clínicos dos trabalhadores agrícolas com as alterações encontradas.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Delineamento do Estudo**

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle, delineado para avaliar o efeito do uso crônico de pesticidas, em trabalhadores rurais, com relação à frequência de micronúcleos e células binucleadas, além de danos genômicos, quando comparados com um grupo controle. O estudo foi conduzido no Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, em parceria com o LaGene – Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular do Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros da Secretaria de Saúde do Estado de Goiás. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da PUC Goiás, com o protocolo de número 1978/2011(Anexo I).

### **4.2. Grupo Amostral**

Para essa pesquisa, foram avaliados 41 trabalhadores rurais com histórico de exposição ocupacional a pesticidas. Esses trabalhadores foram selecionados em nove municípios do Estado de Goiás, como demonstrado na figura 1.

Os indivíduos foram escolhidos aleatoriamente e as amostras obtidas voluntariamente, de acordo com o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II). Dados como sexo, idade, estado civil, número de filhos, tabagismo, etilismo, tipo de agricultura, função ocupacional, tempo de contato com pesticida, tipo de pesticida utilizado e eventos de intoxicação, foram obtidos por meio da aplicação de um questionário (Anexo III), no momento da coleta de material biológico.

As entrevistas e as coletas das amostras biológicas (sangue e raspado de células da mucosa oral) foram realizadas nos municípios indicados (Figura 1) e também nas Centrais de Abastecimento (CEASA – GO) de Goiânia e Anápolis. Como grupo controle, foram selecionados 32 homens goianos que

apresentaram as mesmas condições sócio-ambientais que os trabalhadores rurais e que nunca sofreram exposição a pesticidas.

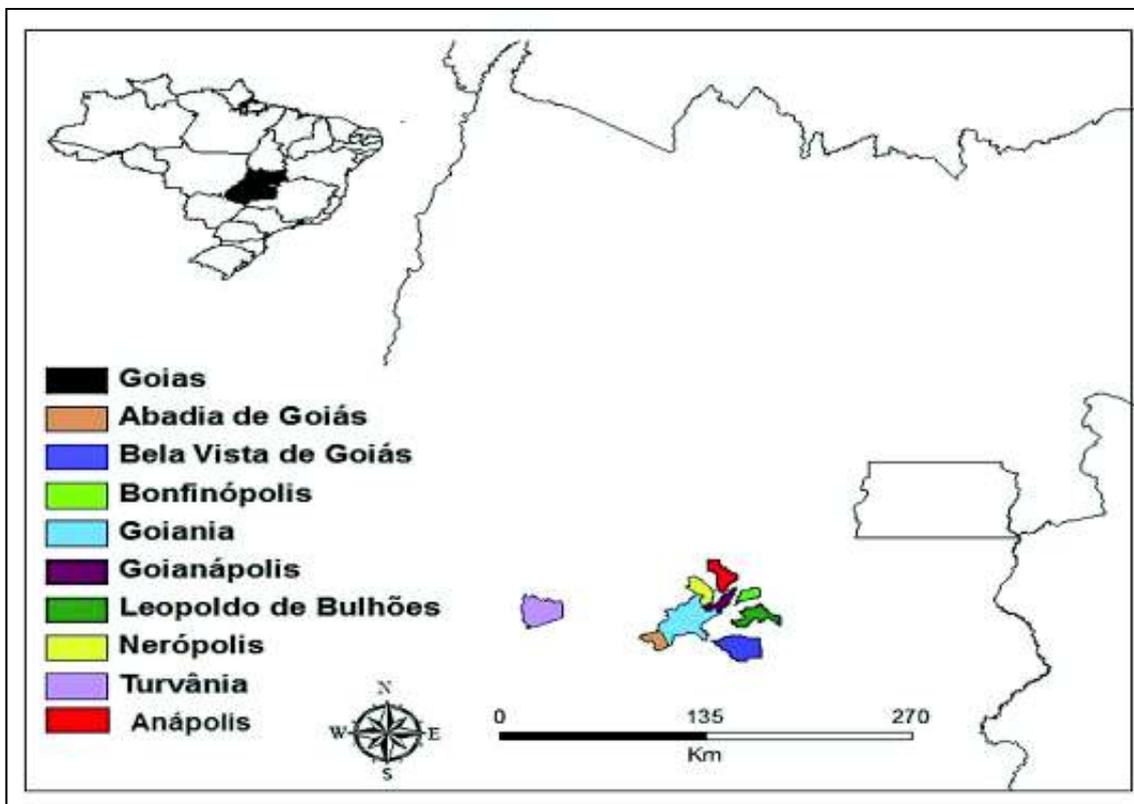


Figura 1– Mapa ilustrativo dos municípios do Estado de Goiás, nos quais foram realizadas as coletas de material biológico, dos trabalhadores rurais envolvidos nessa pesquisa.

### 4.3 Ensaio Cometa

Para a realização do ensaio cometa, as lâminas foram preparadas com uma pré-cobertura de agarose “*Normal Melting*” a 1,5%. Foram coletados 10  $\mu$ L de sangue de cada indivíduo e diluídos em 1ml de tampão PBS em tubo plástico tipo eppendorf de 2 ml. Em seguida foram retirados 10  $\mu$ L desta solução e embebidos em 120  $\mu$ L de agarose “*Low Melting Point*” a 0,5%, a qual estava em banho Maria a 37°C. Essa mistura foi colocada em lâmina preparada com a pré-cobertura de agarose “*Normal Melting*” 1,5% e coberta com uma lamínula. As lâminas foram colocadas na geladeira a 4°C durante dois minutos para que houvesse a solidificação do material. Após esse tempo

as lamínulas foram retiradas e as lâminas então foram imersas em tampão de lise por até 24 horas.

Após 24 horas as lâminas foram retiradas da lise e colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese, incubadas em tampão alcalino deixando descansar por 30 minutos. A corrida eletroforética foi realizada por 25 minutos, a 25 volts e 300 Amps. A neutralização foi feita com uma solução Tampão Tris a 0,4 M (pH 7,5) por três vezes, durante 5 minutos.

Após a neutralização essas lâminas foram lavadas duas vezes com água destilada e colocadas para secar na posição inclinada. A fixação foi feita com etanol absoluto por 5 minutos e o DNA foi corado com 20 µL da solução de brometo de etídio a 10 ng/ul. Após a fixação a lamínula foi novamente colocada sobre a lâmina deixando descansar por aproximadamente 5 minutos. Após esse tempo essas lâminas foram analisadas sob microscopia de epifluorescência, utilizando um conjunto de filtros de excitação 515-560 nm, para fluorescência vermelha. Os núcleos das células foram visualizados utilizando a objetiva de 10X e a imagem fluorescente foi captada utilizando o “software” ISIS®.

Foram analisadas duas lâminas para cada indivíduo e foram contadas, ao todo, 100 células por indivíduo, as quais foram avaliadas com o auxílio do programa “Comet score” versão 1.5 no qual foram analisados quatro parâmetros relacionados a danos genômicos:

- Comprimento da cauda do cometa (CC)
- Porcentagem de DNA na cauda (PDCA): pode ser calculada com a fórmula

$$\% \text{DNA}_T = \frac{100 \text{DNA}_T}{(\text{DNA}_T + \text{DNA}_H)}$$

$\text{DNA}_H$ = Porcentagem de DNA na cabeça

$\text{DNA}_T$ = Porcentagem de DNA na cauda

- Momento da cauda de Olive (COM),  $M_T$ : é o produto do comprimento da cauda e da fração de DNA na cauda ( $\text{DNA}_T$ ) podendo ser calculado com a fórmula  $M_T = l_T \cdot \% \text{DNA}_T$ , na qual  $l_T$ =Comprimento da cauda

- Momento da cauda do cometa (MC).

#### 4.4 Teste de Micronúcleo

A coleta de células da mucosa oral dos trabalhadores rurais foi realizada por meio de um abaixador de língua, retirando-se a amostra do epitélio jugal direito e esquerdo, após um enxágüe bucal realizado com água, com a função de retirar material bruto que pudesse constituir um artefato no momento da análise microscópica.

As células de todos os indivíduos foram coletadas de sítios da mucosa oral com ausência de ulcerações e outras lesões visíveis. Foram excluídos os que apresentaram doenças bucais visíveis.

O raspado com células da mucosa oral foram espalhadas sobre as lâminas devidamente limpas com álcool 99,5°GL. O esfregaço foi confeccionado à temperatura ambiente, sendo posteriormente fixado em álcool a 99,5°GL por 15 minutos.

A hidrólise foi realizada num título de 1:10 (10%), usando-se 20mL de ácido clorídrico (HCL) e 200mL de água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). O volume indicado foi suficiente para 10 lâminas. As lâminas foram deixadas na solução de HCL 10% por 2 minutos, à temperatura ambiente e em seguida por 6 minutos no banho-maria à 60°C. Logo as lâminas foram levadas de volta a temperatura ambiente por 2 minutos novamente.

Após a hidrólise as lâminas foram mergulhadas em solução de fucsina básica por 15 minutos ao abrigo da luz e logo depois, enxaguadas levemente com água para retirar o excesso de corante. Em seguida, as lâminas foram levadas a solução de *Fast Green* por 10 segundos. Passado esse tempo as lâminas foram enxaguadas com álcool a 70%.

A análise foi feita por microscopia óptica normal, com aumento de 10x e 40x, que consistiu de uma avaliação de no mínimo 1000 células de cada duplicata da amostra.

As amostras foram processadas conforme o protocolo descrito por Souto *et al.*, 2010.

Foram avaliadas as células e os micronúcleos de acordo com os seguintes critérios:

- Perímetro redondo que sugere uma membrana;
- Ter menos que um terço do diâmetro do núcleo principal, mas grande o suficiente para discernir a forma e a cor;
- Feulgen positivo, coloração rosa em um campo iluminado;
- Intensidade de coloração similar ao do núcleo;
- Textura similar ao do núcleo;
- Mesmo plano focal que o núcleo;
- Ausência de sobreposição, ou ligação com o núcleo.

Além disso, outras alterações nucleares que indicam danos no DNA, como a quantidade de células binucleadas também foram analisadas (Figura 2).

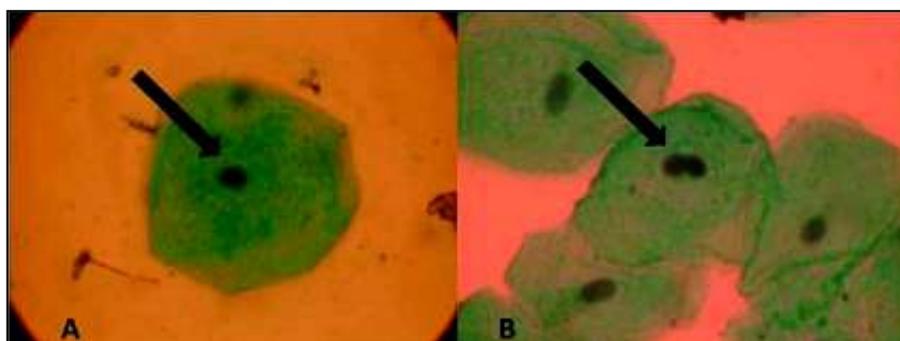


Figura 2 - A) Micronúcleo (seta); B) Célula binucleada (seta)  
Fonte: Núcleo de Pesquisas Replicon/PUCGO

#### 4.5 Análise Estatística

Os hábitos de vida do grupo exposto, assim como a idade, número de filhos e demais variáveis, coletadas com a aplicação do questionário (anexo III) foram plotados em planilhas do excel, sendo correlacionadas com as frequências de micronúcleo, frequências de células binucleadas e com os danos genômicos, avaliados pelo ensaio cometa. Nessas análises foram verificadas se a frequência de micronúcleo e de células binucleadas, assim como os danos genômicos, estariam associados com o uso crônico de

pesticidas. Além disso, foi verificado se o tabagismo, etilismo e o tempo de uso dos pesticidas também seriam capazes de aumentar os índices de dano ao genoma dos trabalhadores, quando comparados com o grupo controle. As análises incluíram estatística descritiva, teste t e Regressão Linear Simples. Todos os testes foram conduzidos com nível de significância de  $p < 0,05$  e intervalo de confiança de 95%, com o uso do programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*,2003).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Distribuição do Grupo Amostral

A seleção dos trabalhadores que compuseram este estudo foi feita em nove municípios goianos, conforme descrito na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1– Distribuição do grupo amostral por município

Município	Quantidade de trabalhadores (n)	Porcentagem (%)
Abadia de Goiás	3	7,32
Anápolis	1	2,44
Bela Vista de Goiás	10	24,39
Bonfinópolis	1	2,44
Goianápolis	3	7,32
Goiânia	1	2,44
Leopoldo de Bulhões	1	2,44
Nerópolis	1	2,44
Turvânia	20	48,78

### 5.2 Principais Atividades Agrícolas dos Municípios Amostrados

Informações referentes às atividades agrícolas dos municípios amostrados foram obtidas a partir dos dados contidos na página eletrônica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012) e encontram-se no quadro 2.

QUADRO 2– Principais atividades agrícolas desenvolvidas nos municípios dos trabalhadores entrevistados

Município	Lavouras Permanentes	Lavouras Temporárias
Abadia de Goiás	Não informado	Arroz, mandioca, milho, soja e tomate
Anápolis	Banana, café, coco-da-baía, laranja, maracujá, palmito e tangerina	Arroz, cana-de-açúcar, mandioca, milho, soja e tomate
Bela Vista de Goiás	Coco-da-baía, palmito, tangerina e uva	Arroz, cana-de-açúcar, mandioca, milho, soja e tomate
Bonfinópolis	Banana, laranja e palmito	Arroz, mandioca, milho e tomate
Goianápolis	Banana, laranja e tangerina	Arroz, mandioca, milho, soja e tomate
Goiânia	Café, coco-da-baía, laranja, limão, palmito e tangerina	Cana-de-açúcar e mandioca
Leopoldo de Bulhões	Banana, café, laranja, maracujá e palmito	Arroz, batata, cana-de-açúcar, feijão, mandioca, milho, soja, sorgo e tomate
Turvânia	Banana	Arroz, cana-de-açúcar, feijão, mandioca, milho, soja e tomate

\* FONTE: IBGE (2012).

### 5.3. Estatística Descritiva do Grupo Amostral

As idades e os hábitos de vida dos trabalhadores rurais selecionados para esse estudo podem ser visualizados na tabela abaixo (Tabela 2). O grupo controle utilizado nesse estudo apresentou a mesma faixa etária e os mesmos hábitos sociais do grupo exposto.

Tabela 2 - Sexo, Idade e hábitos de vida dos 41 trabalhadores rurais selecionados.

Variáveis	N (%)
Sexo	
Homens	39 (95,1%)
Mulheres	2 (4,9%)
<b>Total</b>	<b>41 (100%)</b>
Idade (anos)	
≤ 25	7 (17,1%)
26-50	22 (53,7%)
> 51	12 (29,3%)
<b>Total</b>	<b>41 (100%)</b>
Tabagismo	
Fumantes	10 (24,4%)
Não fumantes	31 (75,6%)
<b>Total</b>	<b>41 (100%)</b>
Etilismo	
Etilistas	31 (75,6%)
Não etilistas	10 (24,4%)
<b>Total</b>	<b>41 (100%)</b>

Quanto ao alimento cultivado, 23 trabalhadores (56,1%), lidavam com mais de um tipo de alimento, tais como abóbora, arroz, feijão, jiló, maracujá, melancia, milho, pepino, soja e tomate. O restante dos agricultores trabalhava em monoculturas de tomate 19,5% (8), soja 9,8% (4), banana 2,4% (1) e também horta em casa 1,2% (5). As funções dos trabalhadores no manuseio dos pesticidas foram aplicar o produto 9,8% (4), aplicar e manipular 75,6% (31), manipular 2,4% (1) e sem contato direto com o pesticida 12,2% (5). O tempo de exposição dos agricultores aos pesticidas está descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Tempo de exposição dos agricultores aos pesticidas

	Anos de Exposição				
	≤1	≤10	≤20	≤30	>30
n	9	6	13	7	6
%	22,0	14,6	31,7	17,1	14,6

O uso de EPIs foi descrito por 56,1%, ou seja, 23 trabalhadores, enquanto que 18 (43,9%), não usavam qualquer tipo de proteção. Ao avaliar a exposição aos pesticidas, foi observado que os agricultores estavam expostos a mais de um tipo de agrotóxico, sendo que alguns trabalhavam expostos a até seis diferentes produtos (Tabela 4).

Tabela 4 - Quantidade de pesticidas aos quais os trabalhadores selecionados foram expostos

	Quantidade de pesticidas (unidade)						
	1	2	3	4	5	6	7
n de expostos	18	13	4	1	3	1	1
% de expostos	43,9	31,7	9,8	2,4	7,3	2,4	2,4

Os três principais compostos químicos descritos pelos trabalhadores encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Descrição dos principais pesticidas a que os agricultores foram expostos

Princípio Ativo	Função	Classe	Classificação Toxicológica
Glifosato	Herbicida	Glifosato	III - Medianamente Tóxico
Fenpropatrina	Inseticida	Piretroide	II - Moderadamente Tóxico
Carbofurano	Inseticida	Metilcarbamato de benzofuranila	Ib – Altamente Tóxico

Os demais compostos químicos relatados foram: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, hidróxido de cobre, paration metálico azoxistrobina, lambda-cialotrina, cloridrato de cartape, clorfenapir, abamectina, acetamidrido, carbaril, cloridrato de kasugamycina, hexaclorocicloexano, metamidofós, permetrina, piraclostrobina, profenofós, tiametroxam+lambda-cialotrina e tiofanato metílico.

Alguns entrevistados não souberam responder qual era a base química dos produtos utilizados, restringindo-se a dizer que trabalhavam com inseticida, fungicida, herbicida ou usavam vários produtos ao mesmo tempo.

Episódios de intoxicação foram descritos por 12 (29,3%) dos entrevistados, cujos principais sinais foram: dores no corpo e de cabeça, náuseas, vômitos, tonturas, tremores, indisposição, irritação, alteração da pele e desmaios. Do total de trabalhadores que relataram sinais de intoxicação, apenas 12 (58,3%) não utilizavam EPIs.

#### 5.4 Ensaio Cometa

Esse ensaio foi realizado em 21 indivíduos do grupo exposto e nos 32 indivíduos do grupo controle. Para a avaliação do dano genômico, foram avaliados 04 parâmetros, como descrito na tabela 6. As médias e os desvios padrão de cada um dos parâmetros foram obtidos tanto no grupo exposto, quanto no controle.

Tabela 6 - Avaliação do ensaio cometa nos trabalhadores expostos a pesticidas e grupo controle

		CC	PDCA	MC	MCO
<b>Expostos</b>	Média	4,9	5,71	0,18	0,54
	Desvio	1,81	1,63	0,13	0,21
<b>Controle</b>	Média	3,82	1,13	0,02	0,09
	Desvio	2,34	1,25	0,04	0,13

CC= Comprimento da cauda; PDCA= Porcentagem de DNA na cauda; MC= Momento da cauda; MCO= Momento da cauda de Olive.

Quanto ao parâmetro comprimento da cauda (CC), o teste t não detectou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos exposto e controle, a um nível de significância de 0,05 e intervalo de confiança de 95% ( $p=0,2$ ). Já para o parâmetro porcentagem de DNA na cauda (PDCA), foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos exposto e controle, no teste t ( $p < 0,0001$ ), indicando que os trabalhadores rurais apresentaram mais danos genômicos quando comparados com o grupo controle, conforme demonstrado na figura abaixo (Figura 3).

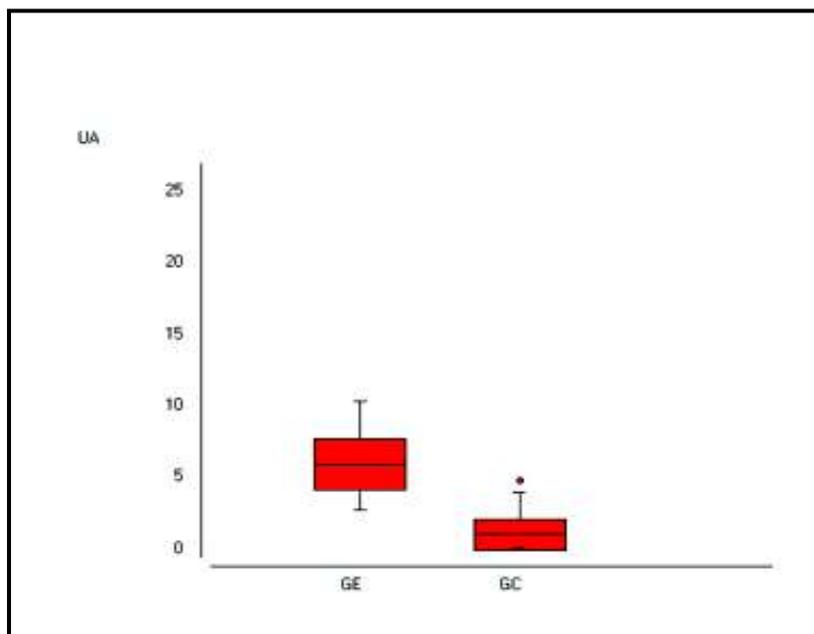


Figura 3 - Desvios padrão dos grupos exposto e controle quanto ao parâmetro PDCA. UA: unidades arbitrárias; GE: grupo exposto; GC: Grupo controle.

Em relação ao momento da cauda (MC), também foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos exposto e controle ( $p > 0,0001$ ), também indicando maiores índices de danos genômicos nos trabalhadores rurais expostos a pesticidas, desse estudo (Figura 4).

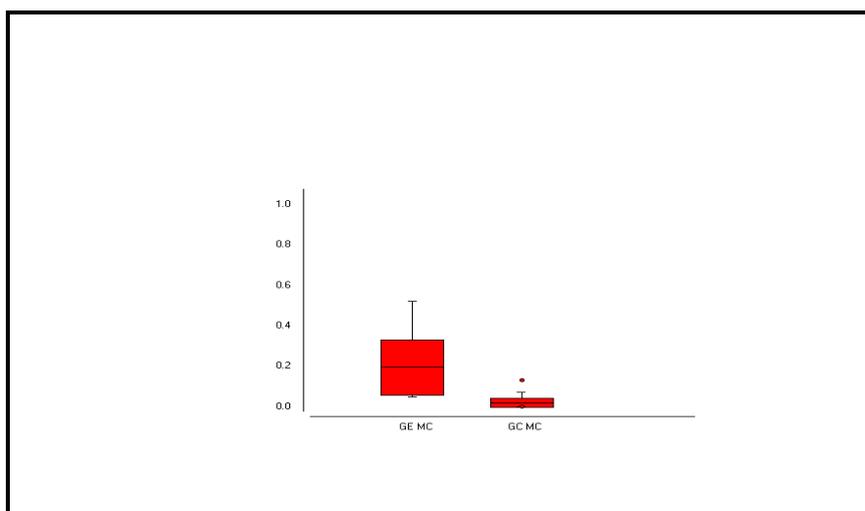


Figura 4 - Desvios padrão dos grupos exposto e controle quanto ao parâmetro MC. GE MC: grupo exposto quanto ao momento da cauda; GC MC: Grupo control quanto ao momento da cauda.

Finalmente, para o parâmetro MCO, também foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) entre os grupos controle e exposto, indicando mais uma vez, maiores danos genômicos no grupo exposto, em relação aos indivíduos não expostos.

Os indivíduos etilistas e tabagistas do grupo exposto não apresentaram maiores índices de CC, PDCA, MC e MCO, quando comparados com os expostos não fumantes, de acordo com o teste t. Nesse contexto, os valores de p foram de 0,14; 0,12; 0,37 e 0,31, respectivamente.

### 5.5 Teste de Micronúcleo

A distribuição de MNs nos grupos exposto e controle pode ser visualizada na figura abaixo (Figura 5).

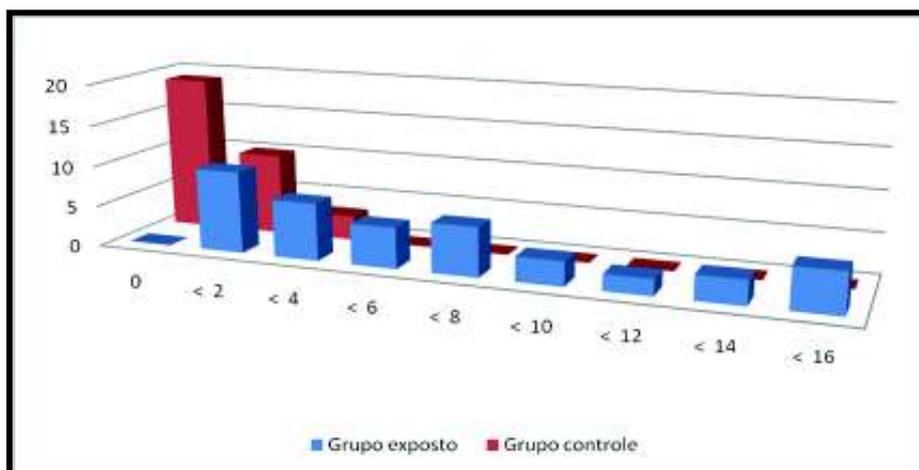


Figura 5 - Distribuição dos MNs nos grupos exposto e controle.

No grupo exposto, a frequência de MN foi de 0,008, enquanto no grupo controle, a frequência foi de 0,001, indicando que o grupo exposto apresentou, aproximadamente, 8x mais micronúcleos que o grupo controle. Assim, foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, quanto ao número de micronúcleos, de acordo com o teste t ( $p < 0,0001$ ).

A distribuição de células binucleadas, nos grupos exposto e controle, pode ser visualizada na figura abaixo (Figura 6), sendo detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, de acordo com os resultados do teste t ( $p < 0,0001$ ). Além disso, a frequência de células binucleadas foi de 0,04

e 0,005, nos grupos exposto e controle, respectivamente, indicando um aumento de 20x no número de células binucleadas dos indivíduos expostos, em relação aos controles.

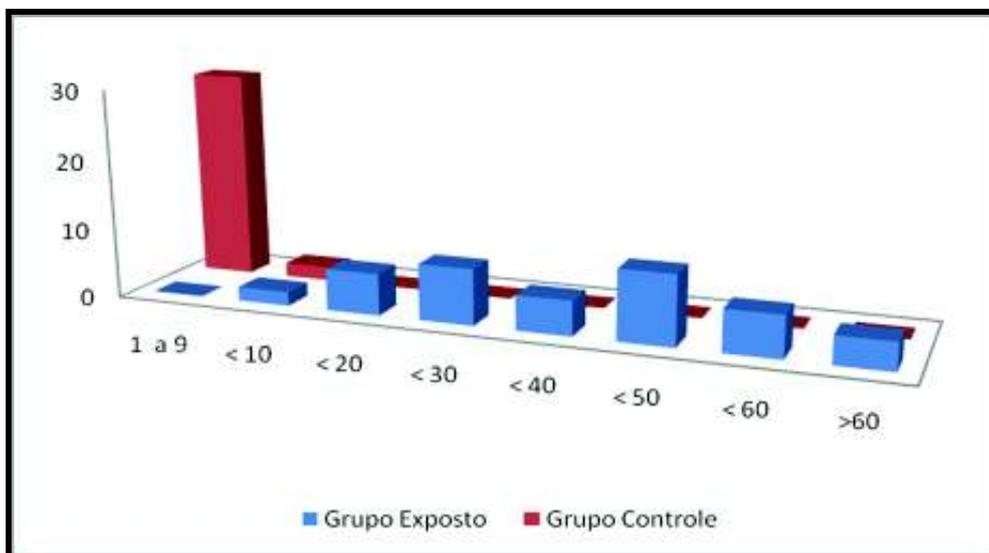


Figura 6 - Distribuição de células binucleadas nos grupos exposto e controle.

A análise de regressão linear simples não detectou diferenças estatisticamente significativas entre idade e quantidade de micronúcleos no grupo exposto ( $F = 0,03$  e  $p = 0,86$ ), assim como entre idade e quantidade de células binucleadas nesse grupo ( $F = 0,37$  e  $p = 0,55$ ). Também não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre a quantidade de micronúcleo e de células binucleadas quando relacionadas com o tempo de exposição ao agrotóxico, com tabagismo e etilismo ( $p > 0,05$ ).

Com relação ao uso de EPI's e quantidade de micronúcleos, os indivíduos que utilizavam tais equipamentos apresentaram, em média, 7,5 MNs (variância de 57%) e os que não utilizavam, apresentaram, em média, 12,1 MNs (variância de 130%) (Figura 7). Nesse sentido, o teste t demonstrou um  $p$  de 0,06 quando os dois grupos foram comparados, indicando que o uso de EPI's, pode ter um efeito protetor contra agentes mutagênicos e genotóxicos, a 6%. No entanto, essa tendência não foi observada ao se comparar a

quantidade de células binucleadas entre os que utilizavam ou não EPI's ( $p=0,12$ ).

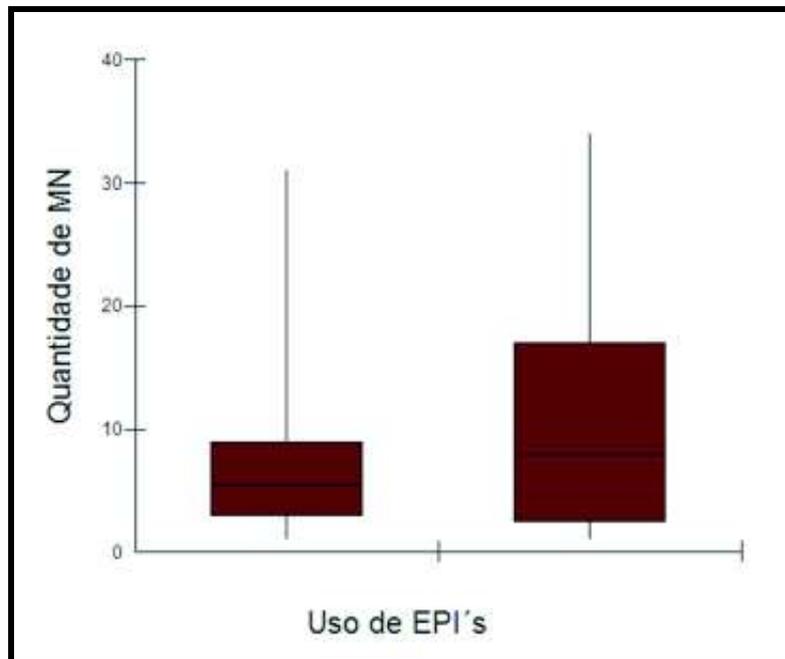


Figura 7 - Associação entre a quantidade de MN e o uso de EPI's. À esquerda: com EPI's; à direita: sem EPI's.

## 6. DISCUSSÃO

No período de 1999 a 2003 houve um aumento de 27% no número de casos e 6% no número de óbitos decorrentes de intoxicação por agrotóxicos de uso agrícola registrados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), e considerando todos os tipos de intoxicações (agrotóxicos de uso agrícola, doméstico e raticidas) a região Centro-Oeste obteve um aumento de 62% no número de casos registrados (Bochner, 2007).

No presente estudo, 29,3% dos entrevistados relataram episódios de intoxicação, estando de acordo com os dados nacionais, os quais indicaram que circunstâncias ocupacionais foram responsáveis por 29,1% das intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola (Bochner, 2007).

Diversos tipos de câncer são relatados em pessoas expostas a pesticidas. Há relatos de doença de Parkinson em pessoas expostas à glifosato (Alavanja *et al.*, 2004) e este herbicida foi utilizado com maior frequência no presente estudo e também causou maiores sinais de intoxicação, como evidenciado anteriormente.

Profissionais de saúde relatam até uma possível “endemia de depressão” em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos (Levigard & Rozemberg, 2004). No presente estudo diversos sinais neurológicos foram relatados pelos agricultores.

Em um estudo na região Centro-Oeste, Caires & Castro (2002), relataram que a maioria dos pesticidas utilizados no Município de Alta Floresta (MT), foi classificada como altamente tóxica com destaque para os princípios ativos glifosato e ácido 2,4-diclorofenoxiacético, resultados semelhante ao presente estudo.

Entre os trabalhadores rurais de Serra Gaúcha (RS), Faria *et al.* (2004), observaram que 35% não utilizavam nenhum tipo de EPI, e que a adesão ao uso era menor entre os trabalhadores mais velhos. Os pesticidas à base de carbamatos (28%) e glifosatos (16%) foram responsáveis pela maioria das intoxicações, entretanto somente 4% das intoxicações foram notificadas ao SINITOX.

No estado de Goiás há uma preocupação relacionada ao uso exagerado de pesticidas na cultura de tomate. No presente estudo 19,5% dos

trabalhadores afirmaram trabalhar exclusivamente nesta cultura. Entretanto, o uso de pesticidas como organofosforados e até mesmo agrotóxicos não recomendados para o tomate podem expor os agricultores a riscos de intoxicação (Latorraca *et al.*, 2008), assim como há relação entre exposição aos organofosforados e câncer de pulmão (Lee *et al.*, 2004).

Assim como os resultados obtidos neste trabalho, estudos utilizando o ensaio cometa com material genético de trabalhadores expostos a pesticidas na Croácia, evidenciaram o aumento de danos genéticos quando comparados aos controles. Após o teste, os trabalhadores foram retirados de contato com pesticidas por seis meses e ao realizar novos testes, foi comprovado que os danos genéticos permaneciam elevados em relação ao grupo controle, demonstrando o carácter crônico da exposição a pesticidas (Garaj-Vrhovac & Zeljezic, 2000). Assim como Juffo *et al.* (2009) evidenciaram o aumento do índice e frequência de danos genéticos em fumicultores do Rio Grande do Sul, o tempo decorrido da última aplicação não influenciou o resultado do ensaio cometa.

A exposição de agricultores a pesticidas, no estado do Piauí, elevou o índice e frequência de danos genéticos ( $p < 0,0001$ ), quando comparada ao grupo controle, pelo ensaio cometa (Carvalho *et al.*, 2010), assim como demonstrado nesse estudo, no qual dos 04 parâmetros de danos analisados, 03 apresentaram maiores índices, em relação ao grupo controle. Nesse contexto, o efeito cumulativo da exposição de agricultores a pesticidas pode resultar em efeito genotóxico (Agopian *et al.*, 2009), como detectado nesse estudo.

O aumento do número de micronúcleos em floricultores da Itália esteve relacionado ao aumento do uso de pesticidas, número de pesticidas genotóxicos utilizados (misturas) e tempo de exposição (Bolognesi *et al.*, 2004), sendo os pesticidas mais utilizados os organofosforados (39,1%) e carbamatos (24,4%). No presente estudo o tipo de pesticida não influenciou a quantidade de micronúcleos ou células binucleadas, mesmo tendo demonstrado um aumento considerável, tanto de micronúcleos, quanto de células binucleadas no grupo exposto, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ).

Ao avaliar trabalhadores de cultura de soja pelo teste de micronúcleo, Bortoli *et al.* (2009), também evidenciaram um aumento no número de

micronúcleos em trabalhadores expostos a pesticidas ( $p < 0.05$ ), entretanto, o uso de EPIs não influenciou o número de micronúcleos, informação justificada pelos autores como uma falha entre o que foi reportado ao estudo e a realidade das condições de trabalho. No presente estudo os trabalhadores que não utilizavam EPIs apresentaram, em sua maioria, maior distribuição de micronúcleos e um aumento de 137% em relação aos que usavam EPIs. Trabalhadores de culturas de soja e milho, da região de Passo Fundo (RS), também tiveram aumentos significativos de micronúcleos, quanto expostos a pesticidas (Pacheco & Hackel, 2002).

Em um estudo com trabalhadores rurais em Portugal, a população exposta a pesticidas obteve um aumento de micronúcleos quando comparada ao grupo controle ( $p < 0,001$ ), e o não uso de EPIs, especialmente luvas, contribuíram para o maior número de micronúcleos nos indivíduos expostos aos pesticidas (Costa *et al.* 2007).

Foram relatados aumentos de micronúcleos e células binucleadas em populações residentes em áreas contaminadas por pesticidas na Turquia (Ergene *et al.*, 2007). Assim como em trabalhadores expostos a pesticidas no México, quando comparados aos controles (Martínez-Valenzuela *et al.*, 2009). Trabalhadores de indústrias de pesticidas também estão altamente expostos a danos genéticos, evidenciado pelo aumento de micronúcleos nesta classe de profissionais (Sailaja *et al.*, 2006).

No presente estudo fatores como idade, tabagismo, etilismo e tempo de exposição aos pesticidas não influenciaram na quantidade de micronúcleos, de células binucleadas e nos parâmetros relacionados a danos genômicos, analisados no ensaio cometa, assim como demonstrado por outros grupos (Bortoli *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2007; Ergene *et al.*, 2007; Martínez-Valenzuela *et al.*, 2009; Pacheco & Hackel, 2002; Sailaja *et al.*, 2006).

O fator idade deve ser visto com cautela quando relacionado ao aumento dos micronúcleos, uma vez que a idade contribui como maior causa de aumento dos mesmos. Em populações expostas a pesticidas, o aumento de micronúcleos nos indivíduos jovens pode estar relacionado mais precisamente à exposição química que estes sofreram do que indivíduos senis (Coskun *et al.*,

2011). No entanto, esse fator não contribuiu para um aumento do número de micronúcleos, como demonstrando anteriormente.

Nesse contexto, as diferenças entre resultados obtidos, por meio de monitoramento biológico, de grupos expostos a pesticidas podem refletir diferentes condições de exposição, tais como: magnitude de exposição, medidas de proteção, potencial genotóxico específico, tipo de cultura, fatores ambientais, fatores endógenos, formulação e potencial de absorção do pesticida, e técnica laboratorial utilizada. Por estes motivos, um estudo genotóxico desenvolvido em uma condição de risco ocupacional específico não pode ser extrapolado para outras situações em que ocorram riscos genéticos e ocupacionais envolvidos (Bortoli *et al.*, 2009; Coskun *et al.*, 2011).

Finalmente, a percepção de risco dos agricultores quando utilizam agrotóxicos, muitas vezes é negligenciada e pode expor os trabalhadores a risco intoxicação (Carvalho & Pignati, 2009), uma vez que muitos deles não conseguem interpretar os rótulos e bulas dos produtos (Moreira *et al.*, 2002). Outro agravante ocorre quando trabalhadores rurais são comparados a grupos maiores de trabalhadores expostos a substâncias de risco, problemas referentes a agricultores não tem sido prioridade das pesquisas na área de saúde, nem destaque nas políticas regulatórias em diversos países (Blair *et al.*, 1992). Com a aplicação exagerada de produtos químicos nas lavouras brasileiras, o uso de pesticidas está deixando de ser uma questão relacionada especificamente à produção agrícola e se transformando em um problema de saúde pública e preservação da natureza.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, essa pesquisa demonstrou que:

- O teste de micronúcleo e ensaio cometa são ferramentas valiosas para se avaliar danos genéticos em trabalhadores rurais expostos a pesticidas, uma vez que quando comparados ao grupo controle, os indivíduos expostos tiveram aumento de micronúcleos e danos no DNA avaliados pelo ensaio cometa.
- Pessoas expostas a pesticidas, independente de fatores como idade, tabagismo, etilismo, tempo de exposição e tipo de pesticidas, podem apresentar danos genéticos.
- O uso de equipamentos de proteção pessoal pode prevenir danos genéticos em trabalhadores expostos a pesticidas.
- Novos estudos devem ser desenvolvidos objetivando esclarecer as condições e fatores de risco para trabalhadores expostos a pesticidas.

## 8. REFERÊNCIAS

- 1- Agopian, J., Navarro, J. M., Gac, A. C., Lecluse, Y., Briand, M., Grenot, P., Gauduchon, P., Ruminy, P., Lebailly, P., Nadel, B., Roulland, S. 2009.** Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *The Journal of Experimental Medicine*. 206(7):1473-1483.
- agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 18(6):1675-1683.
- 2- Alavanja M. C. R., Hoppin J. A., Kamel F. 2004.** Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Ann Rev Public Health*; 25:155–197.
- 3- Alessi, N. P., Navarro, V. L. 1997.** Saúde e trabalho rural: o caso dos trabalhadores da cultura canavieira na região de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*; 13 (2): 111-121.
- 4- Avishai, N., Rabinowitz, C., Moiseeva, E., Rinkevich, B. 2002.** Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. *Mutation Research*. 518:21-37.
- 5- Ayres, M.; Ayres Jr, M; Ayres, D.L., Santos, A.S. 2003.** *BioEstat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém, Sociedade Civil Mamirauá.
- 6- Blair, A., Zahm, S. H., Pearce, N. E., Heineman, E. F., Fraumein-Jr., J. 1992.** Clues to cancer etiology from studies of farmers. *Scand J Work Environ Health*. 18:209-215.
- 7- Bochner, R. 2007.** Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*. 12(1):73-89.
- 8- Bolognesi, C., Landini, E., Perrone, E., Roggieri, P. 2004.** Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. *Mutation Research*. 557:109-117.
- 9- Bolognesi, C., Morasso, G. 2000.** Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. *Trends in Food & technology*. 11:182-187.

- 10- Bortoli, G. M., Azevedo, M. B., Silva, L. B. 2009.** Cytogenetic iomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutation Research*. 675:1-4.
- 11- Caires, S. M., Castro, J. G. D. 2002.** Levantamento dos agrotóxicos usados por produtores rurais do município de Alta Floresta – Mato Grosso. *Revista de Biologia da Terra*. 2(1):1-17.
- 12- Carrard V.C., Costa C. H., Lauxen L. A., Rados P. V. 2009.** Teste dos micronúcleos – Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa oral. *Res Fac Odontol*. 48 (1/3): 77-81.
- 13- Carvalho M. B., Ramirez A., Gattás J. F., Guedes A. L., Amar A., Rapoport A., Brarauna-Neto J. C., Curioni O. A. 2002.** Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 48(4): 317-322.
- 14- Carvalho, E. A., Pignati, W. A. 2009.** A percepção de risco dos trabalhadores rurais e agropecuaristas sobre o uso dos agrotóxicos de uma comunidade rural do município de Pontes e Lacerda MT. In: Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação *Lato Sensu* da Universidade Católica de Goiás. 4. Goiânia. p.1-22.
- 15- Carvalho, R.M., Gomes, D. C. V., Souza, A. P. C., Leite, A. S., Júnior, D. M. R., Rodrigues, V. R. C. B., Berrêdo, R. H. G., Moraes, M. E. A., Cavalcante, A. A. C. M., Chaves, T. V. S. 2010.** Estudos genotóxicos, bioquímicos e hematológicos em agricultores envolvidos em manejo de pesticidas no Piauí, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Genética. Guarujá. p.74.
- 16- Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., Bonassi, S. 2010.** Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutation Research*. 705:11-19.
- 17- Chaves T. V. S. 2007.** Avaliação do impacto do uso de agrotóxicos em trabalhadores rurais dos municípios de Ribeiro Gonçalves, Baixa Grande do Ribeiro e Uruçuí-Piauí / Tatiana Vieira Souza Chaves. 2007. 206 f.
- 18- Chester M. H., Adam A.V., Inkmann-Koch A, Litchfiel M. H., Sabapathy R, Tuiman C. 1993.** Field evaluation of protective equipment for pesticide applicators in a tropical climate. *Impact of Pesticide use on Health in Developing Countries*. Ottawa: International Development Research Centre. P. 116-23.

- 19- Chitra G. A., Muraleedharan V. R., Swaminathan T., Veeraraghavan D. 2006.** Use of pesticides and its impact on health of farmers in South India. *International Journal of Occupational and Environmental Health*. 12 (3):1-12.
- 20- Collins, A. R., Ai-Guo, M., Duthie, S. J. 1995.** The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research*. 336:69-77.
- 21- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R. 1997.** The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*. 375:183-193.
- 22- Coskun, M., Coskun, M., Cayir, A., Ozdemir, O. 2011.** Frequencies of micronuclei (MNi), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) in farmers exposed to pesticides in Çanakkale, Turkey. *Environmental International*. 37:93-96.
- 23- Costa, C., Silva, S., Coelho, P., Roma-Torres, J., Teixeira, J. P., Mayan, O. 2007.** Micronucleus analysis in a Portuguese population exposed to pesticides: Preliminary survey. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 210:415-418.
- 24- Coutinho C. F. B., Tanimoto S. T., Garbellini G. S., Takayama M., Amaral R. B., Mazo L.H., Avaca L. A., Machado S. A. S. 2005.** Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 15(0): 65-72.
- 25- Ergene, S., Celik, A., Cavas, T., Kaya, F. 2007.** Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environmental International*. 33:877-885.
- 26- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., O'Neill, K. L. 1995.** The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*. 339(1):37-59.
- 27- Falck, G. C.; Hirvonen, A.; Scarpato, R.; Saarikoski, S. T.; Migliore, L.; Norppa, H. 1999.** Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutation Research*. 441 (2): 225 – 37.
- 28- Faria, N. M. X., Facchini, L. A., Fassa, A. G., Tomasi, E. 2004.** Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. *Caderno de Saúde Pública*. 20(5):1298-1308.

- 29- Fenech M., Holland N., Chang W. P., Zeiger E., Bonassi S. 1999.** The HUman MicroNucleos Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*. 428: 271-283.
- 30- Garaj-Vrhovac, V., Zeljezic, D. 2000.** Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutation Research*. 469:279-285.
- 31- Gontijo, A. M. M. C., Tice, R. R. 2003.** Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 355p.
- 32- Gonzaga A. M., Blank V. L. G. 2005.** Processo de produção agrícola e saúde ambiental: a questão dos agrotóxicos. *Cadernos de Saúde Coletiva*. 13(4): 901-918.
- 33- Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., MacGregor, J. T., Newell, G. W., Salamone, M. F. 1983.** The induction of microcuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency gene: Tox Program. *Mutation Research*. 123(1):61-118.
- 34- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012.** Acessado em 03. Mar. 2012. <http://www.ibge.gov.br>
- 35- Juffo, D. D., Silva, F. R., Rohr, P., Kvitko, K., Silva, J. 2009.** Análise de genotoxicidade através do ensaio cometa em fumicultores gaúchos. X Salão de Iniciação Científica da PUCRS. p.300-303.
- 36- Kliesch, U., Adler, I. D. 1980.** Sensitivity comparison of chromosome analysis and micronucleus test in mouse bone marrow. *Mutation Research*.74:160.
- 37- Latorraca, A., Marques, G. J. G., Sousa, K. V., Fornés, N. S. 2008.** Agrotóxicos utilizados na produção do tomate em Goiânia e Goianópolis e efeitos na saúde humana. *Com. Ciências Saúde*. 19(4):365-374.
- 38- Lee, W. J., Blair, A., Hoppin, J. A., Lubin, J. H., Rusiecki, J. A., Sandler, D. P., Dosemeci, M., Alavanja, M. 2004.** Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the agricultural health study. *Journal of the National Cancer Institute*. 96(23):1781-1789.

- 39- Levigard, Y. E., Rozemberg, B. 2004.** A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas de “nervos” no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos. *Cadernos de Saúde Pública*. 20(6):1515-1524.
- 40- Majer, B. J., Laky, B., Knasmüller, S., Kassie, F. 2001.** Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research*. 489:147-172.
- 41- Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Calderón-Segura, M. E., Félix-Gastélum, R., Álvarez-Torrez, A. 2009.** Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environment International*. 35:1155-1159.
- 42- Mcduffie, H. H.; Pahwa, P.; Mclaughlin, J. R.; Spinelli, J. J.; Fincham, S.; Dosman, J. A.; Robson, D.; Skinnider, L. F.; Choi, N. W. 2001.** Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 10 (11): 1155 – 1163.
- 43- McKinlay, R., Plant, J. A., Bell, J. N. B., Voulvoulis, N. 2008.** Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environment International*. 34:168-183.
- 44- Moreira J. C., Jacob S. C., Peres F., Lima J. S., Meyer A., Oliveira-Silva J. J., Sarcinelli P. N., Batista D. F., Egler M., Faria M. V. C., Kubota A. H., Soares M. O., Alves S. R., Moura C. M., Curi R. 2002.** Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. *Ciênc. saúde coletiva*. 7(2): 299-311.
- 45- NR4 – Norma Reguladora Numero 4.** Serviços especializados em engenharia de segurança e em medicina do trabalho. Ministério do Trabalho. Brasil 1978. Acessado em 31.mar.2012. <http://portal.mte.gov.br/legislacao/normas-regulamentadoras-1.htm>
- 46- OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. 1997.** Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. 72p.
- 47- Pacheco, A. O., Hackel, C. 2002.** Instabilidade cromossômica induzida por

- 48- Peres F. & Moreira J. C. 2007.** Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Caderno de Saúde Pública. : 4: 612-621
- 49- Sailaja, N., Chandraskhar, M., Rekhadevi, P. V., Mahbood, M., Rahman, M. F., Vuyyuri, S. B., Danadevi, H., Hussain, S. A., Grover, P. 2006.** Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. Mutation Research. 609:74-80.
- 50- Santos S. S., Silva I. F., Koifman R. J., Hatagima A., Koifman S. 2008.** Exposição a substâncias químicas e câncer: aspectos epidemiológicos, genéticos e moleculares. Caderno de Saúde Coletiva. 16 (4): 613 – 658.
- 51- Silva, C. M. M. S., Fay, E. F. 2004.** Agrotóxicos: Aspectos Gerais. In: Silva, C. M. M. S., Fay, E. F. Agrotóxicos e Ambiente. Embrapa Informação e Tecnologia: Brasília, cap.1, 400p.
- 52- SINDIAGRI – Sindicato dos Trabalhadores do Setor Público Agrícola do Estado de Goiás. 2011.** Acessado em 02.fev.2012  
[http://www.sindiagri.com.br/site/index.php?p=materias\\_ver&id=236](http://www.sindiagri.com.br/site/index.php?p=materias_ver&id=236)
- 53- SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. 2009.** Casos registrados de intoxicação humana, de intoxicação animal e de solicitação de informação por agente tóxico. Brasil. 2009. Acessado em 02.fev.2012  
[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=349](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=349)
- 54- Soares W., Almeida R. M. V. R., Moro S. 2003.** Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. Cadernos de Saúde Pública. 19(4): 1117-1127.
- 55- Souto, R., Borges, F. R., Cunha, D. M. C., Vilanova – Costa, C. A. S. T. e Cruz, A. P. 2010.** O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativa de dano genético: Aspectos citotécnicos. Estudos. 37(3/4):297-307.
- 56- Trosko, J. E. 2001.** Commentary: is the concept of “tumor promotion” a useful paradigm? Molecular Carcinogenesis. 30: 131 – 137.
- 57- WHO – World Health Organization. 2010.** The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. 78p.

## ANEXOS

## ANEXO I. Aprovação do CEP - PUCGO



**PUC  
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1.069 • Setor Universitário  
Caixa Postal 85 • CEP 74605-010  
Goiânia • Goiás • Brasil  
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070  
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

Registro CEP 1978/2011

### DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o Projeto **Estudos estocásticos da exposição ocupacional a pesticidas em municípios goianos com intensa atividade agrícola**, coordenado pelo (a) pesquisador (a) **Carolinne Borges Khayat**. Foi cadastrado no Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEP-SGC/PUC Goiás) sob o **CAAE 0179.0.168.000-11**, em 28/10/2011 e **aprovado em 29/02/2012**.

- CEP-SGC/PUC Goiás pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – item 13).
- Informamos que é obrigatória a entrega do relatório de acompanhamento da pesquisa, conforme a categoria de pesquisa realizada, em cumprimento da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.
- Modelo do relatório de acompanhamento da pesquisa se encontra no site do Comitê de Ética <http://www.pucgoias.edu.br/cep> - modelos documentos.

#### Categorias de pesquisa

TCC: Final da pesquisa  
Especialização: Final da pesquisa  
Mestrado: Relatório anual e final  
Doutorado: Relatório anual e final  
Outros: Relatório anual e final

*Rodrigues*  
Prof. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho  
Coordenador do CEP-SGC/PUC Goiás

Goiânia, 29 de Fevereiro de 2012.

## ANEXO II



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



## DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

**Título do Projeto:** Estudos Estocásticos da Exposição Ocupacional a Pesticidas em Municípios Goianos com Intensa Atividade Agrícola

**Pesquisadores Responsáveis:** Carolinne Borges Khayat e Daniela de Melo e Silva

Eu, \_\_\_\_\_, RG  
 nº \_\_\_\_\_, Nacionalidade \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_,  
 Endereço \_\_\_\_\_ estou

sendo convidado a participar de um estudo denominado: **Estudos Estocásticos da Exposição Ocupacional a Pesticidas em Municípios Goianos com Intensa Atividade Agrícola**, cujos objetivos e justificativas são: realizar um estudo molecular de trabalhadores agrícolas de municípios goianos, expostos ocupacionalmente a pesticidas, avaliando os efeitos biológicos dessa exposição, a fim de verificar prováveis alterações genéticas, analisando também o tempo e os tipos de agrotóxicos mais utilizados pelos trabalhadores. O presente estudo contribuirá para se compreender os riscos de agravo à saúde humana decorrente da exposição individual, fornecendo subsídios para reforçar a necessidade da adesão do trabalhador às condições de segurança ocupacional, que visam à manutenção da saúde física e a proteção contra o desenvolvimento das doenças ocupacionais. Assim, compreender os aspectos biológicos subjacentes à exposição do sistema celular humano aos agrotóxicos permitirá uma maior proteção da saúde de trabalhadores agrícolas.

A minha participação no referido estudo será no sentido de doar voluntariamente, uma amostra de sangue, para colaborar com a investigação dos efeitos biológicos da exposição ocupacional a pesticidas, verificando possíveis danos ao DNA e alterações genéticas.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Durante a coleta de sangue você poderá sentir uma dor leve a moderado, em decorrência da aplicação da agulha, podem também ocorrer a formação de hematomas que não são incomuns, caso isso ocorra, você será imediatamente encaminhado (a) ao Serviço Médico da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

**Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.**

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Carolinne Borges Khayat e Daniela de Melo e Silva, e com eles poderei manter contato pelos telefones: (62) 78115917 (Carolinne) e (62) 99549691 (Daniela).

É assegurada a minha assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar. No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de dinheiro em espécie. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Goiânia, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

---

Nome e Assinatura do sujeito da pesquisa

## ANEXO III



Estudos Estocásticos da Exposição Ocupacional a pesticidas em  
Municípios Goianos com Intensa Atividade Agrícola



## Questionário

1) Nome: \_\_\_\_\_

2) Sexo:  F  M

3) Idade:

4) Fumante:  Sim  Não Em caso afirmativo, fuma por quanto tempo e quantos cigarros por dia?

5) Uso de bebida alcoólica?  Sim  Não. Em caso afirmativo, qual tipo de bebida e qual frequência?

6) Problemas de saúde:  Sim  Não

7) Qual (is) e quando manifestou:

8) Estado Cível:  Solteiro(a)  Casado(a)  Separado(a)  Viúvo(a)

9) Filhos:  Sim  Não Quantos:

10) Saudáveis:  Sim  Não

11) Atividade agrícola principal:

12) Tempo de atividade agrícola:

13) Qual(is) cultura(s) produzida(s):

14) Uso de agrotóxicos:  Sim  Não

15) Qual(is) agrotóxico(s) utilizado(s):

16) Manipula e/ou aplica o agrotóxico?

17) Há quanto tempo manipula/aplica agrotóxicos:

18) Frequência na manipulação/aplicação de agrotóxicos:

Uma vez por semana  A cada 15 dias  Uma vez por mês

- 18) Qual o tipo de equipamento usado para manipulação/aplicação de agrotóxico:
- 19) Como os agrotóxicos são armazenados:
- 20) Local de armazenamento:
- 21) Uso de vestimenta adequada para manipulação de agrotóxicos: ( ) Sim ( ) Não
- 22) Principais itens de vestuário usados:
- ( ) Bota ( ) Máscara ( ) Luva ( ) Boné ou Chapéu ( ) Calça
- ( ) Bermuda ( ) Camisa de manga
- 23) Conhecimento sobre EPI: ( ) Sim ( ) Não
- 24) Relatos sobre eventos de intoxicação: ( ) Sim ( ) Não
- ( ) Dor de cabeça ( ) Náuseas ( ) Vômitos ( ) Tonturas
- ( ) Queimaduras e alterações da pele ( ) Desmaios
- ( ) Irritação de nariz, garganta e olhos, provocando tosse e lágrimas
- ( ) Falas com frases desconexas ( ) Tremores no corpo
- ( ) Irritação ou Nervosismo ( ) Indisposição, fraqueza e mal estar
- ( ) Vertigem e alterações na visão ( ) Salivação e sudorese aumentadas
- ( ) Convulsões ( ) Dores no corpo, principalmente braços, pernas e peito
- ( ) Outros. Especificar:

**Pesquisadoras Responsáveis:** Carolinne Borges Khayat – 78135988

Daniela de Melo e Silva – 99549691

## ANEXO IV - Descrição dos trabalhadores expostos a pesticidas

Sigla	SEXO	IDADE	CIDADE	ESTADO CIVIL	FILHOS	FUMANTE	ÁLCOOL
AAS	M	52	ABADIA DE GOIÁS	CASADO	SIM	NÃO	SIM
ACB	M	50	TURVÂNIA	VIÚVO	SIM	NÃO	NÃO
CMC	F	24	BELA VISTA	CASADA	SIM	NÃO	NÃO
DJDN	M	40	GOIANÁPOLIS	CASADO	SIM	NÃO	NÃO
DPC	M	20	BELA VISTA	SOLTEIRO	NÃO	NÃO	SIM
DRC	M	44	TURVÂNIA	SEPARADO	SIM	NÃO MAIS	SIM
DRS	M	45	TURVÂNIA	CASADO	SIM	NÃO	SIM
ECS	F	39	TURVÂNIA	SOLTEIRA	SIM	SIM	SIM
EPC	M	22	BELA VISTA	SOLTEIRO	NÃO	NÃO	SIM
FAF	M	25	BELA VISTA	CASADO	NÃO	NÃO	SIM
GMM	M	55	ABADIA DE GOIÁS	SOLTEIRO	SIM	NÃO	SIM
GSC	M	40	ABADIA DE GOIÁS	CASADO	SIM	NÃO	SIM
HGS	M	23	TURVÂNIA	SOLTEIRO	NÃO	SIM	SIM
ICO	M	26	TURVÂNIA	SOLTEIRO	SIM	SIM	SIM
ILC	M	60	TURVÂNIA	CASADO	SIM	SIM	SIM
JD	M	60	BOMFINÓPOLIS	CASADO	SIM	SIM	NÃO
JFR	M	27	BELA VISTA	SOLTEIRO	SIM	NÃO	SIM
JMJ	M	63	TURVÂNIA	CASADO	SIM	NÃO	NÃO
JVR	M	46	TURVÂNIA	SOLTEIRO	SIM	NÃO	SIM
LAA	M	63	ANÁPOLIS	CASADO	SIM	NÃO MAIS	SIM
LGB	M	17	BELA VISTA	SOLTEIRO	NÃO	NÃO	SIM
MBP	M	61	TURVÂNIA	CASADO	SIM	SIM	SIM
MC	M	27	BELA VISTA	CASADO	NÃO	NÃO	SIM
MFS	M	30	BELA VISTA	CASADO	SIM	NÃO	SIM
ODP	M	70	TURVÂNIA	CASADO	SIM	NÃO	NÃO
OJGM	M	37	TURVÂNIA	SOLTEIRO	SIM	NÃO	SIM
ORS	M	75	TURVÂNIA	SOLTEIRO	NÃO	NÃO	SIM
OS	M	46	TURVÂNIA	CASADO	NÃO	SIM	SIM
AS	M	40	LEOPOLDO DE BULHÕES	SOLTEIRO	SIM	NÃO	SIM
SEGC	M	44	BELA VISTA	CASADO	SIM	NÃO	SIM
SFC	M	66	TURVÂNIA	CASADO	SIM	NÃO MAIS	NÃO
TJO	M	20	BELA VISTA	SOLTEIRO	NÃO	NÃO	SIM
UB	M	33	TURVÂNIA	CASADO	SIM	SIM	NÃO
VCS	M	42	TURVÂNIA	CASADO	SIM	NÃO	SIM
VJF	M	44	NERÓPOLIS	SEPARADO	SIM	SIM	SIM
WFC	M	52	GOIANÁPOLIS	CASADO	SIM	SIM	NÃO
WGG	M	35	TURVÂNIA	CASADO	SIM	NÃO	SIM
WJA	M	29	GOIANÁPOLIS	SOLTEIRO	SIM	NÃO	SIM
WNC	M	52	GOIÂNIA	CASADO	SIM	NÃO	SIM
WSG	M	32	TURVÂNIA	CASADO	SIM	NÃO	NÃO
WSP	M	38	TURVÂNIA	CASADO	SIM	NÃO	SIM

ANEXO V – Descrição das atividades desenvolvidas, tempo de exposição, princípio ativo, uso de EPIs e intoxicação dos trabalhadores expostos a pesticidas

Sigla	Culturas	Função	Tempo de exposição	Princípio ativo	Epi's	Eventos de intoxicação
AAS	Geral	Aplicar/manipular	40 anos	Glifosato	Sim	Não
ACB	Maracujá, tomate, pepino	Aplicar/manipular	10 anos	Glifosato; fenpropratrina	Sim	Não
CMC	Horta de casa	Sem contato direto	1 ano	Diversos	Não	Não
DJDN	Tomate	Aplicar/manipular	23 anos	Abamectina	Não	Não
DPC	Horta de casa	Sem contato direto	1 ano	Diversos	Não	Não
DRC	Tomate, milho	Aplicar/manipular	20 anos	Clorfenapir; cloridrato de kasugamycina; hidróxido de cobre; metamidofós; carbaril; acetamidrido; tiametroxam	Sim	Não
DRS	Tomate	Aplicar/manipular	30 anos	Fenpropratrina; piraclostrobina; cloridrato de cartape; paration metílico; profenofós	Não	Dores no corpo, tontura, irritação, indisposição, tremores, vertigem
ECS	Tomate, jiló, abóbora, pepi.	Aplicar/manipular	24 anos	Glifosato; hexaclorocicloexano	Sim	Não
EPC	Horta de casa	Sem contato direto	1 ano	Inseticida, fungicida, herbicida	Não	Não
FAF	Horta de casa	Sem contato direto	-	Inseticida, fungicida, herbicida	Não	Não
GMM	Geral	Aplicar/manipular	30 anos	Glifosato	Não	Ardência no nariz
GSC	Banana	Aplicar/manipular	20 anos	Glifosato	Sim	Dor de cabeça
HGS	Tomate, soja, milho	Aplicar/manipular	1,7 anos		Sim	Não
ICO	Tomate, soja, milho	Aplicar/manipular	4 anos	2,4 d; hidróxido de cobre; fenpropratrina	Sim	Não
ILC	Tomate	Aplicar/manipular	16 anos	Glifosato	Sim	Não
JD	Geral	Aplicar/manipular	40 anos	Glifosato; abamectina	Sim	dores no corpo
JFR	Soja	Aplicar/manipular	2 anos	Diversos	Sim	Não
JMJ	Tomate, soja, feijão, milho	Aplicar/manipular	20 anos	Carbofurano	Sim	Não
JVR	Tomate	Aplicar/manipular	16 anos	Glifosato; fenpropratrina	Sim	Não
LAA	Tomate	Aplicar/manipular	37 anos	2,4 d; glifosato	Não	Náuseas, vertigem, tontura, desmaio - 3x internado
LGB	Horta de casa	Sem contato direto	1 ano	Diversos	Não	Não
MBP	Tomate, pepino	Aplicar/manipular	12 anos	Glifosato	Não	Não
MC	Soja	Aplicar	1 ano	Glifosato, herbicida	Não	Não
MFS	Soja	Aplicar	1 ano	Inseticida, fungicida, herbicida	Sim	Não
ODP	Tomate, pepino	Aplicar/manipular	21 anos	Paration metílico; lambda-cialotrina; cloridrato de cartape; carbofurano; deltametrina	Não	Dor de cabeça, tontura, irritação, tremores, vertigem
OJGM	Tomate, soja	Aplicar/manipular	7 anos	Glifosato; fenpropratrina	Sim	Não
ORS	Tomate	Aplicar/manipular	30 anos	Glifosato	Sim	Não
OS	Tomate, soja, milho	Aplicar/manipular	15 anos	Carbofurano	Sim	Não
SA	Geral	Aplicar/manipular	20 anos	Glifosato	Sim	Não
SEGC	Soja	Aplicar	15 anos	Carrapaticida	Não	Não
SFC	Arroz, milho, feijão	Aplicar/manipular	55 anos	Carbofurano; hexaclorocicloexano	Não	Dores no corpo, tontura, indisposição, tremores, vertigem
TJO	Soja, milho	Aplicar	3 meses	Diversos	Sim	Dor de cabeça
UB	Soja, feijão, tomate, milho	Aplicar/manipular	3 anos	Fenpropratrina; azoxistrobina	Sim	Não

## Continuação.

Sigla	Culturas	Função	Tempo de exposição	Princípio ativo	Epi's	Eventos de intoxicação
VCS	Tomate	Manipular	8 anos	Carbofurano	Não	Dor de cabeça, náuseas, tonturas, tremores
VJF	Geral	Aplicar/manipular	35 anos	Glifosato	Sim	Não
WFC	Tomate	Aplicar/manipular	30 anos	2,4 d; glifosato	Sim	Dor de cabeça
WGG	Soja, feijão, tomate, milho	Aplicar/manipular	15 anos	Fenpropratrina; azoxistrobina	Sim	Não
WJA	Geral	Aplicar/manipular	13 anos	Clorfenapir; carbofurano	Não	Não
WNC	Geral	Aplicar/manipular	40 anos	Glifosato	Não	Dores no corpo
WSG	Soja, feijão, tomate, milho	Aplicar/manipular	15 anos	Fenpropratrina; azoxistrobina	Sim	Não
WSP	Tomate, melancia	Aplicar/manipular	15 anos	Lambda-cialotrina; permetrina; paration metílico; tiofanato metílico	Sim	Dor de cabeça, náuseas, tontura, indisposição, tremores, vertigem

## ANEXO VI – Ensaio cometa trabalhadores expostos

Sigla	CC	PDCA	MC	MCO
AAS	6,49	6,89	0,44	0,86
DJDN	4,10	5,81	0,15	0,47
ECS	4,92	3,99	0,12	0,34
FAF	4,34	2,71	0,05	0,19
GMM	5,01	5,39	0,13	0,46
GSC	5,32	5,45	0,19	0,41
ILC	3,23	4,54	0,08	0,39
JD	7,55	6,96	0,52	0,75
JFR	5,74	3,60	0,06	0,25
JMJ	4,47	4,28	0,06	0,27
JVR	4,60	8,07	0,34	0,74
LAA	8,52	3,29	0,07	0,33
LGB	7,60	4,82	0,19	0,57
MBP	2,67	8,73	0,07	0,78
MC	2,56	5,64	0,19	0,79
OS	2,55	5,73	0,06	0,47
SA	5,69	6,29	0,32	0,63
VJF	6,24	5,99	0,18	0,48
WFC	2,84	8,17	0,35	0,81
WJA	6,12	6,45	0,13	0,53
WNC	2,34	7,12	0,15	0,84

## ANEXO VII – Ensaio cometa grupo controle

Sigla	CC	PDCA	MC	MCO
AHG	3,43	0,47	0,00	0,01
AJG	2,80	0,21	0,00	0,01
ALH	2,36	0,22	0,00	0,00
ALP	4,51	0,36	0,00	0,01
AWSM	5,09	1,51	0,01	0,11
CAPC	2,28	0,11	0,00	0,00
DGPA	1,62	0,25	0,00	0,00
ERP	1,03	0,40	0,00	0,00
FDS	1,19	0,72	0,00	0,01
FLO	7,29	2,50	0,05	0,32
GFS	1,41	0,56	0,00	0,01
HLO	3,72	2,55	0,01	0,16
HMB	5,49	2,80	0,02	0,16
HO	5,63	3,30	0,04	0,28
IOS	5,51	2,69	0,02	0,22
JAXM	7,58	3,96	0,13	0,44
JCS	7,78	4,75	0,19	0,46
JCSV	1,59	0,16	0,00	0,01
JEI	9,64	1,38	0,04	0,17
JEO	1,23	0,15	0,00	0,00
JFLN	5,43	1,03	0,00	0,08
JM	5,82	0,61	0,06	0,05
JSA	3,72	1,66	0,03	0,16
KLPS	4,95	0,71	0,00	0,05
MVPA	1,70	0,21	0,00	0,00
RAO	1,19	0,06	0,00	0,00
RB	2,23	0,27	0,00	0,01
RSC	1,17	0,11	0,00	0,00
RVF	5,40	0,88	0,02	0,07
SAS	2,89	0,60	0,00	0,04
WCR	1,41	0,26	0,00	0,00
WPOJ	5,15	0,55	0,01	0,04

## ANEXO VIII – Teste micronúcleo trabalhadores expostos

Sigla	Micronúcleo	Células Binucleadas
AAS	31	6
ACB	7	54
CMC	14	28
DJDN	34	19
DPC	1	25
DRC	4	62
DRS	11	45
ECS	1	31
EPC	1	27
FAF	22	16
GMM	8	41
GSC	6	37
HGS	6	47
ICO	3	18
ILC	6	53
JD	1	17
JFR	25	20
JMJ	2	33
JVR	1	21
LAA	20	7
LGB	3	44
MBP	8	36
MC	2	21
MFS	4	53
ODP	8	49
OJGM	5	51
ORS	9	73
OS	3	35
SA	2	28
SEGC	7	43
SFC	7	53
TJO	9	54
UB	5	49
VCS	2	49
VJF	3	47
WFC	12	15
WGG	14	29
WJA	13	45
WNC	2	26
WSG	3	61
WSP	9	74

## ANEXO VIII – Teste micronúcleo grupo controle

Sigla	Micronúcleo	Células Binucleadas
AHG	1	10
AJG	1	5
ALH	2	9
ALP	1	5
AWSM	1	0
CAPC	3	7
DGPA	1	6
ERP	1	9
FDS	3	14
FLO	2	3
GFS	0	2
HLO	0	2
HMB	2	7
HO	0	3
IOS	0	6
JAXM	1	7
JCS	1	14
JCSV	0	3
JEI	0	6
JEO	0	2
JFLN	0	2
JM	1	1
JSA	2	7
KLPS	1	5
MVPA	2	5
RAO	1	3
RB	4	9
RSC	0	5
RVF	1	2
SAS	0	2
WCR	1	10
WPDJ	3	7