

**Carolina Hilgert Jacobsen Pereira**

**AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE GENÔMICA E DO ES-  
TRESSE OXIDATIVO EM AGRICULTORES EXPOSTOS A  
AGROTÓXICOS EM UM MUNICÍPIO DO ESTADO DE  
SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Progra-  
ma de Pós-Graduação em Farmácia  
da Universidade Federal de Santa  
Catarina para obtenção do título de  
Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Sharbel  
Weidner Maluf

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Carolina Hilgert Jacobsen

Avaliação da instabilidade genômica e do estresse oxidativo em agricultores expostos a agrotóxicos em um município do estado de Santa Catarina / Carolina Hilgert Jacobsen Pereira ; orientador, Sharbel Weidner Maluf - SC, 2017.

117 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Danos ao DNA. 3. Estresse oxidativo. 4. Trabalhadores rurais. 5. Agrotóxicos. I. Maluf, Sharbel Weidner. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.





## RESUMO

Agrotóxicos ou pesticidas são produtos químicos utilizados na prática agrícola em todo o mundo, embora representem um risco potencial aos agricultores e ao ambiente. Os efeitos da exposição crônica aos agrotóxicos podem levar ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo diferentes tipos de câncer, já que se observam a capacidade genotóxica e mutagênica dessas substâncias. O presente estudo objetiva investigar a relação entre a exposição ocupacional aos pesticidas e a presença de danos ao DNA e de estresse oxidativo. Foram avaliadas amostras de sangue periférico de 50 agricultores com exposição ocupacional a agrotóxicos, residentes no município de Antônio Carlos (SC), além de 46 controles residentes na mesma localidade, mas sem exposição, e 29 controles residentes no município de Florianópolis (SC). Para avaliação de danos genéticos foram realizados o ensaio Cometa e a técnica de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese Celular (CBMN). O estresse oxidativo foi avaliado pela dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela atividade da Catalase (CAT). Além desses testes, foram avaliadas as atividades da acetilcolinesterase (AChE) e da butirilcolinesterase (BChE) dos grupos exposto e controle residente em Antônio Carlos. Diferenças significativas foram encontradas nos danos ao DNA entre os trabalhadores expostos a agrotóxicos e controles. O ensaio Cometa realizado em linfócitos do sangue periférico apresentou índice de dano ao DNA significativamente maior no grupo exposto quando comparado aos grupos controles ( $p < 0,0001$ ). Também foram significativamente maiores as frequências de Micronúcleos ( $p < 0,001$ ), *Buds* ( $p < 0,005$ ) e Pontes Nucleoplasmáticas ( $p < 0,0001$ ) nos indivíduos expostos. Os valores de TBARS foram significativamente maiores para o grupo exposto quando comparados com o grupo controle morador de Florianópolis ( $p < 0,0001$ ). A CAT não apresentou variação significativa entre os grupos. O sexo feminino parece mais suscetível aos efeitos deletérios dos pesticidas, assim como os indivíduos com idade mais avançada. Fatores como o tempo de exposição a pesticidas, o uso de EPI, tabagismo e etilismo não apresentaram influência significativa sobre os resultados. Assim, conclui-se que os indivíduos expostos, participantes deste estudo, estão mais sujeitos a sofrer danos genéticos e, consequentemente, mais susceptíveis a doenças decorrentes desses danos. A evidência de risco genético relacionado à exposição resultante do uso de pesticidas na população avaliada enfatiza a necessidade de pro



gramas educacionais para trabalhadores agrícolas para reduzir o uso de produtos químicos na agricultura.

**Palavras-chave:** *Agricultores. Agrotóxicos. Dano ao DNA. Estresse oxidativo.*





## Evaluation of genomic instability and oxidative stress in a city of the state of Santa Catarina

### ABSTRACT

Pesticides are products used in agricultural practice around the world, despite of its potential risk to farmers and the environment. The effects of chronic exposure to pesticides can lead to the development of several diseases, including different types of cancer, since the genotoxic and mutagenic capacity of these substances can be observed. The objective of this study is to investigate the relation between the occupational exposure to various pesticides and the presence of DNA damage and oxidative stress. Blood samples from 50 rural workers exposed to pesticides, living in Antônio Carlos city (SC), 46 controls from the same city and 29 controls from the city of Florianópolis (SC) were evaluated using the Comet Assay and the Cytokinesis-block Micronucleus Technique (CBMN) for genetic damage, and the test of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and Catalase (CAT) activity for the oxidative stress. Significant differences were found in DNA damage among exposed workers and controls. The Comet Assay performed on peripheral blood lymphocytes of these individuals had a significantly higher DNA damage index in the exposed group comparing to controls ( $p < 0,0001$ ). Micronucleus ( $p < 0,001$ ), Buds ( $p < 0,005$ ) and Nucleoplasmic Bridges ( $p < 0,0001$ ) were also found to be significantly higher in the exposed group. The TBARS values were significantly higher comparing to the Florianópolis control group ( $p < 0,0001$ ). Even though CAT values were higher than controls, there was no statistical difference. The women seem to be more susceptible to these deleterious effects, as well as the older individuals. Factors such as exposure extension to pesticides, the use of individual protection equipment, smoking and alcoholism did not have a significant influence on the results. Thus, it is concluded that the exposed individuals, participants of this study, are more subject to suffer genetic damage and, consequently, more susceptible to diseases resulting from such damages. Evidence of DNA damage related to the exposure to pesticides in the population evaluated emphasizes the need for an educational system for agricultural workers in order to reduce the use of chemicals in agriculture.

**Keywords:** *Rural workers. Pesticides. DNA damage. Oxidative stress.*



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Antônio Carlos
AChE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
BChE	Butirilcolinesterase
CAT	Catalase
CBM	Carbamatos
CBMN	Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese Celular
DCFI	2,6-diclorofenolindofenol
DL	Dose letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
DSBs	<i>Double Strand Breaks</i>
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
DTPA	<i>Ácido dietilentriaminopentacético</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EO	Estresse oxidativo



EPI	Equipamento de proteção individual
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fp	Florianópolis
FUNDACENTRO	Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho
GABA <sub>A</sub>	Ácido gama-aminobutírico
GP <sub>x</sub>	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione Redutase
HCH	Hexaclorociclohexano
HR	<i>Homologous Recombination</i>
HU	Hospital Universitário
HUMN	<i>Human Micronucleus</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LMP	<i>Low Melting Point</i>
MDA	Malondialdeído
MN	Micronúcleos
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
NMP	<i>Normal Melting Point</i>



OF	Organofosforados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARA	Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PIR	Piretroides
PNP	Pontes nucleoplasmáticas
PON	Paroxonase
PPSUS	Programa de Pesquisa para o SUS
PrC	Proteína carbonilada
RL	Radicais livres
SC	Santa Catarina
SINDVEG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SOD	Superóxido dismutase
SSBs	<i>Single Strand Breaks</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TNB	5-tio-2-nitrobenzóico
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina





USEPA

*United States Environmental Protection Agency*

WHOPES

*World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado das principais fontes de EROs, sistema de defesa antioxidante e os efeitos biológicos.....	43
Figura 2. Vias de transformação possíveis do radical superóxido: peroxidação lipídica e neutralização pelas enzimas antioxidantes.....	45
Figura 3. Células submetidas ao ensaio Cometa coradas por solução de prata.....	50
Figura 4. Formas celulares e alterações encontradas pela técnica CBMN. ....	53
Figura 5. Frequência de Micronúcleos nos grupos avaliados.....	68
Figura 6. Frequência de Micronúcleos de acordo com o gênero.....	69
Figura 7. Frequência de <i>Buds</i> nos grupos avaliados.....	70
Figura 8. Frequência de Pontes Nucleoplasmáticas nos grupos avaliados. ....	71
Figura 9. Frequência total de dano de DNA obtido pelo ensaio Cometa nos grupos avaliados . ....	72
Figura 10. Frequência das classes de dano do ensaio Cometa nos grupos avaliados.....	73
Figura 11. Valores de TBARS dos grupos avaliados.....	74
Figura 12. Atividade da Catalase nos grupos avaliados. ....	75



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio (EROs) e suas características. ....	42
Tabela 2. Perfil do grupo Exposto e dos Controles Antônio Carlos e Florianópolis. ....	65
Tabela 3. Enzimas colinesterases dos grupos avaliados.....	66
Tabela 4. Agrotóxicos mais utilizados pelos agricultores e classificação toxicológica.....	67
Tabela 5. Correlações entre as variáveis .....	76



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>27</b>
2.1 Agrotóxicos .....	27
2.2 Efeitos dos agrotóxicos na saúde humana .....	30
2.2.1 Organofosforados .....	31
2.2.2 Carbamatos.....	33
2.2.3 Piretroides .....	34
2.2.4 Triazois.....	36
2.2.5 Glifosato .....	37
2.2.6 Paraquat.....	38
2.3 Estresse oxidativo e biomonitoramento .....	39
2.4 Genotoxicidade e biomonitoramento .....	46
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>55</b>
3.1 Objetivo geral.....	55
3.2 Objetivos específicos .....	55
<b>4 SUJEITOS E MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
4.1 Casuística .....	57
4.2 Amostras .....	58
4.3 Ensaio Cometa .....	58
4.4 Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese Celular.....	61
4.5 TBARS.....	62
4.6 Catalase .....	63
4.7 Colinesterases.....	63
4.8 Análise estatística.....	64
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>
5.1 Perfil da população avaliada.....	65
5.2 Colinesterases .....	66





5.3 Agrotóxicos mais utilizados .....	66
5.4 Marcadores de instabilidade genômica .....	68
5.5 Marcadores de estresse oxidativo .....	74
5.6 Correlações.....	76
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO B: Questionário .....</b>	<b>105</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de agrotóxicos assumiu proporções alarmantes no Brasil. Entre 2001 e 2014, a venda desses produtos no país aumentou de pouco mais de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 12 bilhões (BRASIL, 2016) e, desde 2008, o Brasil mantém a posição de maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Em 2015, o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDVEG) declarou ter havido uma queda nas vendas dos “defensivos agrícolas”, porém, isto não significa uma queda no seu consumo, uma vez que estudos atuais indicam o crescente comércio ilegal de agrotóxicos no país (ABRASCO, 2015).

Em Santa Catarina (SC), segundo a Secretaria de Estado da Saúde, o consumo de agrotóxicos é crescente e, dentre as principais unidades da federação, representa o estado com a maior produtividade agrícola por área, liderando na produção de cereais, leguminosas e oleaginosas. Entre 2005 e 2013, embora tenha havido uma diminuição na área cultivada de 1.823.602 para 1.564.718 hectares, a taxa de consumo de agrotóxicos passou de 3,21 para 14,24 quilogramas por hectare (SANTA CATARINA, 2013; BRASIL, 2016). O último relatório do Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), publicado em 2014 (mas relativo a 2012), identificou que 25% das amostras colhidas no Brasil, entre legumes, verduras, frutas e grãos, continham agrotóxicos proibidos ou em excesso. Em SC, o resultado foi pior que a média nacional: 31,6% das amostras eram impróprias para o consumo. Como consequência da ampla utilização, os casos de intoxicação por estes compostos também são crescentes no estado e acompanham o perfil do consumo (ANVISA, 2014). Um dos municípios desta-

ques na agricultura catarinense é o de Antônio Carlos. Distante 36 km da capital do Estado, com uma área de 229 km<sup>2</sup> e população de 8.012 habitantes, a cidade produz anualmente 150 mil toneladas de produtos agrícolas. A agricultura é a força da economia do município e pelo menos 80% das famílias da cidade vivem da produção e comercialização dos hortifrutigranjeiros. Antônio Carlos detém um dos maiores Índices de Desenvolvimento Humano (IDH) de Santa Catarina e do Brasil, que por sua vez se reflete na excelente qualidade de vida de sua população (SANTA CATARINA, 2016).

Devido ao uso crescente de agrotóxicos, o estabelecimento de protocolos para sua monitoração na água, nos alimentos e nos agricultores expostos é tema amplamente discutido em todo o território nacional. O protocolo proposto pelo Ministério da Saúde prevê a dosagem das colinesterases e os aspectos clínicos como indicadores biológicos de efeito da exposição. Porém, em função da ampla utilização e da variedade de agrotóxicos dispostos, o acompanhamento dos trabalhadores é extremamente complexo, principalmente quando se consideram exposições crônicas. A literatura nacional carece de informações relacionadas ao tema, pois poucos são os grupos de pesquisa a este dedicados. O Instituto Nacional do Câncer (INCA), órgão do Ministério da Saúde, divulgou, em 2013, um documento no qual adota um posicionamento de preocupação acerca do uso de agrotóxicos no país bem como seus efeitos sobre a saúde e a segurança alimentar e nutricional dos brasileiros (BRASIL, 2015). A relevância deste tema é indiscutível e o aprofundamento da pesquisa é necessário. As técnicas utilizadas no presente estudo, que avaliam a instabilidade genômica, poderiam incorporar o proto-

colo de monitoramento dos trabalhadores como indicadores biológicos para a prevenção de doenças como o câncer, dentre outras.

Atualmente, o biomonitoramento para prevenção do câncer inclui testes que têm a capacidade notável de identificar agressões genéticas geradas pela exposição ambiental ou ocupacional a agentes mutagênicos. Neste estudo, a instabilidade genômica foi investigada pelo ensaio Cometa e pela técnica de Micronúcleos com o Bloqueio da Citocinese Celular (CBMN – do inglês *cytokinesis-block micronucleus*). O primeiro avalia quebras de fitas simples e duplas de ácido desoxirribonucleico (DNA), além de *crosslinks* e alterações na sua estrutura que sejam sensíveis ao pH alcalino. As alterações genéticas detectadas pelo ensaio Cometa ainda são passíveis de reparo durante o ciclo celular. Portanto, é um teste que avalia a genotoxicidade causada por exposições recentes a xenobióticos. O método permite a observação do tipo e da quantidade de dano ao material genético. Numa corrida eletroforética, ocorre migração do DNA danificado em uma lâmina com gel de agarose e o dano genético é classificado de acordo com o comprimento do rastro observado. Completando essa avaliação, a técnica CBMN avalia o dano ao DNA estabelecido após a ação do sistema de reparo. Com esta técnica, se quantificam quebras cromossômicas, perdas de cromossomos inteiros, ampliações gênicas causadas por intoxicação celular, células necróticas e células apoptóticas. Foi também realizada a avaliação de estresse oxidativo pelo ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico ou TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), que quantifica uma substância resultante da peroxidação lipídica celular, além da atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT).

Este estudo faz parte de um projeto multidisciplinar que está sendo desenvolvido no Hospital Universitário Prof. Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC), com a coordenação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Claudia Regina dos Santos, do Departamento de Patologia. Estão envolvidas no projeto as especialidades médicas de neurologia, hematologia, reumatologia e endocrinologia, além do laboratório de análises clínicas e serviço de imagem, visando uma avaliação completa das condições clínicas dos agricultores que possivelmente estejam associadas à exposição a agrotóxicos. O projeto tem financiamento próprio aprovado em edital do Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde (PPSUS).

Dessa forma, além da avaliação pontual aqui prevista, entende-se que a questão dos agrotóxicos é tema para acompanhamento da população em longo prazo. Os dados obtidos desta avaliação permitirão, além da obtenção de informações científicas relevantes, a formação de uma equipe dedicada à questão e disponibilizar, em Santa Catarina, a realização da determinação de indicadores biológicos de exposição e de efeito, aprimorando as ferramentas para monitorar a população, inicialmente, com exposição ocupacional.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Agrotóxicos

Agrotóxicos ou pesticidas são compostos químicos utilizados na agricultura para eliminar elementos indesejáveis, que incluem insetos, roedores, fungos e algumas plantas. Dependendo da sua natureza química, são potencialmente tóxicos para o meio ambiente e outros organismos, incluindo os humanos, por isso precisam ser aplicados com segurança e descartados de forma adequada. O Sistema de Avaliação de Pesticidas da Organização Mundial de Saúde (WHOPES – *World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme*) foi criado em 1960 para promover e coordenar testes e avaliar agrotóxicos e sua relação com a saúde pública. Ele conta com a participação de representantes de governos, fabricantes de agrotóxicos e de equipamentos de aplicação desses produtos, Centros Colaboradores da Organização Mundial de Saúde (OMS) e instituições de pesquisa. Os objetivos do WHOPES são facilitar a busca de defensivos alternativos e métodos de aplicação que sejam seguros e de baixo custo, além de desenvolver e promover políticas, estratégias e diretrizes para a aplicação seletiva e criteriosa de pesticidas (WHOPES/WHO, 2010).

No Brasil, a Lei nº 9.974 de 6 de junho de 2000 dispõe quanto ao registro, classificação e fiscalização dos agrotóxicos e as ações são amplamente coordenadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) é o órgão responsável por fiscalizar os registros e reavaliar os produtos já registrados, além de normatizar e elaborar documentos técnicos e mo-

nografias sobre os ingredientes ativos dos produtos. Para deferir a regularização do agrotóxico avaliado, a agência preconiza que os laboratórios responsáveis por realizar os estudos, estejam sempre em concordância com os protocolos recomendados pela OMS (BRASIL, 2000; ANVISA, 2014).

Os agrotóxicos são formulações químicas heterogêneas que agem nos organismos alvo, mas, por não serem dotados de absoluta seletividade, acabam causando efeitos não desejáveis nos organismos não alvos e ao meio-ambiente. Os agrotóxicos podem ser bastante persistentes, apresentando meia-vida de décadas. Com frequência, são encontrados em ambientes diferentes da sua origem de aplicação, ou seja, são transportados a longas distâncias. Devido à rápida circulação, podem atingir águas subterrâneas, rios e solos. Portanto, todos estão inevitavelmente expostos aos agrotóxicos, seja por contaminação ambiental, consumo ou uso ocupacional. Em geral, o acúmulo de agrotóxicos sob a forma de resíduos é considerado uma das principais causas de risco para o ambiente e para os humanos (BOLOGNESI, 2003; DYK; PLETSCHEKE, 2011).

A ANVISA traz diferentes critérios de classificação dos agrotóxicos. Eles podem ser agrupados quanto à forma de atuação ou praga a ser controlada, seu grau de toxicidade ou o grupo químico a que pertencem.

Quanto ao uso e tipo de praga a ser controlada ou destruída:

Inseticidas (insetos), herbicidas (ervas daninhas), fungicidas (fungos), raticidas (roedores), bactericidas (bactérias), nematocidas (nematóides, vermes), larvicidas (larvas), cupinícidias (cupins), formicidas



(formigas), pulguicidas (pulgas), piolhidas (piolhos), carrapaticidas (carrapatos), acaricidas (ácaros), moluscicidas (moluscos), avicidas (aves) e columbicidas (pombos) (ANVISA, 2016).

Quanto à toxicidade:

A classificação por toxicidade adotada no Brasil considera fatores como a DL50 oral, inalatória e dérmica (para ratos) e a capacidade de corrosão, ulceração ou opacidade na córnea dos animais testados. DL50 é a abreviação da dose letal específica que confere letalidade para a metade (50%) dos animais testados, geralmente ratos expostos individualmente a uma determinada dose (SUITER; SCHARF, 2012; ANVISA, 2016). Existem quatro classes, a saber:

- Classe I (rótulo vermelho) - extremamente tóxico;  $DL50 \leq 5$  mg/kg;
- Classe II (rótulo amarelo) - altamente tóxico; DL50 entre 5 e 50 mg/kg;
- Classe III (rótulo azul) - medianamente tóxico; DL50 entre 50 e 500 mg/kg;
- Classe IV (rótulo verde) - pouco tóxico;  $DL50 > 500$  mg/kg;

Uso e estrutura química:

A quantidade de grupos nesta classificação é bastante extensa e está disponível no *Compendium of Pesticide Common Names – Pesticide Classification*, no endereço:

<http://www.alanwood.net/pesticides/index.html>. Seguem alguns exemplos:

- Inseticidas: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neocotinóides;
- Herbicidas: cloroacetanilidas, ácidos ariloxialcanóico, triazinas, ureias e glicina substituída;
- Fungicidas: triazol, ditiocarbamatos, benzimidazol, dicarboximidas, entre outros (ANVISA, 2016).

## 2.2 Efeitos dos agrotóxicos na saúde humana

Os efeitos da exposição crônica aos agrotóxicos incluem o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo diferentes tipos de câncer, já que se observam capacidade genotóxica e mutagênica destas substâncias (BOLOGNESI *et al.*; 2011). Porém, estes efeitos ainda não estão satisfatoriamente elucidados, principalmente porque a avaliação dos agrotóxicos considera os resultados obtidos por experimentos conduzidos a partir de altas doses de uma única classe química ou de um único agrotóxico, o que não condiz com a realidade proposta na avaliação do risco ocupacional, uma vez que os agricultores são expostos a diferentes classes e misturas desses compostos (BOLOGNESI, 2003; BENEDETTI *et al.*; 2013). Em relatório publicado em 2015, um estudo da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), ligada à OMS, esclarece que a classificação de riscos dos pesticidas busca identificar o desenvolvimento de câncer motivado pelos produtos estudados em quaisquer circunstâncias, sem relacionar aos níveis de exposição, nem definir graus de risco. Tal posicionamento baseia-se no entendimento de que esses produtos não são utilizados isoladamente e que a presença de mais de um tipo deles nos alimentos ou no ambiente pode aumentar o

risco e elevar o grau de carcinogenicidade. Portanto, trata-se de uma avaliação científica de difícil mensuração (WHO, 2015).

Dentre os pesticidas mais comercializados em Santa Catarina estão inseticidas como os organofosforados, carbamatos e piretroides, fungicidas como os triazóis e herbicidas do tipo glicina substituída (gli-fosato em suas várias formas) e bipiridílios (paraquat) (SANTA CATARINA, 2013).

### **2.2.1 Organofosforados**

Os organofosforados (OF) compõem um grupo de agrotóxicos utilizado para o controle e a eliminação de insetos na agricultura e, em alguns casos, também são aplicados nas residências. Os seres humanos podem ser expostos aos OF na própria atividade laboral ou vivendo nas proximidades de alguma propriedade em que se apliquem os pesticidas. A absorção desses produtos geralmente se dá por inalação ou ingestão de partículas de poeira carregadas com as substâncias e pelo consumo de produtos contendo seus resíduos (NAEHER *et al.*, 2010; MUÑOZ-QUEZADA *et al.*, 2012; MUÑOZ-QUEZADA *et al.*, 2013). Após a absorção, os OF são metabolizados para a sua forma tóxica, podendo ligar-se à enzima acetilcolinesterase (AChE) de forma, geralmente, irreversível. Caso o OF não se ligue à AChE, então ele poderá ser hidrolisado ou por meio da enzima paraoxonase (PON) ou espontaneamente para formar metabólitos específicos de pesticidas e também outros não específicos. Esses metabólitos ou os seus conjugados são primariamente excretados na urina (MUÑOZ-QUEZADA *et al.*, 2013). Essas substâncias agem, portanto, como inibidores da AChE, impedindo a degradação

do neurotransmissor acetilcolina, o que resulta em um aumento da sua concentração nas sinapses colinérgicas e no prolongamento da sua ação no organismo. A superexcitação dos receptores muscarínicos e nicotínicos do sistema nervoso pode produzir uma variedade de sintomas, incluindo náuseas, vômitos, salivação, lacrimação, convulsões e morte (ABDOLLAHI; KARAMI-MOHAJERI, 2012; MUÑOZ-QUEZADA *et al.*, 2013). A neuropatia periférica tardia é um efeito bem conhecido da exposição aguda a altos níveis de alguns OF. No entanto, outros efeitos periféricos da exposição em longo prazo são mais controversos. A maioria das pesquisas tem se concentrado nos efeitos sobre o sistema nervoso central, com evidências de comprometimento da função neurocomportamental após a exposição aos OF (ABDOLLAHI; KARAMI-MOHAJERI; STARKS *et al.*, 2012). Há vários relatos acerca de distúrbios metabólicos, hiperglicemia e também estresse oxidativo em exposições agudas e crônicas aos pesticidas, que estão relacionados ao diabetes e outras doenças metabólicas. Existem vários estudos *in vitro* e *in vivo* a esse respeito, mas poucos estudos clínicos sobre os mecanismos subjacentes a esses efeitos (KARAMI-MOHAJERI; ABDOLLAHI, 2011).

Em 2011, foram publicados três estudos independentes relacionando a exposição *in utero* aos OF a problemas no desenvolvimento cognitivo. Os riscos de pesticidas para a saúde das crianças tem sido assunto de grande preocupação em nível global desde a publicação do relatório "Pesticidas nas dietas de Lactentes e Crianças" pela *United States National Academy of Science*, em 1993 (DING; BAO, 2014). Para as crianças, acredita-se que a via de exposição predominante seja a alimentar. Durante o desenvolvimento, os efeitos neurológicos da exposição aos OF, mesmo em níveis baixos, podem ser prejudiciais porque

neurotransmissores, incluindo acetilcolina, desempenham um papel essencial no desenvolvimento celular e na arquitetura do cérebro (MUÑOZ-QUEZADA *et al.*, 2013).

Os principais alvos de ação dos compostos OF são, portanto, o sistema nervoso central e periférico, embora também tenha sido postulado que esses compostos, tanto na intoxicação aguda como crônica, perturbam os processos de oxirredução e, assim, induzem ao estresse oxidativo. A geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) causa danos a todas as macromoléculas vitais, incluindo lipídios, proteínas e DNA (OJHA *et al.*, 2013).

### **2.2.2 Carbamatos**

Derivados de ésteres do ácido carbâmico, os carbamatos (CBM), assim como os OF, têm como principal efeito a inibição da enzima AChE, que resulta em sinais e sintomas de excessiva estimulação colinérgica. Mas, ao contrário do que ocorre com os OF, as intoxicações por CBM tendem a ser de menor duração. Isto se deve ao fato de a inibição da AChE pelos CBM ser reversível, ou seja, o complexo formado é menos estável, e também porque os CBM são mais rapidamente metabolizados (KARAMI-MOHAJERI e ABDOLLAHI, 2011; EDLESTON, 2016). As vias de absorção dos CBM pelo organismo são a oral, respiratória e cutânea. A absorção por via oral pode ocorrer nas intoxicações agudas acidentais e nas tentativas de suicídio, sendo a ingestão do aldicarb ou “chumbinho” comum nestes casos. Vários CBM utilizam vias metabólicas similares, que rapidamente os degradam em oximas, sulfóxidos, sulfo e acetonitrilas e gás carbônico. A acetonitrila

em concentrações elevadas no organismo pode levar à formação de meta-hemoglobinemia (CALDAS, 2000), uma condição fisiopatológica potencialmente letal.

Os CBM podem induzir efeitos genotóxicos, incluindo micro-núcleos, aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs. Contudo, a indução de citotoxicidade pelo dano ao DNA é largamente desconhecida (GUANGGANG *et al.*, 2013).

### 2.2.3 Piretroides

Outra classe dentre as mais utilizadas ocupacionalmente é a dos piretroides (PIR). As piretrinas naturais de *Chrysanthemum cinerariaefolium* têm sido utilizadas para o controle de mosquitos desde os tempos antigos e muitos piretroides sintéticos foram desenvolvidos pela modificação das suas estruturas químicas para melhor desempenho biológico e estabilidade no ambiente. Alguns desses compostos são: permetrina, aletrina, resmetrina, deltametrina, cipermetrina e fenpropanato.

Os principais sítios alvos da ação tóxica dos PIR são os canais de sódio voltagem dependentes. Além desses, os canais de cálcio e de cloreto voltagem dependentes e receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA<sub>A</sub>) também podem contribuir para os efeitos neurotóxicos de alguns PIR. Os PIR sintéticos podem ser classificados em duas categorias: de primeira e de segunda geração. A principal característica dos PIR de primeira geração é a sensibilidade à luz e à temperatura. Portanto, esses pesticidas têm sido utilizados, principalmente, para o controle de pragas em áreas cobertas. Por outro lado, a segunda geração de PIR tem excelente atividade inseticida, bem como uma boa estabilidade em am-

bientes abertos. Por esta razão, os PIR de segunda geração são muito utilizados em todo o mundo para o controle das pestes (KANEKO, 2011).

Após a absorção, que nos seres humanos pode se dar pela ingestão, inalação ou através da pele, os PIR são rapidamente metabolizados por hidrólise e pela oxidação mediada pelo citocromo P450. A meia-vida dos PIR é curta (SAMS; JONES, 2011; SAMS; JONES, 2012) e eles são excretados principalmente na urina como metabólitos conjugados. Os metabólitos principais são utilizados como biomarcadores para o monitoramento da exposição aguda em adultos e crianças da população geral e em trabalhadores após o uso do pesticida (SAILLENFAIT *et al.*, 2015).

Casos de intoxicação aguda têm sido relatados em humanos após a exposição ocupacional aos PIR, bem como em ambientes não profissionais. Esses problemas são causados por ventilação inadequada durante a aplicação, derramamentos de pesticidas ou de salpicos, uso excessivo ou incorreto, e armazenamento inadequado das substâncias (HUDSON *et al.*, 2014). Na maioria dos casos, os efeitos indesejados são reversíveis, enquanto fatalidades são relativamente raras. Os sinais e sintomas são mais comumente respiratórios (tosse ou irritação das vias aéreas superiores após a inalação de poeira ou aerossóis), gastrointestinais (náuseas e vômitos), oculares (eritema, ardência), dermatológicos (eritema, prurido) e/ou neurológicos (cefaleia, tontura, parestesias) (APPEL *et al.*, 2008).

Pouco se sabe sobre os efeitos em longo prazo da exposição repetida a baixos níveis de PIR (KOUREAS *et al.*, 2012). A preocupação é crescente sobre os possíveis efeitos da exposição na função reprodu-

va dos adultos do sexo masculino. Estudos epidemiológicos têm associado a exposição ocupacional e ambiental a PIR com a qualidade alterada do sêmen, incluindo danos ao DNA e diminuição da concentração dos espermatozoides. Diversos estudos têm investigado os efeitos da exposição aos PIR durante a gestação. Alguns desses estudos sugerem que em concentrações ambientais, os produtos podem induzir mudanças sutis em mecanismos imunológicos e no neurodesenvolvimento. Um estudo sugeriu que a quantidade de metabólitos urinários de PIR pode estar associada com um risco elevado de leucemia linfoblástica aguda infantil (DING *et al.*, 2012). Uma meta-análise também mostrou um aumento do risco da doença associado à exposição ocupacional de gestantes aos inseticidas (WIGLE *et al.*, 2009). Em 2009, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA – *United States Environmental Protection Agency*) classificou a permetrina como "provavelmente cancerígeno para os seres humanos" quando ingerida.

#### **2.2.4 Triazois**

Os efeitos potenciais dos fungicidas triazois e seus metabólitos no sistema endócrino são de grande preocupação para a vida selvagem e para a saúde humana. Neste contexto, os pesticidas triazois mereceram uma atenção especial devido ao seu potencial de inibição da aromatase do citocromo P450. A aromatase do citocromo P450 (CYP19) catalisa a conversão de androstenediona e da testosterona em estrona e estradiol, respectivamente. Assim, a aromatase modula o equilíbrio estrogênico essencial não apenas para as fêmeas, mas também para a fisiologia masculina, que inclui a função gonadal. Essa inibição afeta os órgãos repro-



ditivos, a fertilidade e o comportamento sexual em humanos e animais selvagens (SAXENA *et al.*, 2015). Os triazóis alteram a expressão gênica no fígado, especialmente em vias biológicas que regulam a homeostase lipídica, esterol e esteroide. A modulação do esteroide hepático e do metabolismo de esteroides é um mecanismo de ação plausível para alterações na testosterona sérica e resultados reprodutivos adversos observados em estudos com ratos e pode ser relevante para a avaliação do risco humano (MARTIN *et al.*, 2007).

### **2.2.5 Glifosato**

Os herbicidas à base de glifosato são os pesticidas mais utilizados mundialmente. Atualmente proibido na Europa, esses agrotóxicos ainda são comercializados em alguns países, como os Estados Unidos e o Brasil. Em SC, entre 2007 e 2012, foram vendidos aproximadamente 4 milhões de toneladas de produtos à base de glifosato (SANTA CATARINA, 2013). Os adjuvantes que compõem as formulações, apresentados como inertes e confidenciais, têm se mostrado mais tóxicos do que o próprio glifosato e não foram inclusos nas avaliações de risco durante o processo de liberação do uso. Esses agrotóxicos contaminam a água potável, tornando-a uma fonte de exposição rotineira. Além disso, a meia-vida do glifosato na água e no solo é maior do que se considerava inicialmente. Estudos têm reportado variações de dias, meses e anos, dependendo da composição do solo. Em 2015, a IARC considerou que há evidências suficientes de que o uso e consumo de glifosato aumenta o risco de desenvolvimento do linfoma não-Hodgkin e outros tipos de câncer. O grupo classificou o glifosato como provavelmente carcinogê-

nico para humanos (CIT, 2017). No Brasil, a classificação toxicológica do glifosato está em reavaliação pela ANVISA.

Defarge e colaboradores (2016) demonstraram que o glifosato, tanto puro quanto as suas formulações, possuem atividade desreguladora de hormônios *in vitro*, alterando múltiplos hormônios esteroides. Dentre as várias consequências comprovadas da desregulação endócrina, encontram-se a infertilidade, puberdade precoce, endometriose, câncer de mama, de próstata, dos testículos e dos ovários, disfunção sexual, disfunção tireoidiana e obesidade. Outro estudo, com ratos, mostrou que houve dano oxidativo ao fígado e rins dos animais devido à desregulação do metabolismo mitocondrial, em níveis de exposição considerados seguros. Os níveis de glifosato e do seu metabólito em amostras de tecido hepático e renal são 10 a 100 vezes maiores do que os níveis encontrados na gordura, músculos e na maioria dos outros tecidos. De fato, tem havido aumento na frequência de doença renal crônica em agricultores de áreas em que há uma combinação do uso intensivo de glifosato e consumo de água “dura” (MYERS *et al.*, 2016).

### **2.2.6 Paraquat**

O paraquat é um herbicida que pertence ao grupo químico dos bipyridílios, moléculas com atividade relacionada à formação de radicais superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ), os quais são a base da geração de estresse oxidativo. Na presença de oxigênio e de fornecimento contínuo de elétrons, haverá um ciclo de oxidações e reduções, com produção contínua de ânion superóxido. Os efeitos tóxicos do paraquat explicam-se, em grande parte, pelas reações de oxirredução. Nas células, a lesão oxidante provoca

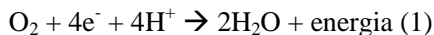
um grande espectro de respostas que incluem a senescência e a morte celular. O resultado pode variar significativamente de acordo com a natureza da célula (MARTINS, 2013).

Em roedores, o paraquat produz um modelo de doença de Parkinson através de estresse oxidativo. Além disso, o pesticida está associado com risco aumentado da doença em humanos. As enzimas antioxidantes proporcionam proteção celular contra os radicais livres e podem potencialmente modular a toxicidade (GOLDMAN *et al.*, 2012). De Jong e colaboradores (2014) avaliaram a toxicidade pulmonar do paraquat. Segundo os pesquisadores, é muito provável que o efeito da exposição ao agrotóxico seja mais pronunciado quando os sistemas antioxidantes já estão esgotados pelo tabagismo e o tecido pulmonar já foi danificado pelos radicais livres oriundos do consumo do tabaco. A exposição ocupacional a pesticidas pode, então, agir de forma sinérgica com a exposição ao tabaco. Assim como o glifosato, o paraquat também foi proibido na Europa, mas continua sendo vendido em outros países, inclusive no Brasil.

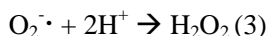
### **2.3 Estresse oxidativo e biomonitoramento**

A produção de radicais livres (RL) pelo organismo é um processo fisiológico que viabiliza uma série de processos biológicos, como a geração de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) na cadeia transportadora de elétrons, ativação de genes e participação em mecanismos de defesa contra agentes infecciosos. Quando produzidos em excesso, contudo, os RL trazem efeitos deletérios (BARBOSA *et al.*, 2010), como a oxidação de biomoléculas, o que leva à perda de suas

funções biológicas, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITMAN, 2004). Em longo prazo, tais eventos corroboram com a patogenia de numerosas enfermidades crônicas, dentre elas a aterosclerose, o diabetes, a obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer. Os RL compõem uma espécie (átomo ou molécula) que possui um ou mais elétrons desemparelhados e atua na transferência desses elétrons em muitas reações bioquímicas. Juntamente com outras espécies não radicalares, formam o que denominamos espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A geração de RL ocorre principalmente na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, mas também nas membranas celulares, como efeito da radiação ionizante, e no citoplasma. Podem ser produzidos ainda pela explosão respiratória que ocorre em fagócitos ativados e como subprodutos de várias enzimas celulares incluindo NADPH oxidase (*Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase*), xantina oxidase e óxido nítrico sintase endotelial (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; ALFADDA; SALLAM, 2012). Na cadeia de transporte de elétrons, o  $O_2$  sofre redução para que ocorra a formação de água ( $H_2O$ ). Para isso, a enzima citocromo oxidase atua sobre quatro moléculas de citocromo c, removendo um elétron de cada uma delas. Os elétrons são transferidos para o oxigênio conforme a reação:



Portanto, a citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres:



Os íons ferro e cobre, por serem muito reativos, funcionam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. O  $\text{Fe}^{+2}$  ou  $\text{Cu}^+$  reagem com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando o radical  $\text{HO}^\bullet$ , numa reação denominada de Reação de Fenton. Esses íons também agem como catalisadores da reação entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , a fim de gerar o radical  $\text{HO}^\bullet$ , na reação denominada Reação de Haber-Weiss (BARBOSA *et al.*, 2010). A Tabela 1 traz as principais espécies reativas de oxigênio.

Para que haja a manutenção da homeostase, os organismos tentam manter o equilíbrio com um rígido controle das EROs e, para isso, contam com a ajuda de um complexo sistema antioxidante. Quando existe um desequilíbrio entre as moléculas pró e antioxidantes, com predomínio das pró-oxidantes, ocorre estresse oxidativo (EO), que é responsável pela indução de danos celulares (Figura 1). Tais danos podem atingir todos os tipos de moléculas, incluindo DNA, lipídios, proteínas e carboidratos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; ALFADDA; SALLAM, 2012).

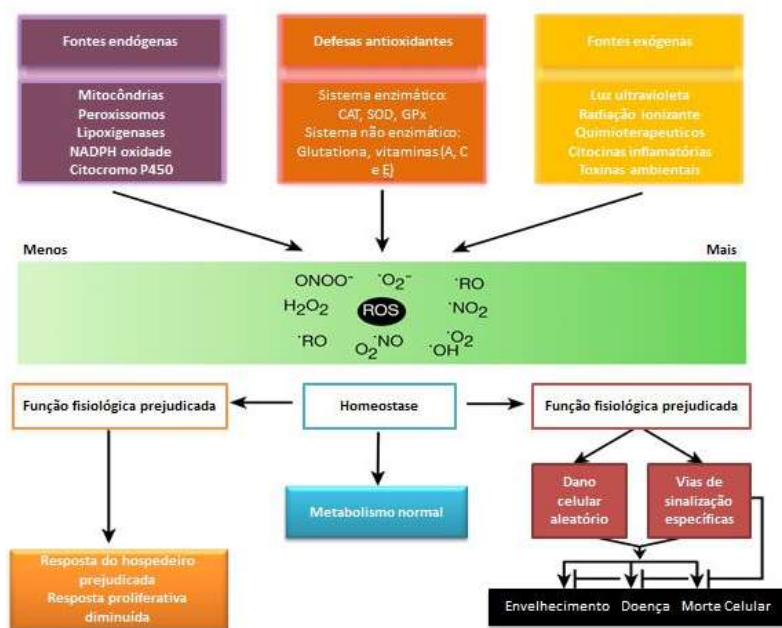
**Tabela 1.** Principais espécies reativas de oxigênio (ERO<sub>s</sub>) e suas características.

EROS	Características
Superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-•</sup> )	Ocorre em quase todas as células aeróbicas, sendo produzido a partir da ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos.
Hidroperoxil (HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	É a forma protonada do radical superóxido. É mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas.
Hidroxil (HO <sup>•</sup> )	É o radical mais reativo. Se o hidroxil for produzido próximo ao DNA poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Oxida grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) nas proteínas e inicia a lipoperoxidação.
Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Apesar de não ser um radical livre, o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o HO <sup>•</sup> . O H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro.

Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) Formado a partir da reação entre  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{NO}^{\cdot}$ , é uma espécie reativa de nitrogênio.

Fonte: Adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; BARBOSA *et al.*, 2010

**Figura 1.** Esquema simplificado das principais fontes de EROs, sistema de defesa antioxidante e os efeitos biológicos.



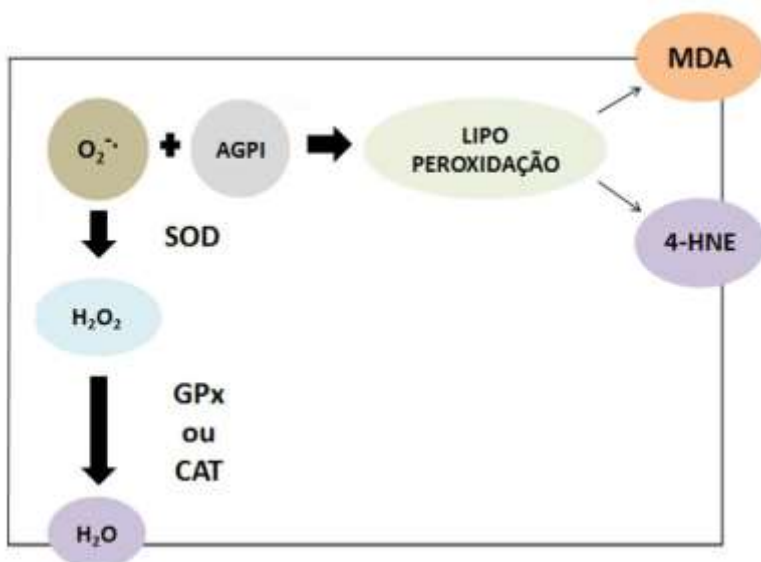
Fonte: Adaptado de FINKEL; HOLBROOK, 2000.

O monitoramento do EO é feito pela dosagem dos marcadores oxidativos e antioxidantes. Dentre os marcadores oxidativos, está a quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O ensaio TBARS dosa malondialdeído (MDA) que é uma substância formada como subproduto da peroxidação lipídica (MURUSSI *et al.*,

2014). A peroxidação lipídica gera uma complexa variedade de produtos, muitos dos quais eletrófilos reativos. Alguns desses produtos reagem com proteínas e com DNA, resultando em efeitos tóxicos. O dano ao DNA ocorre pela modificação dos pares de bases nitrogenadas e por ligação cruzada do DNA com proteínas. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana é a estrutura mais atingida em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade. Como consequência, ocorre perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo das organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como isoprostanos e malondialdeído), culminando com a morte celular. Mas, assim como ocorre na formação das EROs, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo. O MDA tem sido utilizado há muitos anos como um bioindicador para a peroxidação lipídica (MARNETT, 1999; HIGDON *et al.*, 2012). A Figura 2 mostra, simplificadamente, os caminhos que um ânion radical superóxido pode tomar: lipoperoxidação ou neutralização pelas enzimas antioxidantes.



**Figura 2.** Vias de transformação possíveis do radical superóxido: peroxidação lipídica e neutralização pelas enzimas antioxidantes.



AGPI: ácido graxo poli-insaturado; SOD: Superóxido dismutase; GPx: Glutathiona peroxidase; CAT: catalase; MDA: malondialdeído; 4-HNE: 4- hidroxinoneal. Fonte: Adaptado de KWIECIEN *et al.*, 2002.

Os sistemas antioxidantes são divididos em duas classes: o sistema não enzimático, composto principalmente por  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e alfa tocoferol (vitamina E), e o sistema enzimático, com a Catalase (CAT), Glutathiona Peroxidase (GPx), Glutathiona Redutase (GR) e Superóxido Dismutase (SOD) como as principais enzimas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Muitas reações de degradação produzem RL e a maneira que o organismo encontrou para se defender desses produtos foi a formação de peroxissomos, pequenas vesículas envoltas por membrana onde ocorrem reações com grande quantidade de enzimas. O presente estudo analisou a ativi-

dade da CAT, uma hemeproteína com atividade dependente do ferro (Fe) da porção heme. Ela é encontrada principalmente nos hepatócitos e eritrócitos e sua função específica é reduzir o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), formado ao final da cadeia de transporte de elétrons, em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ). Essa função é dividida com a GPx, a qual atua, principalmente, na presença de baixos níveis de  $H_2O_2$  (já que GPx possui maior afinidade com o  $H_2O_2$ ), enquanto em altas concentrações de  $H_2O_2$  a atividade predominante é a da CAT (BARREIROS *et al.*, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Portanto, uma alta atividade enzimática da CAT se dá em alta concentração de  $H_2O_2$ , o que sugere forte evidência oxidativa. Juntos, a dosagem da atividade das enzimas antioxidantes e a quantificação de metabólitos de origem oxidativa podem servir para avaliar o quadro de estresse oxidativo.

## 2.4 Genotoxicidade e biomonitoramento

Já é amplamente aceita a existência de uma forte ligação entre instabilidade genética e o desenvolvimento do câncer. As alterações genéticas associadas à carcinogênese podem ser classificadas em quatro categorias: (1) pequenas alterações de sequência envolvendo substituições de bases ou inserções e eliminações de alguns nucleotídeos, (2) ampliações gênicas, (3) perdas ou ganhos de cromossomos inteiros e (4) aberrações cromossômicas (BURMA *et al.*, 2006).

Diversos agentes etiológicos são capazes de causar danos ao DNA e, dentre eles, podemos destacar diversas substâncias químicas encontradas no meio ambiente, como, por exemplo, os agrotóxicos. Com o biomonitoramento dos indivíduos expostos, se tem caracterizado

o risco genético associado à exposição aos pesticidas (BOLOGNESI *et al.*, 2011). Deve-se notar que “a exposição aos pesticidas” é um termo abrangente, cobrindo misturas complexas de produtos químicos e muitas variáveis que podem reduzir ou potencializar seu risco. Muitos estudos *in vitro* e *in vivo*, bem como abordagens epidemiológicas, demonstraram a capacidade de certos pesticidas de produzir toxicidade genômica. Essa genotoxicidade é considerada fator de risco primário que desencadeará efeitos ao longo dos anos, como processos carcinogênicos, neurológicos e reprodutivos, em decorrência das frequentes exposições. Alterações genéticas podem ocorrer devido a processos mutagênicos e também não mutagênicos, provocados a partir do uso dos agrotóxicos (BOLOGNESI *et al.*, 2003; BOLOGNESI *et al.*; GEORGE; SHUKLA, 2011). Os danos ao DNA podem ocorrer pelas quebras das fitas simples (*single strand breaks* – SSBs) ou quebras das fitas duplas (*double strand breaks* – DSBs), sendo as SSBs as mais comuns. Estas podem surgir em uma frequência de dezenas de milhares de células por dia.

Por conseguinte, o reparo do DNA apresenta-se como um mecanismo de suma importância para a manutenção da integridade dos organismos e para garantir a estabilidade genômica. Em relação a SSBs, esse dano pode ser sanado pela via de reparo por excisão de bases ou via de reparo por excisão de nucleotídeos. Em ambos os casos, a lesão é removida e a sequência do DNA original é restaurada por uma enzima DNA polimerase, utilizando a fita não danificada como molde (NAKA-BEPPU, 2014). Já as DSBs são um tipo de lesão potencialmente perigoso e ocorrem quando as duas fitas da dupla hélice do DNA são quebradas, não restando uma fita molde intacta para o reparo. Nesse caso, as vias de reparo não são consideradas livres de erro, pois a quebra da fita

não é reparada com a utilização de uma fita homóloga como molde. Consequentemente, inserções e deleções podem ser geradas no local do reparo, comprometendo, assim, a integridade do genoma e podendo levar à carcinogênese principalmente quando as alterações envolvem um gene supressor de tumor ou um proto-oncogene (BURMA *et al.*, 2006; KOZAK, 2009). Para o reparo das DSBs, duas vias de reparo podem ser seguidas: a junção de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining* – NHEJ) ou a junção de extremidades homólogas ou recombinação homóloga (*homologous recombination* – HR) (KOZAK, 2009). A HR ocorre apenas nas fases S/G2 do ciclo celular, quando uma das cromátides irmãs está disponível. A NHEJ ocorre em todas as fases do ciclo e constitui a via principal, contribuindo significativamente para a manutenção da estabilidade genômica nas células. Nesse caso, as duas extremidades da fita de DNA quebrada são simplesmente reconectadas.

Apesar de os dados epidemiológicos sobre o risco no desenvolvimento de câncer serem conflitantes, alguns estudos demonstram uma forte relação entre a exposição ocupacional e alguns proto-oncogenes nas populações expostas, decorrentes dos efeitos citogenéticos dos agrotóxicos (BOLOGNESI *et al.*; GEORGE; SHUKLA, 2011). É atribuída maior frequência de risco ao câncer acometendo cérebro, pele, esôfago, pulmão, rim, bexiga, próstata, testículo, tireoide, colo e reto, partes moles, além das leucemias e o linfoma não-Hodgkin (BLAIR; FREEMAN, 2009). Devido às evidências de efeitos carcinogênicos causados por agrotóxicos e à frequência de risco aumentada no desenvolvimento de malignidades em populações expostas ocupacionalmente, é cada vez maior a necessidade de se realizarem estudos destas populações (SINGH *et al.*, 2011).

Os biomarcadores são indicadores dos efeitos relacionados ao risco ocupacional nos sistemas biológicos e podem ser mensurados por técnicas que avaliam diferentes células e moléculas. Eles podem indicar de forma qualitativa e quantitativa os níveis de exposição e correlacionar os resultados com problemas de saúde a que indivíduos expostos estejam sujeitos (GEORGE; SHUKLA, 2011). Duas das ferramentas mais utilizadas no biomonitoramento da instabilidade genômica são o ensaio Cometa e a técnica de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese Celular, principalmente porque permitem avaliar de maneira precisa possíveis efeitos deletérios no DNA decorrentes das exposições ocupacionais.

O ensaio Cometa deve ser considerado o método de escolha para medir os danos no DNA provocados por diferentes agentes genotóxicos, incluindo produtos químicos como os agrotóxicos. Os danos observados no teste são devido a lesões do DNA ainda passíveis de reparo. Em geral, lesões genômicas detectadas são decorrentes de SSBs e DSBs, eventos de reparo por excisão de bases incompletas, *crosslinks* DNA-DNA, *crosslinks* DNA-proteínas, e formação de sítios álcali-lábeis (SINGH *et al.*, 1988). O ensaio Cometa é conhecido por sua versatilidade e amplitude devido as suas possíveis aplicações. Os resultados obtidos com o ensaio Cometa podem ser utilizados para associar o risco em desenvolver câncer, envelhecimento precoce e doenças ligadas ao estresse oxidativo como, por exemplo, diabetes e doenças cardiovasculares. Um aspecto relevante é a variação individual entre a resposta aos danos no DNA e a influência dos agentes ambientais na genética, por isso, os dados obtidos com a realização do teste são capazes de oferecer um aconselhamento individual em relação aos riscos relativos à exposi-

ção a agentes genotóxicos. Contudo, não é aplicada ao ensaio a detecção de mutações, uma vez que o efeito de reparo pode inibir a sua ocorrência. Este método permite a observação dos níveis de danos ao material genético celular, devido à migração do DNA danificado em um gel de agarose em uma corrida eletroforética. A intensidade de migração, que é revelada pela coloração, é o que se utiliza para classificar o dano de 0 a 4, sendo que 0 representa a ausência de dano e 4 o dano máximo (Figura 3). O método foi descrito inicialmente por Singh e colaboradores, em 1988, e foi adaptado para ensaios *in vivo* por Tice e colaboradores, em 2000, adaptação essa que foi utilizada neste trabalho.

**Figura 3.** Células submetidas ao ensaio Cometa coradas por solução de prata.



O DNA danificado deixa um rastro após ser submetido à eletroforese. O comprimento do rastro do “Cometa” é proporcional à quantidade de dano. Visualização em microscópio óptico. Fonte: Acervo pessoal.

A técnica CBMN em cultura de linfócitos do sangue periférico tem sido aplicada com sucesso na identificação de fatores que tenham

impacto significativo na instabilidade genética. Sua alta reprodutibilidade e o baixo custo da técnica têm colaborado para sua extensa aplicação e adoção desse biomarcador em estudos *in vitro* e *in vivo* de dano ao DNA. Os Micronúcleos se originam de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não tenham sido incluídos no núcleo da célula filha durante a divisão celular. A formação de MN nas células em divisão é resultado de quebra cromossômica devido a lesões do DNA não reparadas ou reparadas erroneamente, ou de erros durante o fuso mitótico com separação malsucedida dos cromossomos. Esses eventos podem ser induzidos por estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos na etapa de *checkpoint* do ciclo celular e em genes de reparo do DNA. A deficiência de nutrientes que sejam cofatores para o metabolismo do DNA e fuso mitótico dos cromossomos também pode levar aos erros. Todos esses eventos podem causar a formação de MN durante o rearranjo cromossômico, alterar a expressão genética e produzir efeitos associados com fenótipo de instabilidade cromossômica, como vistos no câncer (FENECH, 2002; BONASSI *et al.*, 2006).

A presença de uma associação entre a indução de MN e o desenvolvimento do câncer é sustentada por várias observações. As mais bem fundamentadas incluem: (1) a alta frequência desse biomarcador em pacientes com câncer não tratados e em indivíduos afetados por doenças congênitas; (2) presença elevada de MN na mucosa oral, usado como biomarcador substituto em ensaios clínicos de quimioprevenção; (3) correlação existente entre agentes indutores de MN e carcinogenicidade como, por exemplo, radiação ionizante e ultravioleta; e (4) a correlação inversa entre a frequência de MN e a concentração sanguínea de

certos micronutrientes associados com risco reduzido de câncer como, por exemplo, folato, cálcio, vitamina E e ácido nicotínico. Outras evidências – baseadas na correlação entre aberrações cromossômicas e MN – resultam de estudos de coorte os quais, em sua maioria, demonstram que a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis é preditiva do risco de câncer (BONASSI *et al.*, 2006; BONASSI *et al.*, 2011).

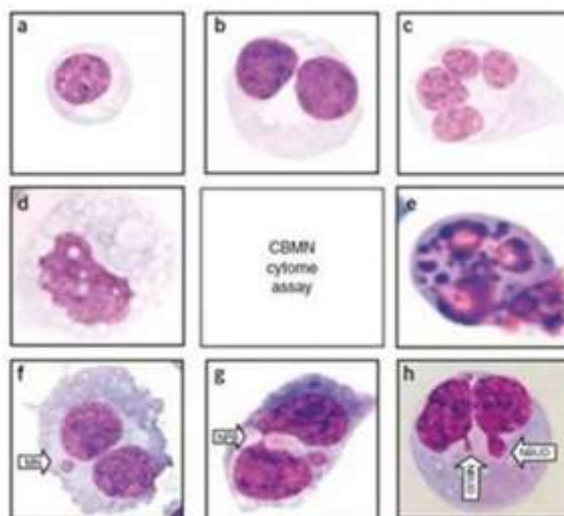
Para responder questões e avaliar os fatores que teriam influência na frequência de MN como, por exemplo, sexo, idade e comorbidades, dentre outros, os principais pesquisadores do assunto criaram o projeto HUMN. O HUMN, que significa *Human MicroNucleus*, também é conhecido como o Projeto Internacional Colaborativo sobre Frequência de Micronúcleos em Populações Humanas. O HUMN foi lançado em 1997 devido ao interesse mundial na aplicação do método CBMN e serviu para avaliar os efeitos ambientais sobre danos cromossômicos (FENECH *et al.*, 1999). A pesquisa está atualmente focada em linfócitos humanos e células epiteliais esfoliadas como biomarcadores de exposição a substâncias tóxicas e como preditores potenciais de efeitos adversos à saúde. A combinação dos dados disponíveis de uma variedade de populações humanas proporcionaria uma ferramenta poderosa para a avaliação de frequências de MN para estudos epidemiológicos. Os laboratórios que realizam estudos de MN em linfócitos humanos e células bucais são convidados a participar e, atualmente, mais de 40 laboratórios de todo o mundo estão participando dos diferentes aspectos do HUMN (FENECH *et al.*, 2011).

A técnica CBMN foi descrita por Fenech e Morley, em 1985. A Figura 4 mostra as alterações celulares encontradas quando submetidas à



coloração de Giemsa. A análise das alterações é feita contando o número de eventos que ocorrem em cada paciente após a análise de 1000 linfócitos binucleados. A incidência de mutações cromossômicas pode ser verificada mediante análise citogenética com a pesquisa de MN em linfócitos ou em epitélio de descamação (FENECH *et al.*, 1999).

**Figura 4.** Formas celulares e alterações encontradas pela técnica CBMN.



a) célula mononucleada; b) célula binucleada; c) célula multinucleada; d) célula em necrose; e) célula em apoptose; f) célula com um micronúcleo; g) célula com um micronúcleo e uma ponte nucleoplasmática; h) célula apresentando dois *Buds*. Fonte: Adaptado de FENECH *et al.*, 2007.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar o dano de DNA e o estresse oxidativo em amostras de sangue periférico de agricultores com exposição ocupacional a misturas de agrotóxicos, residentes no município de Antônio Carlos (SC).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Analisar os índices de quebras de fita simples, quebras de fita dupla e de alterações estruturais sensíveis ao pH alcalino das fitas de DNA, pelo ensaio Cometa;
- Analisar a frequência de Micronúcleos, *Buds* e Pontes Nucleoplasmáticas em linfócitos binucleados, pela técnica de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese Celular;
- Realizar os ensaios TBARS e atividade da Catalase para avaliação do estresse oxidativo;
- Correlacionar os resultados obtidos com valores das colinesterases eritrocitária e plasmática.



## **4 SUJEITOS E MÉTODOS**

### **4.1 Casuística**

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo, onde foram avaliados 50 indivíduos da população rural do município de Antônio Carlos, expostos à mistura de agrotóxicos, e 46 controles sem histórico de exposição ocupacional a agrotóxicos, os quais foram pareados quanto à faixa etária, condição de tabagista e local de residência. Outro grupo controle, composto por 29 indivíduos residentes na cidade de Florianópolis, teve seu sangue periférico avaliado para fins de comparação entre as duas localidades. O cálculo amostral foi realizado com o uso do programa WinPepi 8.0, levando-se em consideração a variação normalmente encontrada nas técnicas utilizadas. Foram incluídos, no grupo exposto, indivíduos com histórico de exposição a agrotóxicos como atividade laboral há pelo menos 15 anos. A seleção dos agricultores contou com o apoio da Secretaria de Saúde do Município de Antônio Carlos. A partir de uma pré-seleção dos indivíduos e de seus respectivos endereços, realizada por uma agente de saúde do local, uma equipe de pesquisadores do presente projeto passou a realizar as visitas domiciliares e aos locais de trabalho. Contou-se também com o apoio da Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho (FUNDA-CENTRO) – Regional SC, que disponibilizou o meio de transporte e dois funcionários para a composição da equipe.

No contato com os agricultores, foram oferecidos esclarecimentos a respeito do projeto e, nos casos de aceite, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I) foi aplicado. Em seguida, os

participantes responderam a um questionário (ANEXO II) contendo perguntas a respeito dos dados sociodemográficos, exposição a agentes químicos, história ocupacional, história clínica (câncer, diabetes, hipotireoidismo, problemas de audição, depressão e ansiedade), consumo de álcool e tabaco, procedência de alimentos e água, além do uso de medicamentos. Após a aplicação do questionário, procedeu-se com a coleta de amostras de sangue para as análises previstas no projeto encaminhado ao PPSUS.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o Número do Parecer 507.310.

## **4.2 Amostras**

As amostras coletadas para as análises foram de sangue total. Com o apoio de uma técnica de enfermagem, foram coletados de cada participante 1 tubo de 4 mL com heparina para a realização dos ensaios Cometa e CBMN, 1 tubo de 4 mL com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) para TBARS, atividade da Catalase e AChE e 1 tubo de 5 mL de soro com gel separador para BChE.

## **4.3 Ensaio Cometa**

O protocolo utilizado foi baseado na técnica proposta por Singh e colaboradores (1988) e adaptada por Tice e colaboradores (2000). Em lâminas histológicas previamente lavadas, foi confeccionada uma pré-cobertura com agarose de ponto de fusão normal (*Normal Melting Point*

ou NMP). A agarose foi diluída em água e aquecida em forno de micro-ondas. As lâminas foram mergulhadas numa cubeta contendo agarose e tiveram um dos lados limpos com papel absorvente para retirá-la. Em seguida, foram levadas à estufa a 50° C por 2 horas. A agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point* ou LMP) foi aquecida a 37°C em banho-maria. Com uma micropipeta foram misturados 95 µL da agarose LMP e 5 µL de sangue periférico heparinizado. Os 100 µL resultantes foram dispostos sobre a lâmina pré-coberta por agarose NMP em duas ou três gotas, a qual foi imediatamente coberta por uma lamínula, misturando-se as duas camadas e evitando-se a formação de bolhas de ar. O material foi colocado na geladeira, horizontalmente, para endurecimento. Após aproximadamente 10 minutos, a lamínula foi cuidadosamente retirada. Posteriormente, a lâmina foi, colocada em cubeta vertical, numa solução de lise gelada, por no mínimo, 2 horas. A solução de lise foi preparada misturando-se 99 mL de solução de lise mãe (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM) com 10 mL de DMSO e 1 mL de Triton x-100. Para a eletroforese, o tampão (NaOH, EDTA 200 mM e água destilada em pH 10) foi preparado antes de se iniciar a corrida e deixado na geladeira (deve estar a 4° C). A cuba de eletroforese foi envolta em gelo. As lâminas foram retiradas da lise e colocadas lado a lado, sem brechas, na cuba. O tampão foi adicionado e somente após 20 minutos a corrente foi ligada. Este tempo de contato das lâminas com o tampão é necessário para que haja a separação das cadeias de DNA e, assim, elas possam migrar em direção ao ânodo. As condições da eletroforese foram 25 V e 300 mA (ajustado com o aumento ou diminuição do volume de tampão). As corridas levaram 20 minutos. Amostras tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µM foram utilizadas como controle positivo. As lâminas foram reti-

radas cuidadosamente da cuba (a fim de se evitar o deslocamento do gel) e lavadas 3 vezes com o tampão de neutralização (5 minutos cada lavagem). Logo em seguida, as lâminas foram lavadas 2 vezes com água destilada e deixadas secar por no mínimo 2 horas a 37° C. Para a fixação do material, o mesmo foi mergulhado por 10 minutos na solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5% e glicerol 5%), lavado 3 vezes com água destilada e colocado para secar por, no mínimo, 2 horas a 37°C. Antes da coloração, as lâminas foram reidratadas por 5 minutos em água destilada. A coloração seguiu o método descrito por Nadin e colaboradores (2001) As soluções de coloração A (carbonato de sódio 5%) e B (nitrato de amônio 0,02%, nitrato de prata 0,02%, ácido tungstosilícico 0,1%, formaldeído 0,05%) foram misturadas imediatamente antes do uso e as lâminas foram colocadas em cubetas contendo esta solução de trabalho por aproximadamente 30 minutos. Depois que as lâminas atingiram uma coloração acinzentada, foram lavadas com água destilada e colocadas na solução de parada (ácido acético 1%) por 5 minutos. Após lavar novamente com água destilada, as lâminas secaram a temperatura ambiente. Prosseguiu-se, então, com a análise.

Foram confeccionadas duas lâminas para cada indivíduo e em cada uma foram contadas 50 células. As análises foram realizadas de forma cega por um único observador. Regiões próximas às margens da lâmina ou a bolhas de ar foram evitadas, pois a migração pode ser prejudicada nestes locais. As células foram observadas em microscópio óptico (ZEISS Primo Star) no aumento de 100 vezes. A migração do DNA danificado durante a eletroforese forma uma cauda semelhante a um cometa, que corresponde à intensidade do dano (Figura 3). Os Co-



metas foram classificados em cinco classes de dano, de 0 a 4: classe 0, células sem danos causados pela exposição; classe 1, células com danos mínimos; classe 2, células com danos médios; classe 3, células com danos intensos e classe 4, células com danos máximos. O somatório dos valores (de 0 a 4) dos 100 núcleos analisados resulta no índice total de dano, que pode variar, dessa forma, de 0 a 400 unidades arbitrárias.

#### **4.4 Micronúcleos com o Bloqueio da Citocinese Celular**

Em um tubo de cultura contendo 5 mL de meio de cultura do tipo RPMI, 1 mL de soro bovino fetal e 100 µL de fitohemaglutinina A, foram adicionados aproximadamente 5 mL de sangue. Em seguida, o tubo contendo as células foi colocado em estufa a 37°C. Após 44 horas de cultura, foram adicionados 6 µg de citocalasina B por mL de cultura, permanecendo na estufa por mais 28 horas, conforme o método descrito por Fenech e Morley (1985). Ao final das 72 horas, o tubo com a cultura foi centrifugado a 1.500 rpm durante 8 minutos em centrífuga. O sobrenadante foi descartado e seguiu-se com adição lenta de 5 mL de uma solução hipotônica aquecida de KCl 0,075 M. O KCl agiu sobre as hemácias durante 7 minutos e, em seguida, foram adicionados e homogeneizados lentamente 0,5 mL de solução fixadora de metanol e ácido acético (3:1). Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado, 5 mL da solução fixadora foram adicionados e o material foi para a geladeira. Passados 10 minutos, partiu-se para a lavagem das hemácias com centrifugações seguidas pela adição de solução fixadora até que o sobrenadante tenha se tornado límpido. No último descarte, foi deixado 1 mL do sobrenadante no tubo e o material foi ressuspensionado. Em lâminas

previamente lavadas e colocadas no congelador foram gotejadas, de uma altura de 30 cm, 2 a 4 gotas do material. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5% (FENECH *et al.*, 1999).

A análise foi realizada por microscopia óptica (ZEISS Primo Star) contando-se o número de eventos que ocorreram em cada paciente após a análise de 1000 linfócitos binucleados. Os eventos avaliados foram: Micronúcleos (MNs), *Buds* nucleares e Pontes Nucleoplasmáticas (PNPs) (Figura 4). As análises foram realizadas de forma cega por um único observador.

#### 4.5 TBARS

O ensaio baseia-se na detecção das substâncias resultantes de peroxidação lipídica que reagem com o ácido tiobarbitúrico segundo o método de Bird e Draper (1984). Em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL de ácido tricloroacético 12% (TCA). Seguiu-se com a adição de 100  $\mu$ L de plasma e, em seguida, o tubo foi homogeneizado em vórtex. Acrescentou-se 0,9 mL de tampão Tris-HCl 60 mM, pH 7,4 (0,1 mM DTPA) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,73%. Após nova homogeneização, o tubo foi incubado a 100 °C em banho-maria por 1 hora. Ao final, o tubo com o material foi resfriado por 30 minutos a 4 °C e depois foi centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos. Com micropipeta, foram transferidos 200  $\mu$ L do sobrenadante para uma microplaca e seguiu-se com a leitura em 535 nm na Multileitora Infinite M200 TECAN. O resultado foi expresso em  $\text{nmol.mL}^{-1}$ . As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.6 Catalase

A atividade da Catalase foi determinada segundo o método descrito por Aebi (1984). O método determina a velocidade da decomposição do peróxido de hidrogênio durante 20 segundos, pela enzima catalase presente na amostra. No dia da análise, foi preparada e titulada uma solução de trabalho composta de peróxido de hidrogênio 10 nM em tampão fosfato 50 nM pH 7,0. Em uma microplaca, foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de sangue periférico em EDTA diluído 1:20. 200  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho foram acrescentados, com auxílio de micropipeta multicanal, imediatamente antes leitura em 240 nm, na Multileitora Spectramax Paradigm. Os valores foram expressos em  $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### 4.7 Colinesterases

O Setor de Toxicologia do Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSC foi responsável pela avaliação das colinesterases. O princípio do método consiste na hidrólise de um substrato de acetilcolina pela AChE, na primeira etapa da reação, formando acetato e tiocolina. Na segunda etapa, a tiocolina reage com ácido ditionitrobenzóico (DTNB) produzindo o ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB).

Para avaliação de AChE (colinesterase eritrocitária), 100  $\mu\text{L}$  de amostra de sangue periférico em EDTA foram diluídos em 10 mL de tampão hemolisante, em tubo Falcon de 15 mL. O método validado pelo Laboratório de Toxicologia permitiu eliminar interferências da hemoglobina presente na amostra. Primeiramente, foi realizada uma leitura em 546 nm, para determinação da concentração de hemoglobina. Em

seguida, foi realizada a determinação da atividade da AChE. Adicionou-se a 1 mL do hemolisado, 10 µL de etopropazina 6,0 mM (para inibir a BChE), 2 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e 100 µL de solução de DTNB 10 mM. Depois, o tubo foi mantido em banho-maria a 37° C por, no mínimo, 10 minutos. Em seguida, foi acrescentado o substrato de acetiltiocolina 28,3 mM. A leitura cinética foi realizada por espectrofotômetro UV-1800 em 436 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Na avaliação da BChE, ocorre a hidrólise da butiriltiocolina pela BChE, com formação de butirato e tiocolina, que reduz o reagente de cor 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI), originalmente azul, tornando-o incolor. A variação na absorbância a 600 nm, é diretamente proporcional à atividade da BChE presente na amostra e é medida por uma técnica de taxa bicromática (600 e 700 nm) (FEIJÓ, 2016).

#### **4.8 Análise estatística**

Os dados deste estudo foram analisados no programa IBM SPSS 20.0. A avaliação da normalidade foi realizada utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e *one-way* ANOVA foram escolhidos para comparações entre os grupos, de acordo com os casos. Foram realizadas as Correlações de Spearman entre as variáveis. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Perfil da população avaliada

As informações acerca do perfil da população estudada foram coletadas por meio de questionário com entrevista (Tabela 2).

**Tabela 2.** Perfil do grupo Exposto e dos Controles Antônio Carlos e Florianópolis.

	<b>Grupo Exposto (n = 50)</b>	<b>Controle AC<sup>†</sup> (n = 46)</b>	<b>Controle Fp<sup>¶</sup> (n = 29)</b>
<b>Gênero</b>	82% masculino 18% feminino	43% masculino 57% feminino	51% masculino 49% feminino
<b>Idade (Média ± DP*)</b>	51,47 ± 14,23	48,83 ± 14, 23	27,46 ± 10,43
<b>Tabagismo</b>	14% sim 86% não	10% sim 90% não	2% sim 98% não
<b>Álcool (consumo semanal)</b>	56% sim 44% não	40% sim 60% não	—
<b>Anos de exposi- ção (Média ± DP*)</b>	34,64 ± 16,09	—	—
<b>Uso de EPI**</b>	72% sim 28% não	—	—
<b>Última exposi- ção</b>	até 2 dias : 29,1% 2 a 5 dias: 16,67% 6 a 10 dias: 22,92% 11 a 15 dias: 16,67% mais de 15 dias: 14,58%	—	—

†: Antônio Carlos; ¶: Florianópolis; \*DP: desvio-padrão; \*\*EPI: Equipamento de Proteção Individual. Fonte: Questionário.

## 5.2 Colinesterases

A atividade das enzimas colinesterases foi avaliada no grupo Exposto e no grupo Controle Antônio Carlos, apenas.

**Tabela 3.** Enzimas colinesterases dos grupos avaliados.

	<b>Grupo Exposto (n = 50)</b>	<b>Grupo Controle (n = 46)</b>	<b>Valor de referência</b>
<b>BChE (U/L)</b>	13908,00 ± 2528,52*	15204,35 ± 2858,82	7000 a 19000
<b>AChE (U/mmol Hb)</b>	500,58 ± 63,86	496,66 ± 58,11	352 a 779

(\*) representa a diferença estatística ( $p < 0,02$ ) em relação ao grupo Controle.

BChE: butirilcolinesterase; AChE: acetilcolinesterase.

## 5.3 Agrotóxicos mais utilizados

A Tabela 4 mostra os agrotóxicos mais utilizados pelos agricultores de Antônio Carlos e a respectiva classificação da ANVISA quanto à toxicidade.

**Tabela 4.** Agrotóxicos mais utilizados pelos agricultores e classificação toxicológica.

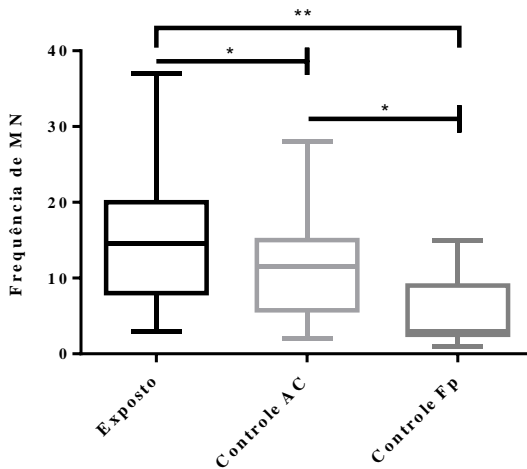
Nome comercial	Ação	Grupo Químico	Frequência	Classificação toxicológica ANVSA*
Gramoxone (Paraquat)	Herbicida	Bipiridílios	83,3%	Classe I
Roundup (Glifosato)	Herbicida	Glicina substituída	63,3%	Classe IV †
Fusilade	Herbicida	Ácido ariloxfenoxipropiônico	56,6%	Classe III
Karate, Decis	Inseticida	Piretroides	53,3%	Classe III
Sumilex, Captan, Folpan	Fungicida	Dicarboximida	43,3%	Classe IV
Opera	Fungicida	Triazois	40,0%	Classe II
Kasumin	Fungicida	Casugamicina	40,0%	Classe III
Provado, Confidor	Inseticida	Imidacloprida	36,7%	Classe III
Amistar, Comet	Fungicida	Estrobilurina	26,7%	Classe III
Antracol, Cabrio Top	Fungicida	Ditiocarbamato	20,0%	Classe III
Revus, Acuthon, Carial	Fungicida	Mandipropamida	20,0%	Classe II
Premio	Inseticida	Antranilamida	20,0%	Classe III

\*Classe I: Extremamente tóxico; Classe II: Altamente tóxico; Classe III: Moderadamente tóxico; Classe IV: Pouco tóxico. †Em reavaliação. Fonte: adaptado de Ana Júlia Lobo Feijó, 2016.

## 5.4 Marcadores de instabilidade genômica

A Figura 5 mostra o aumento significativo da frequência de MN no grupo Exposto em comparação aos grupos controle e nos grupos controles entre si.

**Figura 5.** Frequência de Micronúcleos nos grupos avaliados.



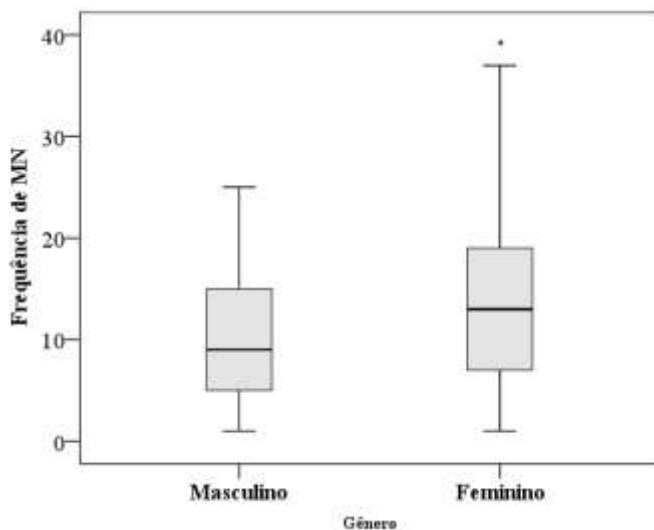
As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam, respectivamente, os interquartis e valores mínimos e máximos. Grupo Exposto (n = 50); grupo Controle AC (n = 46); grupo Controle Fp (n = 29). (\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,01$ ; (\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis). AC: Antônio Carlos; Fp: Florianópolis.

Houve aumento significativo da frequência de MN com  $p < 0,03$  (Mann-Whitney), para o gênero feminino (n = 49) em comparação ao gênero masculino (n = 75) (Figura 5). Os demais marcadores de ins-



tabilidade genômica também foram maiores para as mulheres, porém, as diferenças não foram significativas.

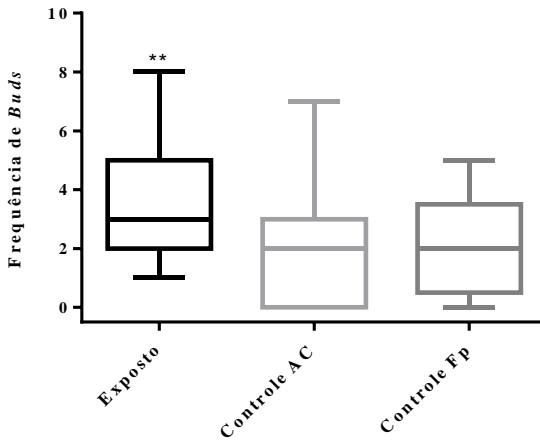
**Figura 6.** Frequência de Micronúcleos de acordo com o gênero.



As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam, respectivamente, os interquartis e valores mínimos e máximos. Gênero masculino (n = 75); gênero feminino (n = 49). (\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,03$  (Mann-Whitney).

A Figura 7 mostra o aumento significativo da frequência de *Buds* no grupo Exposto em comparação aos grupos controle.

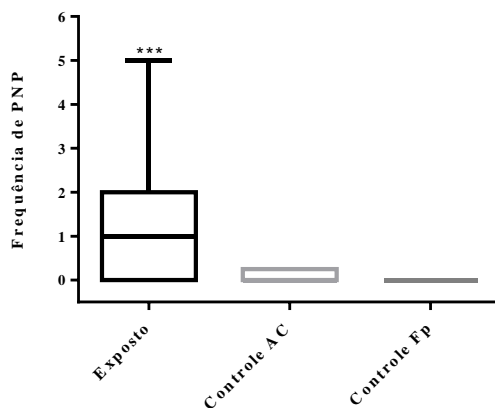
**Figura 7.** Frequência de *Buds* nos grupos avaliados.



As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam, respectivamente, os interquartis e valores mínimos e máximos. Grupo Exposto (n = 50); grupo Controle AC (n = 46); grupo Controle Fp (n = 29). (\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,005$  em relação aos controles (Kruskal-Wallis). AC: Antônio Carlos; Fp: Florianópolis.

A Figura 8 mostra o aumento significativo da frequência de PNP no grupo Exposto em comparação aos grupos controle.

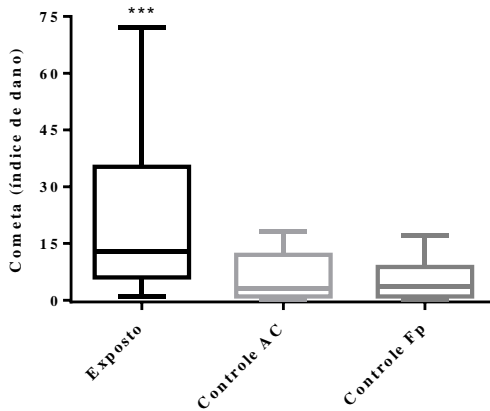
**Figura 8.** Frequência de Pontes Nucleoplasmáticas nos grupos avaliados.



As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam, respectivamente, os interquartis e valores mínimos e máximos. Grupo Exposto (n = 50); grupo Controle AC (n = 43); grupo Controle Fp (n = 28). (\*\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,0001$  em relação aos controles (Kruskal-Wallis). AC: Antônio Carlos; Fp: Florianópolis.

A Figura 9 mostra o aumento significativo do índice de dano do ensaio Cometa no grupo Exposto em comparação aos grupos controle.

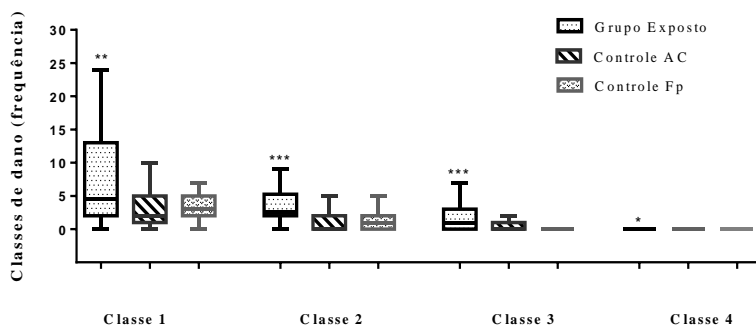
**Figura 9.** Índice total de dano de DNA obtido pelo ensaio Cometa nos grupos avaliados.



As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam, respectivamente, os interquartis e valores mínimos e máximos. Grupo Exposto ( $n = 50$ ); grupo Controle AC ( $n = 43$ ); grupo Controle Fp ( $n = 28$ ). (\*\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,0001$  em relação aos controles (Kruskal-Wallis). AC: Antônio Carlos; Fp: Florianópolis.

A Figura 10 mostra o aumento significativo na frequência das classes de dano do ensaio Cometa no grupo Exposto em comparação aos grupos controle.

**Figura 10.** Frequência das classes de dano do ensaio Cometa nos grupos avaliados.

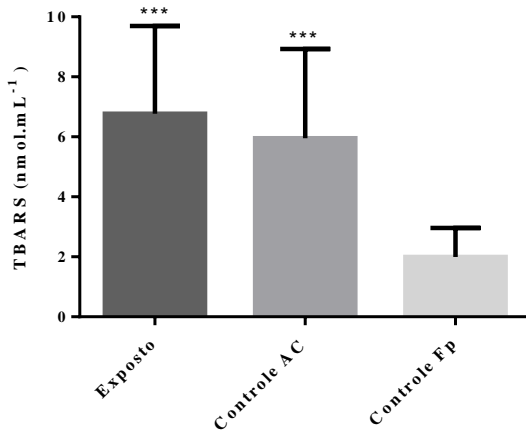


As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam, respectivamente, os interquartis e valores mínimos e máximos. Grupo Exposto (n = 50); grupo Controle Antônio Carlos (n = 43); grupo Controle Florianópolis (n = 28). (\*\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,0001$  em comparação aos controles; (\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,005$  (Kruskal-Wallis).

## 5.5 Marcadores de estresse oxidativo

A Figura 11 mostra o aumento significativo de TBARS nos grupos Exposto e Controle AC em comparação ao Controle Fp.

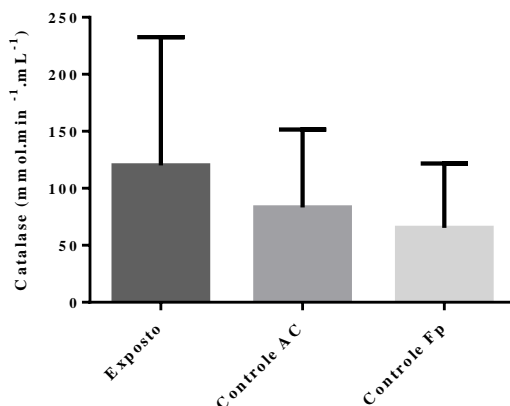
**Figura 11.** Valores de TBARS dos grupos avaliados.



O gráfico expressa média e desvio-padrão. Grupo Exposto (n = 50); grupo Controle AC (n = 46); grupo Controle Fp (n = 28). (\*\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,0001$  em relação ao Controle Fp (*one-way ANOVA*). AC: Antônio Carlos; Fp: Florianópolis.

A Figura 12 mostra a atividade da Catalase nos grupos avaliados. Apesar de aumentada no grupo Exposto, não houve diferença estatística.

**Figura 12.** Atividade da Catalase nos grupos avaliados.



O gráfico expressa média e desvio-padrão. Grupo Exposto (n = 19); grupo Controle AC (n = 13); grupo Controle Fp (n = 13). Os valores de atividade da Catalase do grupo Exposto ficaram acima dos valores dos grupos controle. Apesar disso, não houve diferença estatística (*one-way* ANOVA). AC: Antônio Carlos; Fp: Florianópolis.

## 5.6 Correlações

A Tabela 5 mostra as correlações de Spearman encontradas entre as variáveis MN, *Buds*, PNP, índice total do Cometa, TBARS, BChE, idade, número de dias da última exposição e horas mensais de uso de pesticidas.

**Tabela 5.** Correlações entre as variáveis avaliadas.

	MN	<i>Buds</i>	PNP	Cometa	TBARS	BChE	Idade	DUE	HMU
<b>MN</b>	$\rho$ 1,000	$\rho$ 0,568 **	$\rho$ 0,326 **	$\rho$ 0,438 **	$\rho$ 0,468 **	$\rho^-$ 0,190	$\rho$ 0,212 *	$\rho$ 0,245	$\rho$ 0,304
<b><i>Buds</i></b>		$\rho$ 1,000	$\rho$ 0,436	$\rho$ 0,299 **	$\rho$ 0,204 *	$\rho^-$ 0,092	$\rho^-$ 0,065	$\rho^-$ 0,193 *	$\rho$ 0,184
<b>PNP</b>			$\rho$ 1,000	$\rho$ 0,309 **	$\rho$ 0,319 **	$\rho^-$ 0,103	$\rho^-$ 0,013	$\rho^-$ 0,316 *	$\rho$ 0,103
<b>Cometa</b>				$\rho$ 1,000	$\rho$ 0,349 **	$\rho^-$ 0,274 **	$\rho$ 0,108	$\rho^-$ 0,326 *	$\rho$ 0,047
<b>TBARS</b>					$\rho$ 1,000	$\rho^-$ 0,223 **	$\rho$ 0,338 **	$\rho^-$ 0,218	$\rho$ 0,144
<b>BChE</b>						$\rho$ 1,000	$\rho^-$ 0,012	$\rho$ 0,208	$\rho^-$ 0,317
<b>Idade</b>							$\rho$ 1,000	$\rho$ 0,375 **	$\rho$ 0,217
<b>DUE</b>								$\rho$ 1,000	$\rho^-$ 0,284 **
<b>HMU</b>									$\rho$ 1,000

MN: Micronúcleos; PNP: Pontes Nucleoplasmáticas; BChE: Butirilcolinesterase; DUE: Dias da última exposição; HMU: Horas mensais de uso.  $\rho$ : coeficiente de correlação Spearman; (\*\*) a correlação é significativa no nível 0,01; (\*) a correlação é significativa no nível 0,05.

## 6 DISCUSSÃO



Os pesticidas são amplamente utilizados em todo o mundo na agricultura e pecuária para o aumento da produção de alimentos e também na saúde pública para o controle de doenças transmitidas por vetores. Grandes quantidades desses produtos químicos acabam sendo liberadas para o meio ambiente e muitos deles afetam organismos não alvos, representando um perigo potencial para a saúde humana. Alguns agrotóxicos já foram testados individualmente por métodos de ensaio de genotoxicidade *in vitro* e considerados como potencialmente mutagênicos (KAUR *et al.*, 2011). No entanto, a dose efetiva em muitos testes isolados é geralmente muito alta. Na realidade, a maioria das exposições ocupacionais e ambientais se dá como exposição às misturas de pesticidas e, portanto, a extrapolação do potencial genotóxico avaliado nem sempre é adequada para os humanos. No presente estudo, devido à aplicação de um questionário e, algumas vezes, à visita ao local de estoque dos agrotóxicos, foi possível observar o uso combinado de diferentes tipos de produtos pelos sujeitos desta pesquisa. Os agricultores entrevistados foram extremamente reservados quanto às quantidades, periodicidade de uso e duração da aplicação dos produtos. Alguns indivíduos demonstraram a desconfiança de que o grupo de pesquisa levaria suas informações aos órgãos de fiscalização, apesar dos esclarecimentos prestados pela equipe. Por estas razões, algumas informações quanto ao uso e quantidades informadas nas entrevistas podem estar subestimadas.

As exposições crônicas e agudas aos pesticidas são avaliadas pela atividade dos seus biomarcadores, que são as enzimas colinesterases. A existência de dois tipos de colinesterases já é conhecida: uma é AChE ou “colinesterase verdadeira”, que se encontra nos eritrócitos e

em terminais nervosos colinérgicos, e a outra é a BChE ou “pseudocolinesterase”, encontrada no plasma, fígado, músculo liso e células de gordura. Está bem estabelecido que a AChE é um biomarcador de efeito dos organofosforados e carbamatos. Além disso, há evidências de que a inibição da AChE se correlaciona com sintomas induzidos pela toxicidade dos pesticidas (SIMONIELLO *et al.*, 2010a). Relatórios de estudos atuais demonstram que a atividade das colinesterases em trabalhadores rurais é diminuída em relação aos sujeitos controle (SINGH *et al.*, 2011). Por isso, deve haver o monitoramento dessas enzimas em indivíduos com exposição ocupacional e, sempre que possível, a determinação dos valores basais para cada indivíduo, visto que a variabilidade individual desses parâmetros é muito alta. Além disso, pode ocorrer inibição de aproximadamente 25% das colinesterases sem que haja consequências fisiológicas significativas para o indivíduo (ATSDR, 2014). Neste estudo, tanto os valores de atividade de AChE quanto de BChE do grupo Exposto se encontraram abaixo dos valores do grupo Controle AC (Tabela 3). Porém, apenas na avaliação de BChE essa diferença foi estatisticamente significativa. O resultado de BChE está de acordo com outros estudos (HERNANDEZ *et al.*, 2005; ALI *et al.*, 2008; PÉRTILE REMOR *et al.*, 2009; ASTIZ *et al.*, 2011).

A BChE (colinesterase plasmática) se reduz de forma mais rápida e intensa do que a AChE (colinesterase eritrocitária), refletindo a exposição aguda aos agentes tóxicos. O tempo de meia-vida da BChE é de 8 dias e a sua recuperação inicia-se em 72 horas após a exposição, por isso tem pouco valor na identificação das intoxicações crônicas. (MARONI, 2000; ATSDR, 2014). Fato que ilustra essa característica é a correlação negativa encontrada neste estudo entre BChE e os índices de

dano pelo ensaio Cometa, outro marcador de exposição recente (Tabela 5). Assim, sugere-se que os agricultores tenham feito uso dos pesticidas nos dias anteriores à coleta de amostra. Os níveis de AChE, por outro lado, podem perdurar por até 100 a 120 dias, que é o tempo de vida estimado das hemácias. Dentre os resultados desta pesquisa, encontra-se a correlação negativa entre AChE e as horas de aplicação mensal de agrotóxicos pelos agricultores. A AChE é, de fato, um biomarcador mais preciso das exposições crônicas e de baixa intensidade (ATSDR, 2014). Não foram encontrados outros estudos semelhantes a este mostrando tais correlações. Apesar de haver diferenças nos valores das atividades de AChE e BChE entre os trabalhadores rurais e os controles, todos os valores encontravam-se dentro da faixa de referência. Mesmo não havendo inibição importante das enzimas, as condições clínicas dos agricultores serão avaliadas num segundo momento do projeto, em que os eles passarão por consultas médicas no HU-UFSC e realizarão exames de imagem.

Os resultados obtidos neste estudo indicam a presença de efeito genotóxico e mutagênico no grupo Exposto aos agrotóxicos quando comparados aos grupos Controle AC e Controle Fp. O efeito da exposição contínua e em baixas doses às misturas complexas de agrotóxicos está associado às quebras de fitas simples e duplas de DNA, estresse oxidativo e *crosslinks*. Os danos, quando não reparados ou reparados incorretamente, podem persistir e acumular-se, desencadeando processos mutagênicos e provocando importantes alterações citogenéticas (BENEDETTI *et al.*, 2013). Foi observado um aumento estatisticamente significativo do índice de dano ao DNA nas células submetidas ao ensaio Cometa (Figura 8). Também foi encontrada diferença estatística na

maior frequência de MN (Figura 5), *Buds* (Figura 6) e PNP (Figura 7) em células submetidas à técnica CBMN. Em artigo de revisão sobre MN e exposição a pesticidas, de 2011, Bolognesi e colaboradores reconheceram diversos pesticidas como metamidofós, monocrotofós, glifosato e endosulfan como agentes capazes de provocar danos ao DNA. A exposição a herbicidas e inseticidas como paration, malation, 2,4 D e atrazina também foi associada ao aumento de índice de dano avaliado pelo ensaio Cometa por Maroni e colaboradores, além de Garaj-Vrhovac e Zeljezic, ambos de 2000. Outro artigo que corrobora com os resultados deste trabalho é o de Benedetti e colaboradores, de 2013, que avaliaram agricultores expostos à mistura de agrotóxicos e demonstraram haver efeitos genotóxicos e mutagênicos ligados à manipulação desses produtos. Assim como esse, outros estudos associaram exposição ocupacional às misturas complexas de agrotóxicos com danos ao DNA utilizando o ensaio Cometa (MORETTI *et al.*, 2000; ÜNDEĞER; BAŞARAN, 2002; SIMONIELLO *et al.*, 2008; BHALLI *et al.*, 2009; BENEDETTI *et al.*, 2013; KHAYAT *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2014; MARTÍNEZ-VALENZUELA *et al.*, 2016) e utilizando a técnica CBMN (MARQUEZ *et al.*, 2005; TOPE *et al.*, 2006; ALI *et al.*, 2008; COSKUN *et al.*, 2011; GENTILE *et al.*, 2012; VIOLANTE *et al.*, 2012; CAYIR *et al.*, 2016). Há, porém, estudos que não encontraram tais associações com o ensaio Cometa (PIPERALKIS *et al.*, 2003 e 2006) ou com a técnica CBMN (JOKSIĆ *et al.*, 1997; VENEGAS *et al.*, 1998; LUCERO *et al.*, 2000; PASTOR *et al.*, 2002 e 2003).

Houve aumento significativo na frequência de MN para pessoas do sexo feminino, tal como relatado no trabalho de Violante e colaboradores (2012). Os outros marcadores de dano genético também foram

maiores para esse gênero, mas nesses casos não houve diferença estatística. Encontrou-se uma correlação positiva entre todos os marcadores de dano genético: Cometa, MN, *Buds*, PNP (Tabela 5). A idade dos indivíduos demonstrou ter influência no aumento de MN, verificando-se uma correlação positiva entre eles; este resultado também é corroborado por outros estudos (PASTOR *et al.*, 2003; MARQUEZ *et al.*, 2005; ALI *et al.*, 2008; FENECH *et al.*, 2011). Também foram avaliados o tempo de exposição aos pesticidas (em anos), o tempo decorrido desde a última exposição (em horas ou dias), o uso de EPI, tabagismo e consumo de álcool, mas, neste estudo, nenhum desses fatores mostrou ter influência nos marcadores de dano genético (Tabela 5). Apesar de Fenech e colaboradores (2011) questionarem quanto ao gênero, idade avançada, má nutrição e outras condições individuais acarretarem aumento da quantidade de dano ao DNA, uma grande parte dos estudos com trabalhadores rurais não observa tais correlações (JOKSIĆ *et al.*, 1997; VENEGAS *et al.*, 1998; LUCERO *et al.*, 2000; PASTOR *et al.*, 2002; TOPE *et al.*, 2006).

Os agrotóxicos têm sido reportados como genotóxicos, geradores de radicais livres que reagem com as membranas celulares e iniciam o processo de peroxidação lipídica. O acúmulo desses radicais pode causar estresse oxidativo, dependendo da capacidade antioxidante individual. Há vários estudos com produtos de lipoperoxidação e enzimas antioxidantes em animais expostos a mais de um agrotóxico, mas poucos estudos com humanos trazem relatos detalhados (ASTIZ *et al.*, 2011). O estresse oxidativo tem sido proposto como um mecanismo que liga a exposição aos agrotóxicos ao risco aumentado para o desenvolvimento de doenças como o câncer e as doenças neurodegenerativas.

Além de aumentar a produção de radicais livres, a exposição aos pesticidas também pode afetar a capacidade antioxidante e os mecanismos de defesa, além de poder aumentar a peroxidação lipídica (ABDOLLAHI *et al.*, 2004; ASTIZ *et al.*, 2011). Alguns autores sugerem que os íons metálicos que compõem a formulação de alguns pesticidas sejam responsáveis pelo estresse oxidativo, interferindo no reparo ao dano do DNA e gerando EROs. Três mecanismos predominantes na genotoxicidade dos metais foram descritos por Bayersmann e Hartwig (2008): (1) interferência na regulação oxirredução, acarretando em estresse oxidativo e dano ao DNA; (2) inibição dos sistemas de reparo, levando à instabilidade genômica e acúmulo de mutações e (3) desregulação da proliferação celular pela indução de rotas de sinalização. Evidências de que vários subgrupos químicos de pesticidas podem induzir o estresse oxidativo foram produzidas a partir de dados toxicológicos e estudos epidemiológicos.

Neste trabalho, encontrou-se uma correlação positiva entre os valores de TBARS e a frequência de MN, *Buds* e PNP, o que sugere o estresse oxidativo como sendo causador do dano ao DNA observado pela técnica CBMN (Tabela 5). Os agricultores avaliados nesta pesquisa apresentaram valores de TBARS maiores que os dos grupos Controle AC e Controle Fp, mas houve diferença estatística somente em relação ao Controle Fp (Figura 10). Além disso, a idade também mostrou correlação positiva com TBARS, tornando a interpretação do resultado incerta, pois o grupo Controle Fp é um grupo significativamente mais jovem. O TBARS é uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a oxidação dos lipídios de membrana a partir do doseamento de malondialdeído, uma das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. O MDA é formado

como um produto secundário durante a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, sendo um composto volátil e instável. Há trabalhos propondo que o dano oxidativo às proteínas seria melhor avaliado pelo ensaio da proteína carbonilada (PrC) juntamente com o TBARS. A PrC teria vantagens em relação ao TBARS devido a sua maior estabilidade. Os dois marcadores têm correlação positiva entre si e, embora haja maior estabilidade da PrC, o TBARS parece ser mais sensível (ASTIZ *et al.*, 2011). Essa seria, portanto, uma alternativa para se confirmar os resultados desta pesquisa. Murussi e colaboradores (2014) encontraram valores de TBARS significativamente diminuídos em um grupo de agricultores e também atribuíram o resultado à instabilidade do MDA. No entanto, outros estudos demonstram valores aumentados de TBARS em trabalhadores expostos à mistura de agrotóxicos (SIMONIELLO *et al.*, 2010; ARNAL *et al.*, 2011; SURAJUDEEN *et al.*, 2014).

Lukaszewicz-Hussain, em revisão publicada em 2010, demonstrou que o estresse oxidativo expresso como alterações nos parâmetros antioxidantes (por exemplo, atividade de enzimas antioxidantes) é o mecanismo principal de intoxicação aguda e subaguda a partir de pesticidas organofosforados. Os inseticidas piretroides já foram avaliados como produtos que afetam a atividade das enzimas antioxidantes e aumentam a peroxidação lipídica em ratos (RAINA *et al.*, 2009). A exposição ao neonicotinoide imidacloprida pode aumentar os níveis de peroxidação lipídica e é associada a atividades elevadas de enzimas, incluindo Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione S-Transferase (GST) (EL-GENDY *et al.*, 2010).

A atividade da Catalase, enzima antioxidante marcadora de estresse oxidativo, foi maior no grupo Exposto quando comparada aos

controles deste trabalho. Porém, a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 11). Trabalhos que avaliaram a atividade da Catalase em agricultores expostos a pesticidas apresentam resultados controversos. Há estudos que mostram uma inibição significativa da atividade da CAT (SIMONIELLO *et al.*, 2010; HERNANDEZ *et al.*, 2013; MURUSSI *et al.*, 2014). A oxidação de biomoléculas contendo grupos tiol (sulfidril – SH) pode ter grande importância na citotoxicidade induzida por pesticidas, já que esses grupos podem ser depletados pelos radicais livres na presença de estresse oxidativo. Consequentemente, enzimas que contenham esse grupo, como a Catalase, são alvos críticos do processo. Outros estudos apresentam uma atividade aumentada dessa enzima, como o de Ogut e colaboradores (2011). Inclusive, Hernandez e colaboradores (2013) sugeriram haver uma resposta adaptativa da CAT e GPx em determinados genótipos da enzima PON 1, que atua na hidrólise de certos agrotóxicos, o que explicaria as diferenças entre estudos na determinação de enzimas do estresse oxidativo. Os pesquisadores demonstraram uma diminuição de BChE associada com um incremento nos níveis de CAT em certos genótipos, resultado esse também obtido nesta pesquisa. Estudos recentes têm indicado os polimorfismos genéticos como determinantes da suscetibilidade individual aos xenobióticos, dentre eles, os agrotóxicos. Alterações genéticas nas enzimas que metabolizam os pesticidas podem ajudar a esclarecer a maior ou menor toxicidade sofrida pelos indivíduos.

Não se pode afirmar, por este estudo, que esteja havendo contaminação do grupo Controle morador de Antônio Carlos por agrotóxicos aplicados nas plantações da cidade. Os parâmetros avaliados que diferem significativamente entre os dois grupos Controles (Antônio



Carlos e Florianópolis) apresentaram correlação positiva com a idade. São eles a frequência de MN e TBARS (Tabela 5). Como as médias de idade entre os grupos são diferentes, seria necessário ampliar o número de indivíduos participantes da pesquisa buscando igualar essas médias. Somente assim, poderíamos sugerir que a elevação da frequência de MN e de TBARS no grupo Controle AC seria devido à contaminação por agrotóxicos.



Os agricultores expostos aos pesticidas apresentaram aumento significativo da frequência de MN, *Buds* e PNP quando comparados aos grupos controle. O índice de dano avaliado pelo ensaio Cometa também foi significativamente maior naqueles indivíduos. Portanto, pode-se afirmar que o grupo Exposto está sofrendo danos de exposição recente, passíveis de reparo, mas também mutações. As mutações estão sendo causadas por aneugênese, ou perda de cromossomos que é revelada pelo aparecimento dos MN, além de clastogênese, ou quebra cromossômica revelada pelas PNP, e também ampliações gênicas típicas de intoxicação celular, reveladas pelo aumento na frequência dos *Buds*. Assim, conclui-se que os indivíduos expostos aos agrotóxicos, participantes deste estudo, estão mais sujeitos a sofrer danos genéticos e, consequentemente, mais susceptíveis a doenças decorrentes desses danos.

**REFERÊNCIAS**

ABDOLLAHI, M.; KARAMI-MOHAJERI, S. A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology* 258 (2012), 309–314.

ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Dossiê Abrasco: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Fundação Osvaldo Cruz, 2015. Disponível em:

<[http://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco\\_2015\\_web.pdf](http://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf). Acesso em: 04 mai. 2016.

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 204 (1984), 234-254.

ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2012), 1-14.

ALI, T. *et al.* Cytogenetic damage in female Pakistani agricultural workers exposed to pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, June 2008, vol.49(5), 374-380.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos, 2014. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>. Acesso em: 01 mai. 2016.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios para a classificação Toxicológica, 2016. Disponível em:

<<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/vz>. Acesso em: 05 mai. 2016.

APPEL, K.E. *et al.* Risk assessment of Bundeswehr (German Federal Armed Forces) permethrin-impregnated battle dress uniforms (BDU) *Internacional Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211 (2008), 88–104.

ARNAL, N. *et al.* Clinical parameters and biomarkers of oxidative stress in agricultural workers who applied copper-based pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2011), vol.74(6), 1779-1786.

ASTIZ, M. *et al.* Ocupacional exposure characterization in professional sprayers:

Clinical utility of oxidative stress biomarkers *Environmental Toxicology and Pharmacology* (2011), vol.32(2), 249-258.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological profile for parathion*, USA, 2014.

BARBOSA, K.B.F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações, fatores modulatórios. *Revista de Nutrição* (2010), vol.23, n.4, 629-643.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 17, n.1 (2006), 113-123.

BENEDETTI, D. *et al.* Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assay. *Mutation Research* 752 (2013) 28-33.

BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, (2008), vol. 82(8), 493-512.

BHALLI, J. *et al.* DNA Damage in Pakistani Agricultural Workers Exposed to Mixture of Pesticides. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, 2009 Jan, vol.50(1), 37-45.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods in Enzymology* (1984), v. 90, 105-110.

BLAIR, A., FREEMAN, L.B. Epidemiologic studies of cancer in agricultural populations: observations and future directions. *Journal of Agromedicine* (2009), 14:125–131.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research* 543 (2003), 251–272.

BOLOGNESI, C. *et al.* Review: Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* (2011), vol. 26 no. 1, 19–26.

BONASSI, S. *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* (2006), vol. 28(3), 625-631.

BONASSI, S. *et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* (2011), vol. 26 no. 1, 93–100.

BRASIL. Casa Civil, 2000. Lei nº 9974 de 6 de junho de 2000. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L9974.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9974.htm)>. Acesso em: 29 mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. *Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BURMA, S.; CHEN, B.P.C.; CHEN, D.J. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 2006. Vol. 5, n. 9-10, p. 1042-8.

CAYIR, A.; COSKUN, M., COSKUN, M. Genotoxic potential of pesticides; frequencies of micronuclei (MNis), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear Buds (NBuds) in individuals exposed to pesticides in Canakkale, Turkey. *Toxicology Letters*, 16 Sep 2016, vol.258, pp.228-S229.

CALDAS, Luiz Q.A. (Coord.). Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides. *Centro de Controle de Intoxicações de Niterói – RJ*, 2000.

CIT- *Centro de Informações Toxicológicas*. Herbicidas à base de glifosato. Disponível em: [http://www.cit.sc.gov.br/site/?page\\_id=1499](http://www.cit.sc.gov.br/site/?page_id=1499). Acesso em 18 jan. 2017.

COSKUN, M. Frequencies of micronuclei (MNi), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear Buds (NBuds) in farmers exposed to pesticides

in Çanakkale, Turkey. *Environment International* (2011), vol.37(1), 93-96.

COSTA, C. *et al.* Is organic farming safer to farmer's health? A comparison between organic and traditional farming. *Toxicology Letters*, 15 Oct 2014, vol. 230(2), 166-176.

DA SILVA, F. *et al.* Genotoxic assessment in tobacco farmers at different crop times. *Science of the Total Environment*, Aug 2014, vol. 490, 334-341.

DE JONG, K. *et al.* Association of Occupational Pesticide Exposure with Accelerated Longitudinal Decline in Lung Function. *American Journal of Epidemiology* (2014) 179 (11): 1323-1330.

DEFARGE, N. *et al.* Co-Formulants in Glyphosate-Based Herbicides Disrupt Aromatase Activity in Human Cells below Toxic Levels. *International Journal of Environmental Research and Public Health* (2016), 13(3), 264.

DING, G. *et al.* Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. *Environmental Science and Technology*, 46 (2012), 13480–13487.

DING, G.; BAO, Y. Revisiting pesticide exposure and children's health: Focus on China. *Science of the Total Environment* (2014), vol.472, 289-295.

DYK, J.S.V.; PLETSCHE, B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere* 82 (2011), 291–307.

EDLESTON, M. Pesticides. *Medicine* (2016), vol.44, 193-196.

EL-GENDY, K.S. *et al.* The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food Chem Toxicol* (2010); 48(1), 215-21.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. *Nature* 408 (2000), 239-247.



FEIJÓ, Ana Júlia Lobo. *Estudo de população ocupacionalmente exposta a agrotóxicos, no município de Antônio Carlos, Santa Catarina*. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2016, p. 41.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* (1985), v. 147, n. 1-2, 29-36.

FENECH, M. *et al.* The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research* (1999), 271-283.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discovery Today* 22 (2002), 1128-1137.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* (2007), 1084-1104.

FENECH, M. *et al.* The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis* vol. 26 n. 1 (2011), 239-245.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. 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 (2000) 179-285.

GENTILE, N. *et al.* Micronucleus assay as a biomarker of genotoxicity in the occupational exposure to agrochemicals in rural workers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (2012), vol.88(6), 816-822.

GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Review: Pesticides and cancer: insights into toxicoproteomic-based findings. *Journal of Proteomics* (2011), 74, 2713-2722.

GOLDMAN, S.M. *et al.*, Genetic modification of the association of paraquat and Parkinson's disease. *Movement Disorders*, Nov. 2012, vol.27(13), 1652-1658.

GUANGGANG. X. *et al.* Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. *Food and Chemical Toxicology*, Mar. 2013, vol.53, 352-358.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and diseases. *Biochemical Journal*, 1984, 219(1), 1-14.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radical in Biology and Medicine*. Ed. 4. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* (2004); 142(2): 231-55.

HERNANDEZ, A.F. *et al.* Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicology Letters* (2005), vol.159(1), 13-21.

HERNANDEZ, A.F. *et al.* Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene-environment interaction perspective. *Toxicology*, 10 May 2013, vol.307, 95-102.

HIGDON, A. *et al.* Cell signaling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochemical Journal* v. 442 n. 3 (2012), 453-464.

HUDSON, N. *et al.* Characteristics and magnitude of acute pesticide-related illnesses and injuries associated with pyrethrin and pyrethroid exposures – 11 states, 2000–2008. *American Journal of Industrial Medicine*, 57 (2014), 15–30.

IARC/WHO (2015) LOOMIS, D. *et al.* Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Lancet Oncology* (2015); 16(8): 891-892.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento\\_do\\_inca\\_sobre\\_os\\_agrotoxicos\\_06\\_abr\\_15.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf)>. Acesso em: 30 jun. 2015.

JOKSIĆ, G.; VIDA KOVIĆ, A.; SPASOJEVIĆ-TIŠMA, V. Cytogenetic Monitoring of Pesticide Sprayers. *Environmental Research*, Nov. 1997, vol.75(2), 113-118.

KANEKO, H. Pyrethroids: Mammalian Metabolism and Toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2011), 59, 2786–2791.

KARAMI-MOHAJERI, S., ABDOLLAHI, M. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human and Experimental Toxicology* (2011), vol. 30, n. 9, 1119-1140.

KAUR, R., KAUR, S., LATA, M. Evaluation of DNA damage in agricultural workers exposed to pesticides using single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Indian Journal of Human Genetics* (2011), vol. 17, 179-187.

KHAYAT, C.B. *et al.* Assessment of DNA damage in Brazilian workers occupationally exposed to pesticides: a study from Central Brazil. (Report) *Environmental Science and Pollution Research*, Oct, 2013, vol.20(10), 7334-7340.

KOUREAS, M.; TSAKALOF, A.; TSATSAKIS, A.; HADJICHRISTODOULOU, C. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicology Letters*, 210 (2012), 155–168.

KOZAK, J. *et al.* Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis thaliana* is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance. *DNA Repair* 8 (2009), 413–419.

KWIECIEN, S. *et al.* The role of oxygen reactive species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosa lesions. *Journal of Physiology and Pharmacology* 53 (2002), 761-73.

LUCERO, L. *et al.* Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (2000), vol.464(2), 255-262.

LUKASZEWICZ-HUSSAIN, A. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity-short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology* (2010); 98(2), 145-50.

MARIN, M.T. *et al.* Toxicogenomic Study of Triazole Fungicides and Perfluoroalkyl Acids in Rat Livers Predicts Toxicity and Categorizes Chemicals Based on Mechanisms of Toxicity. *Toxicological Sciences* 2007, vol. 97(2), 595-613.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* v. 424 n. 1-2 (1999), 83-95.

MARONI, M. *et al.* Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. *Toxicology* (2000), vol.143(1), 1-2.

MARQUEZ, C. *et al.* Cytogenetic damage in female Chilean agricultural workers exposed to mixtures of pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (2005), vol.45(1), 1-7.

MARTÍNEZ-VALENZUELA, C. *et al.* Comet assay results of pilots exposed to pesticides. *Toxicology Letters*, 10 Oct 2016, vol.259, S220-S220.

MARTINS, T. *Herbicide paraquat: concepts, mode of action and related diseases.* Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, (2013), v. 34, n. 2, 175-186.

MORETTI, M. *et al.* Pesticide-induced primary DNA damage in peripheral blood leukocytes of farm workers evaluated by the computerized “comet” assay. *Biomarkers* (2000), vol.5(3), 192-204.

MUÑOZ-QUEZADA, M.T. *et al.* Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: A systematic review. *NeuroToxicology* 39 (2013), 158–168.

MUÑOZ-QUEZADA, M.T. *et al.* Predictor of exposure to organophosphate pesticides in schoolchildren in the Province of Talca, Chile. *Environmental Internacional* (2012), 47:28–36.

MURUSSI, C. *et al.* Changes in oxidative markers, endogenous antioxidants and activity of the enzyme acetylcholinesterase in farmers exposed to agricultural pesticides – a pilot study. *Ciência Rural*, Jul 2014, v. 44, n.7, 1186-1193.

MYERS, J.P. *et al.* Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Journal of Environmental Health* (2016), v. 15, 15-19.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A silver staining method for single-cell gel assay. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* [0022-1554] (2001) vol:49 iss:9 pg:1183 -1186.

NAEHER, L. *et al.* Organophosphorus and pyrethroid insecticide urinary metabolite concentrations in young children living in a southeastern United State city. *Science of Total Environment* (2010), 408: 1145–53.

NAKABEPPU, Y. Review: Cellular levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 7 (2014), 12543-12557.

OGUT, S. *et al.* Oxidative stress in blood of farm workers following intensive pesticide exposure. *Toxicology and Industrial Health* (2011), 27(9), 820-825.

OJHA, A. *et al.* Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and in mixture, in rat tissues. *Environmental Toxicology*, Oct 2013, vol.28(10), 543-552.

PASTOR, S. *et al.* A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* (2002), vol.17(1), 79-82.

PASTOR, S. *et al.* Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* (2003), vol.18(3), 249-258.

PIPERALKIS, S.M. *et al.* Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2003. vol.41(2), 104-110.

PIPERALKIS, S.M. *et al.* Measuring the effects of pesticides on occupationally exposed humans with the comet assay. *Environmental toxicology* (2006), vol:21, 355 -359.

PÉRTILE REMOIR, A. *et al.* Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environment International* (2009), vol. 35(2), 273-278.

RAINA, R. *et al.* Induction of oxidative stress and lipis peroxidation in rats chronically exposed to cypermethrin through dermal application. *Journal of Veterinary Science* (2009), vol. 10(30), 257-259.

SAILLENFAIT, A.M.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J.P. Pyrethroids: Exposure and health effects – An update. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 218 (2015), 281–292.

SAMS, C.; JONES, K. Human volunteer studies investigating the potential for toxicokinetic interactions between the pesticide deltamethrin; pirimicarb and chlorpyrifos-methyl following oral exposure at the acceptable daily intake. *Toxicology Letters*, 200 (2011), 41–45.

SAMS, C.; JONES, K. Biological monitoring for exposure of deltamethrin: a human oral dosing study and background levels in the UK general population. *Toxicology Letters*, 213 (2012), 35–38.

SANTA CATARINA- Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. *Proposta de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos em Santa Catarina*. Florianópolis, 2013.

SANTA CATARINA – Portal do Município de Antônio Carlos. Disponível em:<

<http://www.antoniocarlos.sc.gov.br/cms/diretorio/index/codMapaItem/43364>> Acesso em: 29 dez. 2016.

SAXENA, A.K. *et al.* Modelling inhibition of avian aromatase by azole pesticides. *Environmental Research*, 2015 Sep 2; 26(7-9): 757–782.

SIMONIELLO, M.F. *et al.* DNA damage in workers occupacionally exposed to pesticide mixtures. *Journal of Applied Toxicology*, November 2008, vol.28(8), 957-965.

SIMONIELLO, M.F. *et al.* Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population. *Biomarkers* (2010a); 15(1): 52–60.

SIMONIELLO, M.F. *et al.* Biochemical evaluation of rural workers exposed to pesticides. *Medicine* (2010) v. 70, 489-498.

SINDVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal: Balanço, 2015. Disponível em:

<<http://www.sindiveg.org.br/docs/balanco-2015.pdf>> Acesso em: 02 jan. 2017.

SINGH, N.P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* (1988), v. 175, p. 184-91.

SINGH, S. *et al.* DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2011, vol.31(2), pp.278-285.

STARKS, S.E. *et al.* Peripheral Nervous System Function and Organophosphate Pesticide Use among Licensed Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives* (2012), 120(4): 515–520.

SUITER, D.R.; SCHARF, M.E. *Insecticide basics for the pest management professional*. Cooperative Extension, the University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences, bulletin. 1352; 1-28, (2012).

SURAJUDEEN, Y. *et al.* Oxidative stress indices in Nigerian pesticide applicators and farmers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *International Journal of Applied and Basic Medical Research* (2014), vol.4(3), p.37-40.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* (2000), v. 35, n. 3, 206-21.

TOPE, A.; BEBE, F.N.; PANEMANGALORE, M. Micronuclei frequency in lymphocytes and antioxidants in the blood of traditional limited-resource farm workers exposed to pesticides. *Journal of Environmental Science and Health. Part B: Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes* (2006), vol.41(6), 843-853.

ÜNDEĞER, Ü.; BAŞARAN, N. Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline Comet assay. *Archives of Toxicology*, 2002, vol.76(7), 430-436.

VENEGAS, W. *et al.* Micronuclei analysis in lymphocytes of pesticide sprayers from Concepción, Chile. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* (1998), vol.18(3), 123-129.

VIOLANTE, E.Z. *et al.* Genetic damage and exposure to pesticides among agricultural workers from Valle de San Quintín, Baja California, México. *Revista de Salud Ambiental*, 01 December 2012, vol.12(2), 93-101.

WHOPES/WHO (2010) Pesticides Evaluation Scheme. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/pesticides/en/>>. Acesso em 01 mai. 2016.

WIGLE, D.T.; TURNER, M.C.; KREWSKI, D. A systematic review and meta-analysis of childhood leukemia and parental occupational pesticide exposure. *Environmental Health Perspectives* 117 (2009), 1505–1513.



## ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Patologia

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

#### I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

---

1. Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Telefone \_\_\_\_\_

2. Nome \_\_\_\_\_ da  
mãe: \_\_\_\_\_

3. Sexo: ( ) M ( ) F Data de Nascimento:...../...../.....

---

#### II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **Título do Protocolo de Pesquisa:** Estudo de população exposta ocupacionalmente a agrotóxicos

2. **Pesquisador Principal:** Claudia Regina dos Santos **Cargo/Função:** Professor Adjunto IV

**Departamento da UFSC:** Departamento de Patologia

---

#### III – EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

1. Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos dos agrotóxicos na sua saúde. Esclarecemos ainda que somente serão analisados os pontos descritos, não sendo, portanto realizados outros exames.

2. Aceitando participar deste estudo, você responderá um questionário que tem por objetivo conhecer um pouco de seus hábitos, seu estado de saúde e seu histórico relacionado ao trabalho. Você será encaminhado ao Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina onde será avaliado por um endocrinolo-

gista e neurologista e as informações contidas no seu prontuário poderão consultadas no decorrer da pesquisa.

3. Serão realizadas, dependendo da necessidade exames por imagem (ultrasonografias) E ainda, será coletada de sua pessoa uma amostra de sangue (20 mL), ou por ventura uma segunda amostra se for necessária nova avaliação. No seu sangue serão avaliados parâmetros relacionados à função endocrinológica, hematológica, reumatológica, e indicadores de exposição, efeito e genotoxicidade.

4. A coleta será realizada por profissional qualificado, utilizando material descartável, seguindo os procedimentos de assepsia adequados, garantindo assim a sua integridade física.

5. Todas as análises serão realizadas, de modo a não representar nenhum custo financeiro, para você.

6. Você terá acesso a todos os resultados e caso necessite o encaminhamento para acompanhamento.

---

#### **IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA**

1. Você tem assegurado o direito de a qualquer momento do estudo solicitar informações esclarecedoras sobre o andamento dos procedimentos, bem como dos eventuais riscos e benefícios relacionados a sua participação neste estudo, através dos telefones **(48) 37215069/91486213** (pesquisador), **37219206** (Comitê de Ética em Pesquisa) ou e-mail [claudia.santos@ufsc.br](mailto:claudia.santos@ufsc.br).

2. Fica assegurado também que no caso de eventual intercorrência no momento da coleta, o Sr. receberá tratamento adequado e será monitorado até que sua condição de saúde se restabeleça. (Não são esperados problemas deste tipo, no entanto é importante garantir assistência no caso de qualquer intercorrência relacionada ao projeto).

3. Os pesquisadores declaram que cumprirão as exigências contidas na Resolução CNS 466/2012 e que o sigilo dos participantes será garantido durante todas as etapas da pesquisa, inclusive na divulgação dos resultados. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar sua identidade, entretanto estarão disponíveis para consulta pela equipe envolvida no projeto, e pelo Comitê de Ética.

---

**V – CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO**

Concordo em participar do presente Protocolo de Pesquisa bem como com a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o sigilo de minha identificação, conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. A minha participação é voluntária podendo ser suspensa a qualquer momento. Pelo presente consentimento, declaro que fui esclarecido sobre a pesquisa a ser realizada, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação, e que recebi uma cópia deste termo, assinada pelos pesquisadores.

Florianópolis, ..... de ..... de 201...

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante  
- Pesquisador Principal

Claudia Regina dos Santos

(48)37215069 / 91486213

Email: claudia.santos@ufsc.br



## ANEXO B - Questionário

### UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

#### AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGROTÓXICOS

1. Questionário número: _ _ _
2. Data: _ _ / _ _ / _ _
3. Localidade:
<b>DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS – PARTE I</b>
4. Nome do entrevistado:
5. Data de nascimento: _ _ / _ _ / _ _
6. Idade: _ _ anos completos
7. Local de nascimento: cidade _____ esta- do _ _
<b>EXPOSIÇÃO A AGENTES QUÍMICOS (Assinale quando SIM)</b>
8. O que você plan- ta? _____
9. Quanto você produz anualmen- te? _____
10. Qual o período da(s) sa- fra(s)? _____ _____ _____
11. Quando você faz a aplicação de agrotóxicos durante a sa- fra? _____

12. Quantas horas duram as aplicações? \_\_\_\_\_

13. Em qual turno você normalmente aplica? ( ) matutino ( ) vespertino

14. Quais agrotóxicos você utiliza atualmente?-

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

15. Você se lembra qual agrotóxicos você mais usava a 20 anos atrás? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

16. Como você compra os agrotóxicos? ( ) Com receita ( ) Sem receita

17. Você lê as bulas antes de utilizar o produto? ( ) Sim ( ) Não

18. Quantas vezes por semana você utiliza ( ) Uma ( ) Pelo menos duas ( ) 3 ou mais

19. O que você faz com o agrotóxico? ( ) Prepara a calda ( ) aplica o produto

20. Como você faz a aplicação? ( ) Pulverizador costal ( ) Máquina

21. Quando foi a sua última exposição? \_\_\_\_\_ horas ou \_\_\_\_\_ dias

22. Qual(is) foi(RAM) o agrotóxico(s) utilizado(s)?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

23. Você utiliza algum EPI? ( ) Sim ( ) Não

24. Qual EPI você utiliza? ( ) Máscaras ( ) Luvas ( ) Botas ( ) Roupas de

manga comprida

25. Após o manuseio do agrotóxico você: ( ) continua normalmente suas atividades ( ) Lava as mãos antes de continuar suas atividades ( ) Toma banho antes de continuar suas atividades

26. Ao aplicar os agrotóxicos molha a roupa: ( ) Todos os dias ( ) Às vezes

**HISTÓRIA OCUPACIONAL (escrever no verso se necessário)**

27. Quantos anos você tinha quando começou a trabalhar? \_\_\_ \_\_ anos

28. Que trabalhos executou desde então? Por quanto tempo?

FUNÇÃO/ATIVIDADE                  EMPRESA OU LOCALIDADE, MUNICÍPIO  
PERÍODO

a.

\_\_\_\_\_

b.

\_\_\_\_\_

c.

\_\_\_\_\_

d.

\_\_\_\_\_

**Conferir se o tempo de trabalho referido nas perguntas acima corresponde ao tempo de trabalho de toda história Ocupacional. Se não, completar.**

**HISTÓRIA CLÍNICA**

29. Quantas intoxicações por agrotóxicos você já teve ao longo da vida?

\_\_\_\_\_

30. Queixa atual:

31. História Progressiva da moléstia atual: (início, duração, característica do sintoma no início, evolução, relação com outras queixas, situação atual).
32. Você tem filhos? ( ) sim ( ) não
33. Você teve alguma complicação na gravidez? ( ) sim ( ) não Qual? _____
34. Já teve algum aborto espontâneo? ( ) sim ( ) não Quantos?
<b>EXAME FÍSICO</b>
35. Estado Geral: ( ) bom ( ) regular ( ) ruim
36. Peso:
37. Altura:
38. Frequência Respiratória:
39. Pressão Arterial:
40. Pulso:
<b>INTERROGATÓRIO SOBRE DIFERENTES PATOLOGIAS</b>
<b>DIABETES</b>
41. Você tem diabetes ( ) sim ( ) Não Há quanto tempo? _____ anos
42. Alguém da sua família tem diabetes ( ) sim ( ) Não
50. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos
<b>HIPOTIREODISMO</b>
51. Você tem hipotireoidismo ( ) sim ( ) Não Há quanto tempo? _____ anos
52. Alguém da sua família tem hipotireodismo ( ) sim ( ) Não
53. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos



**AUDIÇÃO**

54. **Você tem algum problema de audição?** ( ) sim ( ) Não Há quanto tempo?\_\_\_\_anos

55. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não

56. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo?\_\_\_\_anos

57. **Você apresenta alguma dificuldade para entender a fala quando há várias pessoas falando ao mesmo tempo, ou quando há ruído competitivo?**  
( ) sim ( ) Não Há quanto tempo?\_\_\_\_anos

58. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não

59. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo?\_\_\_\_anos

60. **Você tem zumbido?** ( ) sim ( ) Não Há quanto tempo?\_\_\_\_anos

61. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não

62. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo?\_\_\_\_anos

63. **Você tem tontura?** ( ) sim ( ) Não Há quanto tempo?\_\_\_\_anos

64. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não

65. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo?\_\_\_\_anos

66. **As pessoas da sua família reclamam que você não escuta bem?**

67. ( ) sim ( ) Não Há quanto tempo?\_\_\_\_anos

68. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não

69. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo?\_\_\_\_anos

70. **Você tem ou teve exposto ao ruído?**

( ) sim ( ) Não Por quanto tempo?\_\_\_\_anos

Há quanto tempo?\_\_\_\_anos

**EPILEPSIA**

71. **Você tem ou teve crises (ataques, acesso, convulsão) na qual perde a consciência e cai subitamente?** ( ) sim ( ) Não Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos
72. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não
73. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos
74. **Você tem ou teve crises em que perde o contato com a realidade (meio) e fica como se estivesse fora do ar ?** ( ) sim ( ) Não Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos
75. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não
76. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos
77. **Você tem ou teve crises na qual tem repuxões incontroláveis em braços, pernas, na boca ou vira a cabeça para o lado?**  
( ) sim ( ) Não Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos
78. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não
79. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos
80. **Você tem ou teve crises de desmaio e que ao acordar nota que fez xixi ou cocô na roupa sem perceber?** ( ) sim ( ) Não Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos
81. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não
82. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos
83. **Você tem ou teve crises na qual sente sensação ruim de “fundeza” ou bola na “boca do estômago” e que sobe até a garganta e em seguida sai fora do ar, e depois dizem que você ficou mexendo em algo com as mãos ou mastigando ou olhando para algo distante?** ( ) sim ( ) Não Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos
84. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não

85. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos

86. **Algum médico ou profissional de saúde ou mesmo familiares já lhe disse que você tem ou teve convulsão febril na infância; ou durante alguma doença grave qualquer?** ( ) sim ( ) Não Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos

87. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não

88. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos

89. **Você tem rápidos abalos tipo “choque” nos braços (as coisas caem da mão) ou pernas com ou sem queda, principalmente pela manhã?**

( ) sim ( ) Não Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos

90. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não

91. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos

92. **Há alguém desta casa com epilepsia?**

( ) sim ( ) Não Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos

93. Alguém da sua família tem ou teve ( ) sim ( ) Não

94. Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos

#### **DEPRESSÃO E ANSIEDADE**

Marque com um 'X' a resposta que melhor corresponder com o que o paciente refere sentir na ÚLTIMA SEMANA. Não é preciso ficar pensando muito em cada questão. Neste questionário as respostas espontâneas têm mais valor *do* que aquelas em que se pensa muito.

Marque apenas uma resposta para cada pergunta.

95. **Quando você se sente tenso ou contraído**

3 ( ) A maior parte do tempo

2 ( ) Boa parte do tempo

1 ( ) De vez em quando

0 ( ) Nunca

**96. Você sente gosto pelas mesmas coisas de antes?**

0 ( ) Sim, do mesmo jeito que antes

1 ( ) Não tanto quanto antes

2 ( ) Só um pouco

3 ( ) Já não sinto mais prazer em nada

**97. Você sente uma espécie de medo, como se alguma coisa ruim pudesse acontecer?**

3 ( ) Sim, e de um jeito muito forte

2 ( ) Sim, mas não tão forte

1 ( ) Um pouco. mas isso não me preocupa

0 ( ) Não sinto nada disso

**98. Você da risada e se diverte quando vê coisas engraçadas?**

0 ( ) Do mesmo jeito que antes

1 ( ) Atualmente um pouco menos

2 ( ) Atualmente bem menos

3 ( ) Não consigo mais

**99. Você está com a cabeça cheia de preocupações?**

3 ( ) A maior parte de tempo

2 ( ) Boa parte do tempo

1 ( ) De vez em quando

0 ( ) Raramente

**100. Você se sente alegre?**

3 ( ) Nunca

2 ( ) Poucas vezes

1 ( ) Muitas vezes

0 ( ) A maior parte do tempo

**101. Você consegue ficar sentado à vontade e se sentir relaxado?**

0 ( ) Sim, quase sempre

1 ( ) Muitas vezes

2 ( ) Poucas vezes

3 ( ) Nunca

**102. Você sente que está lento para pensar e fazer as coisas?**

3 ( ) Quase sempre

2 ( ) Muitas vezes

1 ( ) De vez em quando

0 ( ) Nunca

**103. Você tem uma sensação ruim de medo, como um frio na barriga ou um aperto no estômago?**

0 ( ) Nunca

1 ( ) De vez em quando

2 ( ) Muitas vezes

3 ( ) Quase sempre

**104. Você perdeu o interesse em cuidar da sua aparência?**

3 ( ) Completamente

2 ( ) Não estou mais me cuidando como deveria

1 ( ) Talvez não tanto quanto antes

0 ( ) Me cuido do mesmo [eito que antes

**105. Você se sente inquieto, como se não pudesse ficar parado em lugar nenhum?**

3 ( ) Sim, demais

2 ( ) Bastante

1 ( ) Um pouco

0 ( ) Não me sinto assim

**106. Você fica esperando animado as coisas boas que estão por vir?**

0 ( ) Do mesmo jeito que antes

1 ( ) Um pouco menos do que antes

2 ( ) Bem menos do que antes

3 ( ) Quase nunca

**107. De repente, você tem a sensação de entrar em pânico?**

3 ( ) A quase todo momento

2 ( ) Várias vezes

1 ( ) De vez em quando

0 ( ) Não sinto isso

**108. Você consegue sentir prazer quando assiste a um bom programa de televisão, de rádio ou quando leio alguma coisa?**

0 ( ) Quase sempre

1 ( ) Várias vezes

2 ( ) Poucas vezes

3 ( ) Quase nunca

**CONSUMO DE TABACO**

109. Você já fumou?: ( ) sim, ainda fuma ( ) não/nunca ( ) sim, mas parou há \_\_anos

110. Há quantos anos você fuma ou durante quantos anos você fumou?

Há \_\_ anos OU há \_\_ meses OU durante \_\_ anos

111. O que você fuma ou fumou MAIS?

( ) cigarro comercial ( ) cigarro de palha ( ) charuto ( ) cachimbo ( ) outro: \_\_\_\_\_

112. Quantos CIGARROS em média você fuma ou fumava por dia ou por semana? cigarros/dia OU cigarros/semana
113. Se já parou de fumar, por que você parou? _____
<b>CONSUMO DE BEBIDA ALCOÓLICA</b>
114. Qual bebida você mais gosta de beber? _____
115. Com que idade você começou a beber?      _ _ anos
116. Qual bebida você costuma(va) beber mais frequentemente? ( ) cerveja ( ) cachaça ( ) outra: _____
117. Quantas doses você costuma(va) beber por semana? Um drinque ou uma dose é: uma cerveja longneck ou latinha; meia cerveja grande (600 ml) ou chopp (350 mL); uma dose de pinga, uísque ou outro destilado (50ml) ou uma taça de vinho (150ml). Cerveja ou chopp: __ __ Cachaça ou uísque __ __ Vinho: __ __ Anotar frequência por mês, se for necessário: _____
118. Se parou de beber, por que você parou? _____
<b>CONSUMO DE ALIMENTOS E ÁGUA</b>
119. Você se alimenta de: ( ) Carnes e verduras    ( ) Não come carne    ( ) Mais de uma porção de carne vermelha todos os dias
120. Qual a sua fonte de alimentos (carnes e verduras) ( ) Produção própria    ( ) compra dos vizinhos    ( ) supermercado
121. Qual a sua fonte de água? ( ) Córrego próximo a casa    ( ) Fonte de água natural    ( ) Água encanada    ( ) Poço artesiano
122. Onde são descartados os resíduos de seu banheiro? ( ) Há saneamento básico    ( ) Diretamente no córrego
123. Você toma chimarrão?

<input type="checkbox"/> Todos os dias <input type="checkbox"/> Algumas vezes por semana	
<b>MEDICAMENTOS</b>	
124. Você costuma tomar algum remédio por conta própria? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
125. Quais? _____ _____	
126. Com que frequência? <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> De vez em quando	
127. Você toma algum medicamento prescrito pelo seu médico? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
128. Quais? _____ _____	
129. Com que frequência? <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> De vez em quando	
<b>DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS – PARTE II</b>	
130. Cor: <input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Pardo <input type="checkbox"/> Outra: _____	
131. Estado civil atual: <input type="checkbox"/> solteiro <input type="checkbox"/> casado <input type="checkbox"/> com companheira <input type="checkbox"/> viúvo <input type="checkbox"/> separado/divorciado/desquitado	
132. Até que ano (série) você estudou na escola? Completei o (a) _____ ano (série) do _____ na escola.	
133. Qual sua religião? <input type="checkbox"/> sem religião <input type="checkbox"/> Católica <input type="checkbox"/> protestante/crente/evangélico <input type="checkbox"/> espírita <input type="checkbox"/> outra _____	
134. Quais e quantos deste itens você possui em sua casa?	
_____	
_____	Não
Televisão em cores	
Video cassete ou DVD	



Rádio		
Banheiro		
Automóvel		
Máquina de lavar		
Geladeira		
Freezer (independente ou parte da geladeira duplex)		
Trator		