

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CÂMPUS DOIS VIZINHOS

ANA FLAVIA MARCELINO

**ANÁLISE DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO USO DE PESTICIDAS
POR AGRICULTORES DO SUDOESTE DO PARANÁ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS

2016

ANA FLAVIA MARCELINO

**ANÁLISE DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO USO DE PESTICIDAS
POR AGRICULTORES DO SUDOESTE DO PARANÁ**

Trabalho de Conclusão do Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial para obtenção do título de bióloga.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nédia de Castilhos Ghisi.

Coorientadora: Cátia Cappeli Wachtel Dalla Cort.

M314a Marcelino, Ana Flavia.
Análise do potencial genotóxico do uso de pesticidas por agricultores do sudoeste do Paraná. / Ana Flavia Marcelino – Dois Vizinhos: [s.n], 2016.
58f.:il.

Orientadora: Nédia de Castilhos Ghisi
Co-orient: Cátia Cappeli Wachtel Dalla Cort.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de
Ciências Biológicas. Dois Vizinhos, 2016.
Bibliografia p.33-38

1.Carcinógenos. 2.Teste de micronúcleo. 3.Ensaio do cometa. I.Ghisi, Nédia de Castilhos, orient. II.Cort, Cátia Cappeli Wachtel Dall, co-orient. III.Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos.
IV.Título

CDD:570

Ficha catalográfica elaborada por Keli Rodrigues do Amaral CRB: 9/1559

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



TERMO DE APROVAÇÃO

Título do Trabalho de Conclusão de Curso n.º. 32

Análise do potencial genotóxico do uso de pesticidas por agricultores do sudoeste do Paraná

por

Ana Flavia Marcelino

Este trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às **15 horas** do dia **09 de dezembro de 2016**, como requisito parcial para obtenção do título de Biólogo (Curso de Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos). O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho **APROVADO.**

(aprovado, aprovado com restrições, ou reprovado)

Prof. Dr. Fernando Carlos de Sousa
UTFPR-Dois Vizinhos

Profa. Dra. Nedea de Castilhos Ghisi
Orientador
UTFPR-Dois Vizinhos

Profa. Dra. Juliana Morini Kupper
Cardoso Perseguini
UTFPR-Dois Vizinhos

Prof. Dr. Elton Celton de Oliveira
Coordenador do Curso de Ciências
Biológicas
UTFPR-Dois Vizinhos

“O termo de aprovação assinado se encontra na Coordenação do Curso.”

AGRADECIMENTOS

Através destas palavras, gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que contribuíram para minha vitória.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por não me deixar faltar fé para lutar todos os dias. Ao meu pai Rogério, pelas lições de vida, incentivo em todos os momentos e pela determinação que me ensinou a ter. A minha mãe Rozemari, por todos os telefonemas, mensagens, abraços e preocupações durante esses quatro anos. A minha irmã Natália, pelas palavras de carinho. Ao meu namorado Darlei, por não medir esforços para que esse dia chegasse, pelo amor e companheirismo incondicional.

A todos aqueles que me ajudaram na realização deste trabalho, incluindo meus pais, meu sogro Darci, minha sogra Claudete junto com o Darlei, bem como a enfermeira Maristela, e todos os voluntários que participaram da pesquisa. Sem eles nada disso seria possível.

A minha orientadora Nédia, que desde o primeiro momento me recebeu como sua orientanda de forma excepcional, sempre apoiando e corrigindo da melhor maneira possível, me conduzindo a passos importantes para o sucesso na carreira acadêmica.

As amigas da faculdade, que estiveram presentes durante esses quatro anos, compartilhando das angústias, sofrimentos, alegrias, momentos em que amizades verdadeiras foram construídas.

Por fim, a todos que estiveram presentes em algum momento de minha vida ao longo desses quatro anos, que contribuíram com uma palavra, um gesto de incentivo, uma carona para casa. Também a Daiane e a Dauana, que me acolheram em sua casa no primeiro ano de graduação.

RESUMO

MARCELINO, Ana Flavia. **Análise do potencial genotóxico do uso de pesticidas por agricultores do sudoeste do Paraná.** 2016. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso 2 (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

No Brasil, assim como em outros países, a agricultura evoluiu com o passar dos anos, devido a necessidade de aumento na produção de alimentos no mundo. Com os avanços da agricultura, após a chamada “Revolução Verde”, os produtores agrícolas precisaram modernizar suas práticas, através da mecanização das terras e principalmente com o uso de pesticidas orgânicos. A diversidade de produtos químicos destinados ao controle de pragas na agricultura é enorme, e os agricultores fazem uso destes constantemente. O problema é que muitas vezes, diferentes produtos são usados ao mesmo tempo, a pulverização é feita sem Equipamentos de Proteção Individual (EPI), e os agricultores acabam se expondo de forma ocupacional a essas substâncias. O presente trabalho buscou verificar a ocorrência de danos genéticos em agricultores expostos ocupacionalmente aos agroquímicos em comparação com pessoas de outras profissões que não utilizavam substâncias tóxicas (grupo controle). O estudo foi realizado com 36 voluntários, sendo 18 agricultores e 18 pessoas do grupo controle. Foram utilizadas técnicas do Ensaio do Cometa e do Teste de Micronúcleos, as quais constatarem uma maior taxa de danos genéticos no grupo formado pelos agricultores, quando comparados ao grupo controle. Além disso, através de um questionário foi possível constatar que os EPIs são utilizados de maneira incorreta e que são realizadas até dez aplicações de agrotóxicos por cultivo anual. Diante dos dados obtidos, foi constatado que os agricultores estão em risco ocupacional. Frente a esse risco constatado, foi realizada uma ação de conscientização, que buscou informar os agricultores sobre os riscos que correm, bem como a importância da utilização correta dos EPIs.

Palavras-chave: Carcinógenos. Ensaio do cometa. Risco ocupacional. Teste de micronúcleo. Xenobionte.

ABSTRACT

MARCELINO, Ana Flavia. **Analysis of the genotoxic potential of pesticides use by farmers of Southwest Paraná.** 2016. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso 2 (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

In Brazil, as in other countries, agriculture has evolved over the years, due to the need to increase food production in the world. With the progress of agriculture after the "Green Revolution", agricultural producers needed to modernize their practices, through the mechanization of land and mainly through the use of pesticides. The diversity of chemicals for pest control in agriculture is enormous, and farmers are constantly exposed to them. The problem is that often different products are used at the same time, spraying is done without Personal Protective Equipment (PPE), and farmers end up occupationally exposed to these substances. The present work sought to verify the occurrence of genetic damages in farmers exposed occupationally to agrochemicals in comparison with people from other professions that did not use toxic substances (control group). The study was carried out with 36 volunteers, 18 farmers and 18 people from the control group. Comet assay and Micronucleus test techniques were used, which verified a higher rate of genetic damage in the group formed by the farmers when compared to the control group. In addition, through a questionnaire it was possible to verify that PPE is used incorrectly and that up to ten pesticide applications are carried out per year. Based on the data obtained, it was verified that the farmers are at occupational risk. Faced with this risk, an awareness campaign was carried out, which sought to inform farmers about the risks involved, as well as the importance of the correct use of PPE.

Keywords: Carcinogens. Comet assay. Occupational risk. Micronucleus test. Xenobiotics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Boxplot de comparação das taxas de danos, observadas através do teste de micronúcleo, com o grupo de agricultores (campo) e o grupo controle (cidade). Acima se encontra o resultado do teste t.22
- Figura 2: Células da mucosa oral obtidas durante o estudo, onde a) célula normal, b) célula com alteração do tipo ponte, c) célula com alteração do tipo micronúcleo e, d) célula com alteração do tipo binucleada. Aumento em 400×23
- Figura 3: Boxplot de comparação das taxas de danos, observadas através do ensaio do cometa, com o grupo de agricultores (campo) e o grupo controle (cidade). Acima encontra-se o resultado do teste t.24
- Figura 4: Imagens de linfócitos sob microscopia de fluorescência com método do cometa. Em a) dano 0, b) dano 1, c) dano 2, d) dano 3, e) dano 4. Aumento 400×25
- Figura 5: Gráfico comparativo idade e taxa de danos - Teste de Micronúcleos e Ensaio do Cometa.....27
- Figura 6: Pesticidas que tiveram mais de 1% do total de vendas no ano de 2015.29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 AGROTÓXICOS NO PARANÁ	11
2.2 EFEITOS CRÔNICOS E GENOTOXICIDADE.....	12
2.3 TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE GENOTOXICIDADE E A RELAÇÃO COM O CÂNCER ...	16
3 METODOLOGIA	18
3.1 VOLUNTÁRIOS	18
3.2 ENSAIO DO COMETA.....	19
3.3 TESTE DE MICRONÚCLEOS	20
3.4 DEVOLUTIVA AOS VOLUNTÁRIOS.....	20
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos no Brasil e no mundo se tornou uma prática comum e necessária com o advento da agricultura, na chamada “Revolução Verde”, um amplo programa para elevar a produção agrícola no mundo (BARROS; SILVA, 2010). Segundo Matos (2010), as práticas agricultáveis cada vez mais modernas e mecanizadas, visando sempre maior produção e lucro são um dos objetivos desta revolução verde. O aumento da produção demanda rapidez e agilidade no extermínio de pragas, sejam elas vegetais ou animais, que possam comprometer a produção. Com base nas necessidades atuais de alta produtividade e agilidade, o desenvolvimento de agrotóxicos capazes de tornar o processo de produção mais eficiente tornou-se um negócio de proporções gigantescas, com o grande crescimento de empresas químicas que fabricam estes produtos (ANDRADES; GAMINI, 2007).

A Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR) estabelece normas, padrões e procedimentos, que determinam a adoção das medidas de prevenção e preservação e contribuem para a sanidade da produção agropecuária paranaense. É esta agência que regulamenta os agrotóxicos que podem ser usados no Paraná. No site da ADAPAR (<http://www.adapar.pr.gov.br/>) é possível encontrar quais produtos estão liberados para utilização no Estado além da bula dos agrotóxicos, que apresenta as informações técnicas sobre os produtos.

Diante da enorme lista de produtos agroquímicos capazes de combater as “pragas” da agricultura, os produtores rurais veem nestes a oportunidade de otimizar sua produção, elevando o rendimento nas colheitas, reduzindo perdas e conseqüentemente maximizando lucros. Além disso, a agilidade de extermínio de ervas daninhas, por exemplo, são mais cômodas aos produtores do que embrenhar-se no meio da plantação para capiná-las, como acontecia antes da “Revolução Verde”. Para Soares (2010), sob o ponto de vista estritamente econômico, na ótica privada do agricultor, vale a pena comprar e utilizar o agrotóxico quando o seu custo encontra-se menor do que o benefício esperado na produção. Esta prática está presente também nas pequenas propriedades rurais de agricultura familiar do Sudoeste do Paraná.

Em 2008, o Brasil tornou-se o principal mercado consumidor de agrotóxicos, ficando à frente dos EUA, consumindo 733,9 milhões de toneladas (SINDICATO..., 2009). Para Soares (2010), este volume pode ser considerado como um verdadeiro “tsunami” na

agricultura brasileira, embora os danos à saúde e, conseqüentemente, os socioeconômicos ainda se encontram “invisíveis” perante a sociedade em geral.

Segundo a Secretaria da Agricultura e do Abastecimento (2014), anualmente, o Paraná registra em média 1,3 mil casos de intoxicações agudas por agrotóxicos. Outro tipo comum de intoxicação é a crônica, que acontece a partir de uma longa exposição a um determinado produto. As maiores vítimas são os trabalhadores rurais que desenvolvem problemas de saúde de maneira gradativa e silenciosa.

É sobre os possíveis danos a saúde causados por esta enxurrada de agrotóxicos no país que o presente projeto busca tratar, mais especificamente nos riscos para os agricultores que trabalham constantemente com os defensivos, manuseando e aplicando em suas lavouras. Busca-se entrar neste campo de estudo, fazendo análises do potencial de toxicidade de pesticidas causado por exposição crônica de agricultores da região Sudoeste do Paraná. Foi feita análise danos crônicos citotóxicos em agricultores que se expõem ocupacionalmente aos agrotóxicos há pelo menos 10 anos, comparando às análises de indivíduos não expostos diretamente aos agroquímicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGROTÓXICOS NO PARANÁ

Um dos agrotóxicos mais usados no Brasil o glifosato, é um potente herbicida não seletivo, capaz de matar rapidamente as plantas monocotiledôneas (AMARANTE JUNIOR; SANTOS, 2002). Porém, por sua não seletividade, tem potencial para matar também as plantas que estão sendo cultivadas. Para contornar este problema, a agricultura contou com as técnicas de genética molecular de transgenia, que por meio de alterações genéticas nos cultivares os torna resistente a determinados agentes químicos como o glifosato, permitindo a aplicação do herbicida durante a estação de crescimento (MALACINSKI, 2011).

Em 2015, a International Agency for Research on Cancer (IARC), especializada em câncer da Organização Mundial da Saúde (OMS), avaliou a carcinogenicidade em cinco pesticidas organofosforados, entre eles, o glifosato. A agência classificou o glifosato, ingrediente do herbicida mais usado no Brasil e no mundo, como provável carcinógeno em humanos, devido a evidências de estudos realizados desde 2001 nos Estados Unidos, Canadá e Suécia sobre a exposição ocupacional agrícola ao componente químico. Após esta nota da IARC, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2014) comprometeu-se a fazer uma reavaliação toxicológica do ingrediente ativo.

Além dos herbicidas, outros agrotóxicos são também utilizados em larga escala na agricultura, como inseticidas e fungicidas, e geralmente são considerados mais tóxicos que os primeiros. Um exemplo de inseticida é o Fipronil, pertence a classe dos fenilpirazóis (COUTINHO et al., 2005).

Ainda segundo Coutinho et al. (2005), o Fipronil atua no sistema nervoso central do inseto inibindo o receptor do ácido gama aminibutírico (GABA). O sistema receptor-GABA, responsável pela inibição da atividade neural anormal, previne o estímulo excessivo dos nervos. O Fipronil bloqueia o receptor promovendo hiperexcitação neural e morte do indivíduo. Em mamíferos, como os roedores utilizados em diversas pesquisas às quais os produtos químicos devem ser submetidos para avaliar seus efeitos antes de qualquer atividade humana, o Fipronil apresentou-se como de alto potencial carcinogênico (OLIVEIRA, 2010).

Outro inseticida comumente utilizado pelos agricultores do sudoeste do Paraná é o Tiametoxam, e tem efeito sistêmico de contato e ingestão. Pertence ao grupo químico do

neonicotinóides e piretróides. O inseticida Tiametoxam possui por características, o amplo espectro de ação sobre insetos-praga, a baixa taxa de aplicação no campo, a excelente translocação na planta e uma segurança ambiental favorável, em função de doses de aplicação relativamente baixas (CARVALHO; PERLIN; COSTA, 2011). Seu mecanismo de ação é semelhante ao do Fipronil, causando colapso no sistema nervoso do inseto. Os piretróides, bem como organofosforados são projetados para bloquear a neurotransmissão em insetos e não ser genotóxicos, porém, estudos feitos por Valverde e Rojas (2009) comprovaram através do ensaio do cometa e outros testes citológicos o potencial genotóxico dos mesmos em pessoas expostas ocupacionalmente.

Além de herbicidas e inseticidas, os agricultores também contam com os fungicidas. Na região sudoeste do Paraná, um fungicida utilizado é a Azoxistrobina do grupo químico da Estrubirulina. A Azoxistrobina tem ação de contato e sistêmico sobre os fungos, inibindo a respiração mitocondrial (GANTE, 2015).

Quando pesquisado no site da Agência de Defesa Agropecuária do Paraná, são encontrados 49 agrotóxicos do tipo herbicida que tem como composto ativo o Glifosato, sendo que pelo menos 13 tem alguma restrição de uso. Também são permitidos no Paraná 26 inseticidas a base do ingrediente ativo Fipronil, e 22 do ingrediente ativo Tiametoxam. Na classe dos fungicidas são permitidos 21 produtos a base de Azoxistrobina no Estado.

2.2 EFEITOS CRÔNICOS E GENOTOXICIDADE

De acordo com Hernández et al. (2006), os efeitos agudos dos agrotóxicos na saúde humana são bem conhecidos principalmente para os mais utilizados atualmente, porém os efeitos crônicos, causados pela continua exposição a longo prazo, incluindo carcinogênese, neurotoxicidade, desenvolvimento reprodutivo e efeitos imunológicos não têm sido caracterizados adequadamente, pois os efeitos tardios de alguns desses químicos podem se tornar aparentes somente após 18 anos de exposição.

Segundo Silva et al. (2005), os agrotóxicos são absorvidos pelo corpo humano pelas vias respiratória e dérmica e, em menor quantidade, também pela via oral. Uma vez no organismo humano, poderão causar quadros de intoxicação aguda ou crônica. A intoxicação aguda ocorre pela exposição a um determinado produto químico em grandes doses por um curto período e pode ser caracterizada por náusea, vômito, cefaleia, tontura, desorientação,

hiperexcitabilidade, parestesias, irritação de pele e mucosas, fasciculação muscular, dificuldade respiratória, hemorragia, convulsões, coma e morte (SILVA et al., 2005).

Já a intoxicação crônica caracteriza-se por surgimento tardio, após meses ou anos, por exposição pequena ou moderada a produtos tóxicos ou a múltiplos produtos, acarretando danos irreversíveis, do tipo paralisias e neoplasias (BRASIL, 1997).

A obra da bióloga norte-americana Rachel Carson “Primavera Silenciosa” chama a atenção sobre os efeitos dos pesticidas utilizados de maneira destruidora durante as décadas de 1940 à 1960, como forma de extermínio das “pragas” animais e vegetais. Em seu livro, Carson (1962), cita principalmente os efeitos devastadores do uso do inseticida diclorofeniltricloroetano (DDT), que atingiu muito além dos insetos alvo, inúmeras espécies de peixes, aves e animais domésticos que eram expostos a esse químico, de maneira a quase extinguir algumas espécies. Além disso, a autora alerta sobre o efeito cumulativo do inseticida nos tecidos do corpo humano, e a maneira como este acúmulo de produtos químicos não naturais ao organismo humano pode causar danos. Segundo Carson (1962), o DDT, assim como outros inseticidas e herbicidas, tem potencial citotóxico a longo prazo, afetando especialmente a organela mitocôndria, produtora da energia que mantém as células funcionando ativamente, além de causar danos capazes de induzir a proliferação de células “modificadas” em sua função, causando o câncer. Após a publicação do livro, alguns países baniram completamente a produção, armazenagem e uso do inseticida. No Brasil seu uso agrícola foi proibido em 1985, e somente em 2009, foi totalmente proibida a produção, importação e manutenção de estoque do inseticida DDT (AGÊNCIA..., 2009).

Informações do manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos elaborados por Brasil (1997) dão conta que a intoxicação crônica está relacionada com três fatores principais: as características do produto, da pessoa exposta e das condições de exposição.

Como já citado anteriormente, a intoxicação crônica pode ocorrer devido à exposição a múltiplos produtos, por um longo período de tempo, sendo nesta situação que os agricultores enquadram-se. O Quadro 1 traz uma síntese dos principais sintomas agudos e crônicos da exposição à agrotóxicos, segundo Brasil (1997). Além dos sintomas agudos e crônicos causados pela exposição a algum tipo de agrotóxico, o manual de vigilância de populações expostas a agrotóxicos, também traz sintomas referentes ao uso de múltiplos agroquímicos, o que é demonstrado no Quadro 2, sobre os efeitos prolongados da exposição a múltiplos agrotóxicos, também segundo Brasil (1997).

	Exposição	
	Única ou por período curto	Continuada por longo período
Sinais e Sintomas Agudos	Náusea, cefaleia, tontura, vômito, fasciculação muscular, parestesias desorientação, dificuldade respiratória, coma, morte.	Hemorragias, hipersensibilidade, teratogênese, morte fetal.
Sinais e Sintomas Crônicos	Paresia e paralisia reversíveis, ação neurotóxica retardada irreversível, pancitopenia, distúrbios neuropsicológicos.	Lesão cerebral irreversível, tumores malignos, atrofia testicular, esterilidade masculina, alterações comportamentais, neurites periféricas, dermatites de contato, formação de catarata, atrofia do nervo ótico, lesões hepáticas, etc.

Quadro 1. Relação entre tipos de exposição a agrotóxicos e sinais e sintomas clínicos presentes
Fonte: Brasil (1997).

Sistema/Órgão	Efeito
Sistema Nervoso	Síndrome asteno-vegetativa, polineurite, radiculite, encefalopatia, distonia vascular, esclerose cerebral, neurite retrobulbar, angiopatia da retina
Sistema Respiratório	Traqueíte crônica, pneumofibrose, enfisema pulmonar, asma brônquica
Sistema Cardiovascular	Miocardite tóxica crônica, insuficiência coronária crônica, hipertensão, hipotensão
Fígado	Hepatite crônica, colecistite, insuficiência hepática
Rins	Albuminúria, nictúria, alteração do clearance da uréia, nitrogênio e creatinina
Trato Gastrointestinal	Gastrite crônica, duodenite, úlcera, colite crônica hipersecreção e hiperacidez gástrica, prejuízo da motricidade
Tecido hematopoiético	Leucopenia, eosinopenia, monocitose, alterações na hemoglobina
Pele	Dermatites, eczemas
Olhos	Conjuntivite, blefarite

Quadro 2. Efeitos da exposição prolongada a múltiplos agrotóxicos
Fonte: Brasil (1997).

Esta exposição múltipla é comum entre os agricultores familiares, pois eles mesmos fazem todo o processo de aplicação dos diferentes defensivos em suas lavouras, por muitos anos, e muitas vezes sem os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) necessários.

Nos Quadros 1 e 2 foram citados os sintomas causados pela exposição demasiada aos agrotóxicos. Esses sintomas aparecem como resultado de uma intoxicação com os produtos químicos. De acordo com Oga; Camargo e Batistuzzo (2008) a intoxicação pela exposição do organismo ao produto químico, o qual é absorvido por várias vias chegando ao sistema circulatório, e carregado para outros órgãos e tecidos do corpo. Nos tecidos, o agente intoxicante atinge a célula alterando seu metabolismo. Com o metabolismo alterado a célula

pode ter problemas no ciclo celular e até mesmo na expressão de proteínas. O acúmulo de células com metabolismo alterado leva a manifestações sintomáticas.

Para Silva (2005) entende-se por agente tóxico a entidade química capaz de causar dano a um sistema biológico como a célula, alterando seriamente uma função ou levando-o à morte, sob certas condições de exposição. Pode-se designar as substâncias estranhas ao organismo, e capazes de causar alterações em seu metabolismo como substância xenobiótica. A eliminação destas substâncias é fundamental para evitar danos ao organismo, pois para Hatagima (2002), em seu estado natural ou biotransformação, os xenobióticos ou xenobiontes podem afetar a integridade do material celular, levando ao câncer se a exposição persistir.

No que diz respeito a eliminação de xenobiontes pelo organismo, pode se dizer que é fundamental o processo de biotransformação, onde agentes tóxicos são transformados em não tóxicos, sendo esta a primeira linha de defesa no processo de eliminação de toxinas no organismo (KOIFMAN; HATAGIMA, 2003).

No Brasil, a classificação toxicológica dos agrotóxicos está a cargo do Ministério da Saúde, que relaciona através de testes com roedores, por exemplo, a toxicidade do produto com dose, a chamada Dose Letal 50 ou DL50. Os testes são realizados com determinado número amostral de roedores, e a dose capaz de matar 50% desta população é chamada de DL50. Para cada nível de toxicidade, existe uma cor indicativa padronizada, a qual deve aparecer em forma de faixa de segurança na embalagem do produto. Conforme Brasil (1997) o Quadro 3 classifica os agrotóxicos como:

Classes	Grupos	DL50 (mg/kg)	Cor da faixa
I	Extremamente tóxicos	≤5	Vermelha
II	Altamente tóxicos	5-50	Amarela
III	Medianamente tóxicos	50-500	Azul
IV	Pouco tóxicos	500-5000	Verde

Quadro 3: Classificação dos agrotóxicos quando a toxicidade
Fonte: Brasil (1997).

As doses letais, indicadas pela DL50, são efeitos da intoxicação aguda. Os efeitos crônicos não aparecem na tabela de classificação toxicológica. A composição e a formulação química dos agrotóxicos, combinados com o uso simultâneo de diferentes produtos na agricultura dificultam o monitoramento e avaliação dos sintomas e diagnóstico dos possíveis efeitos da intoxicação celular crônica (HERNANDÉZ et al., 2006).

Nunes e Tajara (1998) afirmam que a genotoxicidade está entre os piores dos possíveis danos causados por produtos agroquímicos e merece o foco das atenções devido à natureza geralmente irreversível do processo e ao longo período de latência associado à sua

manifestação. Segundo Koifman e Hatagima (2003) em relação à genotoxicidade, a determinação das alterações citogenéticas nos indivíduos expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos pode ser utilizada como marcador de efeito biológico precoce.

2.3 TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE GENOTOXICIDADE E A RELAÇÃO COM O CÂNCER

Técnicas de pesquisa básica estão sendo empregadas para a detecção da genotoxicidade, como o ensaio de cometa e teste de micronúcleos. Estas técnicas tornaram possível o monitoramento de modificações do DNA e têm sido empregadas com o objetivo de avaliar danos que precederiam o desenvolvimento do câncer (KOIFMAN; HATAGIMA, 2003).

O ensaio do cometa apresenta uma vantagem adicional para o biomonitoramento humano, pois aplicação deste é viável a um amplo espectro de células. Células de tecidos que são os primeiros sítios de contato com os xenobiontes são adequadas para avaliação de danos causados por exposição crônica utilizando o ensaio do cometa (VALVERDE; ROJAS, 2009). Além disso, o ensaio do cometa é uma técnica simples, rápida e de baixo custo para detectar e avaliar lesões pré-mutagênicas, isso significa que o teste não identifica mutações, mas sim lesões genômicas que podem ser revertidas (SCHERER; STROHSCHOEN, 2013).

A técnica do teste de micronúcleos permite verificar danos citológicos, e é uma ferramenta utilizada no monitoramento de indivíduos expostos a agentes carcinogênicos. O teste do micronúcleo é considerado um procedimento rápido, barato e não invasivo, pois são utilizadas células da mucosa oral (CARVALHO et al., 2002).

Segundo Cox, Doudna e O'Donnell (2012), os componentes reativos ao DNA são conhecidos como genotóxicos, pois ocasionam mutações no DNA genômico. O câncer é causado pela mutação de uma única célula. Essa mutação provoca alterações no processo de divisão celular, especialmente relacionados com seu controle e alterações na sua diferenciação. Suas descendentes acumulam outras mutações que se somam e dão origem a uma célula cancerosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Ainda segundo Junqueira e Carneiro (2005), a célula cancerosa prolifera muito, e com o passar dos anos, perde a capacidade de aderência, secreta enzimas que atacam a matriz extracelular e invade tecidos vizinhos, penetra nos vasos sanguíneos e linfáticos se espalhando

pelo organismo. Podem se estabelecer em locais distantes de sua origem formando tumores secundários, as metástases.

Qualquer substância diretamente envolvida na promoção de um câncer é um carcinógeno (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012). Os agentes carcinógenos podem ser externos ou internos. Entre os agentes externos estão os químicos e entre eles os agrotóxicos usados diariamente pelos agricultores.

A partir do conhecimento sobre a formação de tumores, justifica-se a necessidade de um estudo preventivo visando a detecção de efeitos citotóxicos pré-mutagênicos em pessoas que estão constantemente expostas a agentes xenobiontes e carcinogênicos.

3 METODOLOGIA

3.1 VOLUNTÁRIOS

Primeiramente, o projeto foi submetido ao conselho de ética em pesquisa com seres humanos (CEP) da Universidade Tecnológica do Paraná (UTFPR), e posteriormente ao Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O projeto foi aprovado pelo CEP conforme parecer consubstanciado número 1.585.474 (Anexo A) e encaminhado ao CONEP, o qual desconsiderou a necessidade de avaliação, liberando assim a aprovação do projeto no dia 18 de junho de 2016, emitindo parecer consubstanciado (Anexo B).

No mês de julho, iniciaram-se as buscas prospectivas em comunidades da zona rural, e contato com agricultores da região sudoeste do Paraná, que utilizam pesticidas em suas propriedades e estão expostos ocupacionalmente a estes produtos. Após a localização dos agricultores em suas propriedades, os mesmos foram convidados a participar do projeto de pesquisa, e após abordagem sobre o tema, responderam a um breve questionário (Apêndice A) sobre as atividades desenvolvidas e os que concordaram em participar do projeto assinaram o “Termo de consentimento livre esclarecido” (Apêndice B) sendo assim inclusos na pesquisa.

Também foram abordadas pessoas da região sudoeste do Paraná, que não tinham contato com pesticidas em seus trabalhos, para servirem como grupo controle. Estes também assinaram o “Termo de consentimento livre esclarecido”. Como critério de inclusão no grupo controle os voluntários não deviam manipular substâncias tóxicas em suas ocupações, bem como, não serem fumantes. Os voluntários do grupo de interesse, que são os agricultores, também não deviam ser fumantes, caso fossem não poderiam participar da pesquisa.

As respostas obtidas no questionário foram analisadas de forma descritiva, com exceção das idades, as quais foram relacionadas a taxa de dano de cada indivíduo para o teste de micronúcleos e ensaio do cometa. Com os dados referentes a taxa de danos e idade, foi realizado uma comparação através de um gráfico 2D *scatterplots*, com regressão linear múltipla, para obtenção de um valor de “p” e equação da regressão, para verificar se havia correlação entre o aumento da idade e a elevação na taxa de danos.

3.2 ENSAIO DO COMETA

O protocolo utilizado para a realização do teste é baseado na metodologia descrita por Singh et al. (1988) com algumas modificações. Foi utilizado 4 ml sangue periférico que foi coletado por uma profissional técnica em enfermagem, a qual foi contratada pelas pesquisadoras. A coleta foi realizada seguindo os padrões do Manual de Coleta de Material Biológico (UNIVERSIDADE..., 2014) e as amostras acondicionadas em tubos com anticoagulante (EDTA), envoltos por papel alumínio, protegendo as amostras da exposição a luz.

Após a coleta, as amostras foram armazenadas em geladeira a 4°C no Laboratório de Biologia Molecular, onde foi adicionada uma alíquota de 5 µl de sangue com 75 µl de agarose de baixo ponto de fusão 0,75%, a uma temperatura de 37°C em banho-maria e espalhadas em lâminas de microscopia pré-cobertas com agarose padrão 1,4%. Em seguida, estas lâminas foram cobertas com uma lamínula e armazenadas em geladeira até solidificar.

Após a solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas armazenadas em cubetas de vidro apropriadas protegidas da luz e já com solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO). Nesta solução as lâminas ficaram por duas semanas, para que houvesse a lise das membranas permanecendo apenas o material genético condensado como nucleóide.

Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese, cobertas com tampão de eletroforese (300 mM NaOH e 1 mM EDTA), permanecendo em descanso por 30 minutos e protegidas da luz. Então, foi realizada eletroforese em condições alcalinas (pH >13) a 25V e uma corrente de 300 mA por 15 minutos. A cuba da eletroforese estava envolta por gelo para manter a temperatura de 4°C e ao abrigo da luz.

Após a eletroforese, as amostras foram cobertas com o tampão TRIS (0,4 M Tris pH 7,5), para serem neutralizadas por cinco minutos. Esta etapa foi repetida três vezes, desprezando-se o tampão em cada troca. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada e colocadas para secar overnight, em temperatura ambiente.

Num outro momento, as lâminas foram colocadas por 10 minutos em solução fixadora (15% de ácido tricloroacético + 5% de sulfato de zinco (heptahidratado) + 5% de glicerol), sendo lavadas três vezes em água destilada. Em seguida foram colocadas em estufa para secagem à 37°C por 1 hora e 30 minutos. Ao retirar as lâminas da estufa, elas foram

hidratadas por cinco minutos em água destilada. As lâminas ficaram armazenadas em caixas porta lâminas para posterior análise.

Para realização da análise, as lâminas foram coradas com brometo de etídeo, também em abrigo da luz e observadas em microscópio de epifluorescência.

Para cada pessoa, foram analisados 100 nucleoides, usando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA, seguindo as classes: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) 3 (dano extenso), 4 (dano máximo, apoptose). O escore será calculado multiplicando o número de núcleos encontrado em dada classe pelo número da classe.

3.3 TESTE DE MICRONÚCLEOS

Para a realização do teste de micronúcleo o protocolo utilizado é baseado em Benedetti et al. (2013). Células epiteliais da mucosa oral foram obtidas por esfregaço da bochecha dos indivíduos, com um cotonete, que foi imerso em uma solução tampão fosfato (pH=6,5) em um microtubo e transportado sob refrigeração para o laboratório. A solução foi centrifugada a 1300 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento de células lavado duas vezes com solução salina (0,9%). Por último, foi centrifugado o sedimento com fixador Carnoy (metanol e ácido acético 3:1) sob as mesmas condições de centrifugação. A suspensão foi pingada sobre uma lâmina e seca ao ar a temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com Giemsa 2% por 10 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar.

Para cada indivíduo, foi contada a frequência de células epiteliais com núcleos alterados contada em um total de 1.000 células. Foram avaliados a formação de micronúcleos e alterações na morfologia do núcleo, conforme mostrados na figura 2, onde: a) micronúcleo, b) binucleado, c) ponte e d) gema. As lâminas foram analisadas sob microscópio óptico em ampliação de 400 vezes.

3.4 DEVOLUTIVA AOS VOLUNTÁRIOS

Após a realização das análises, foi realizada uma devolutiva dos resultados aos voluntários que optaram por isso no preenchimento do Termo de Consentimento Livre

Esclarecido, de maneira particular a cada voluntário. Além disso, como foi constatado o risco ocupacional para os agricultores, realizou-se uma “Ação de Conscientização” onde as pesquisadoras apresentaram alternativas para diminuir o índice de danos genotóxicos e prevenir o aumento destes através de uma palestra, onde foram apresentados os resultados gerais, comparando agricultores com o grupo controle. Na palestra, realizada com os agricultores no município de Santo Antônio do Sudoeste – Paraná, foram abordados temas como a importância do uso de Equipamentos de Proteção Individual ao manusear qualquer quantidade de pesticidas, além de outras medidas profiláticas que podem ser estabelecidas não só para pesticidas, mas também para outros agentes carcinogênicos.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos com o teste de micronúcleos foram tabulados e submetidos a um *Teste t* de medianas, no software R Core Team (2016). No ensaio do cometa, ao término da obtenção dos valores classificatórios para danos em linfócitos (danos 0,1, 2, 3 e 4), os dados foram tabulados e calculados os escores de danos para cada indivíduo, utilizando a seguinte equação: $ESCORE = (0 \times \text{número de células com dano 0}) + (1 \times \text{número de células com dano 1}) + (2 \times \text{número de células com dano 2}) + (3 \times \text{número de células com dano 3}) + (4 \times \text{número de células com dano 4})$. Calculados os escores, estes foram analisados estatisticamente também pelo software R Core Team (2016), através do teste de medianas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

TESTE DE MICRONÚCLEOS

Com a análise estatística, constatou-se que as amostras de saliva colhidas do grupo formado pelos agricultores apresentaram uma média de dano celular de 3,28 alterações a cada 1000 células. Já o grupo controle apresentou média de 1,11 alterações nucleares a cada 1000 células.

Utilizando o *Teste t* os valores encontrados foram: $t=3,76$, que considerado a um grau de liberdade = 34, obteve-se um valor $p=0,0006$ na comparação dos grupos, conforme a Figura 1. Ou seja, há diferença significativa entre as médias, e os maiores valores de dano no teste do micronúcleo são observados nos agricultores. As alterações morfológicas dos núcleos podem ser observadas conforme a Figura 2.

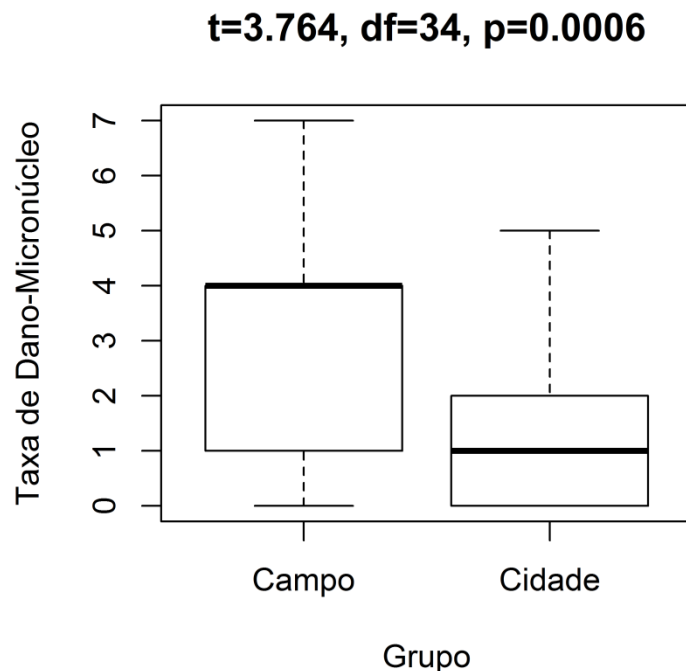


Figura 1: Boxplot de comparação das taxas de danos, observadas através do teste de micronúcleo, com o grupo de agricultores (campo) e o grupo controle (cidade). Acima se encontra o resultado do teste t.

Fonte: A autora.

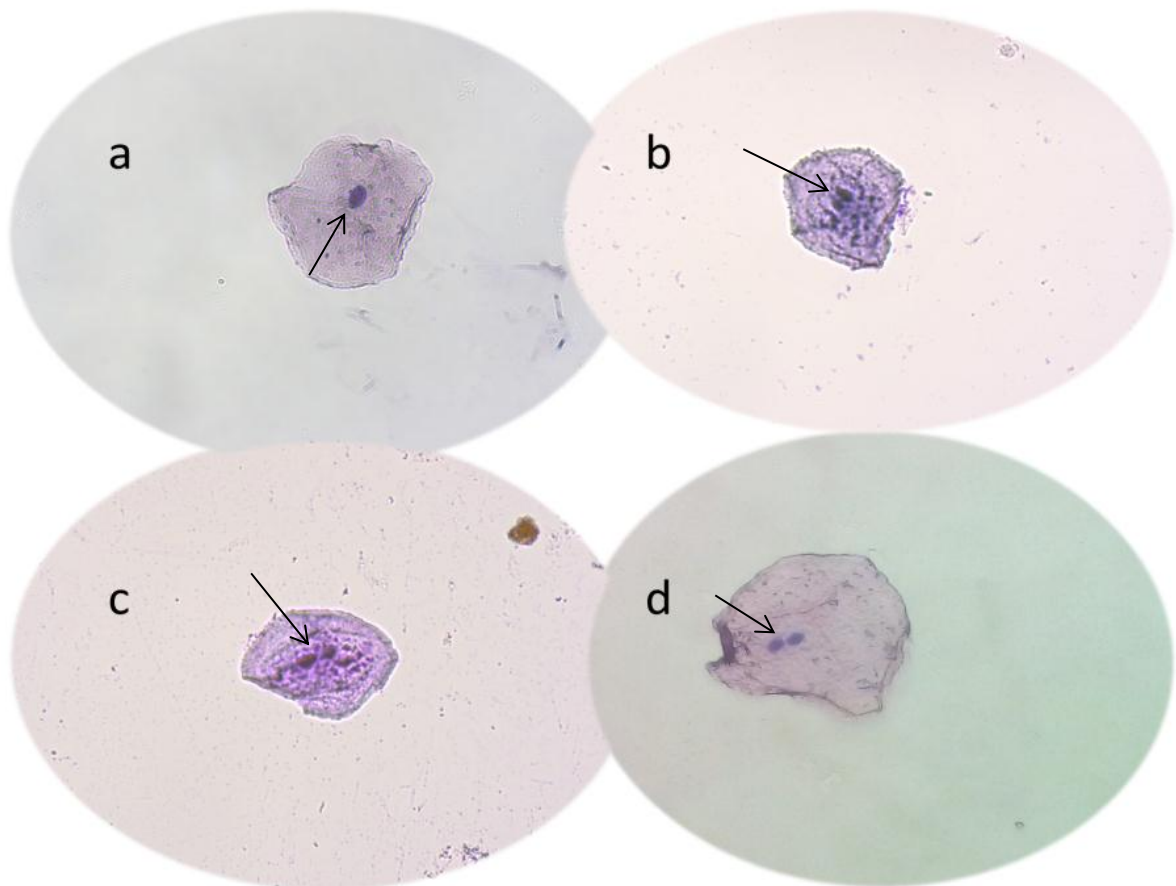


Figura 2: Células da mucosa oral obtidas durante o estudo, onde a) célula normal, b) célula com alteração do tipo ponte, c) célula com alteração do tipo micronúcleo e, d) célula com alteração do tipo binucleada. Aumento em 400×

Fonte: A autora.

ENSAIO DO COMETA

Após a realização do *Teste t*, os valores constatados foram: $t=3,301$ que considerados 34 graus de liberdade, resulta em um $p=0,002$. Com esses valores, corrobora-se a diferença significativa entre os grupos.

Conforme observado na Figura 3, pode-se constatar que o grupo formado pelos agricultores (Campo) apresenta maior taxa de dano ao DNA linfocitário quando comparado

ao grupo controle (Cidade). A fragmentação classificatória para a análise pode ser observada conforme a Figura 4, com imagens obtidas durante a pesquisa.

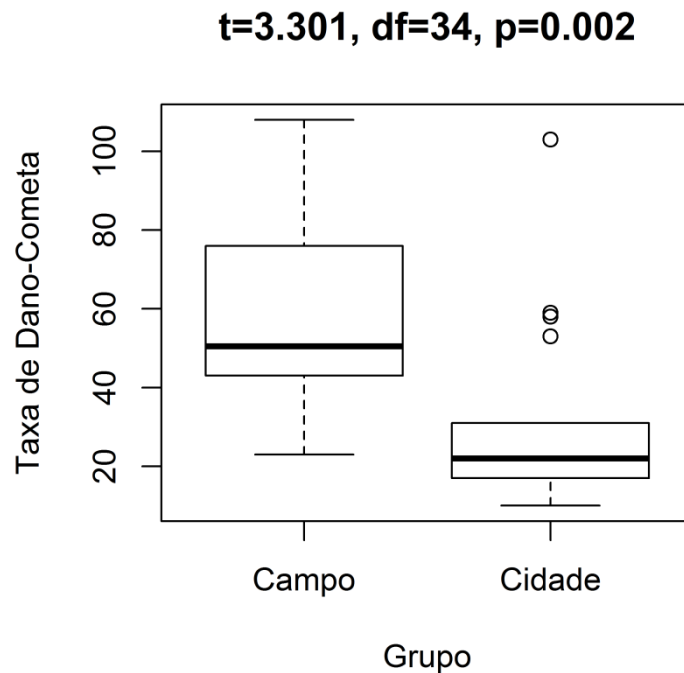


Figura 3: Boxplot de comparação das taxas de danos, observadas através do ensaio do cometa, com o grupo de agricultores (campo) e o grupo controle (cidade). Acima encontra-se o resultado do teste t.

Fonte: A autora.

Neste estudo, o teste do micronúcleo detectou o aumento da ocorrência de alterações morfológicas no núcleo das células de agricultores que trabalham com pesticidas. Os micronúcleos são formados em células após o processo de mitose, onde cromossomos fragmentados ou desorientados não são integrados ao núcleo da célula-filha (GIRI et al., 2002). Ainda segundo Giri et al. (2002), pesticidas metálicos e organofosforados podem induzir a formação de micronúcleos.

Os autores Benedetti et al. (2013), também fizeram comparação entre trabalhadores agrícolas expostos a pesticidas e pessoas de outras profissões, que não tinham contato com substâncias tóxicas, no Estado do Rio Grande do Sul, onde o resultado foi a maior presença de micronúcleos nas células de agricultores.

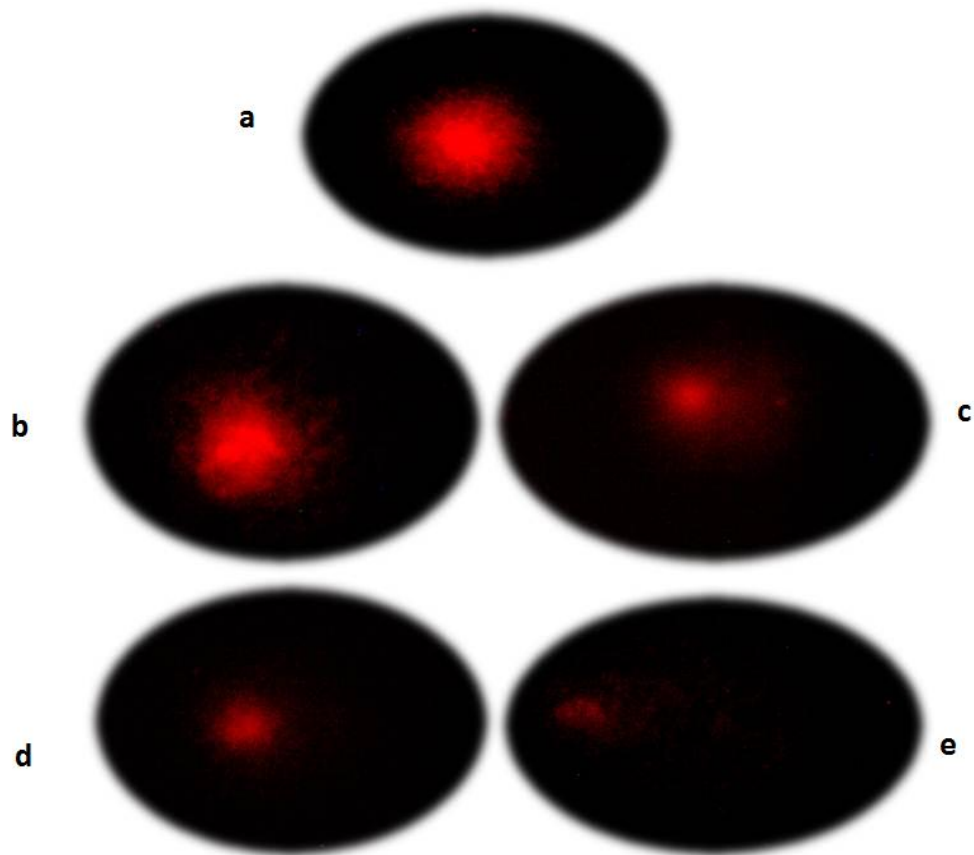


Figura 4: Imagens de linfócitos sob microscopia de fluorescência com método do cometa. Em a) dano 0, b) dano 1, c) dano 2, d) dano 3, e) dano 4. Aumento 400×

Fonte: A autora.

Com metodologia do ensaio do cometa, assim como no teste de micronúcleos, ficou evidente que o grupo formado por agricultores tem uma maior taxa de danos em suas células. No ensaio do cometa são detectadas lesões causadas por agentes genotóxicos, capazes de provocar quebras na dupla fita de DNA (FAIRBAIRN et al., 1995).

Diversos estudos realizados obtiveram resultados semelhantes, como o de Garaj-Vrhovac; Zeljezic (2000), o qual comparou a taxa de lesões no DNA de trabalhadores na produção de pesticidas, expostos a diferentes formulações, com pessoas que não tinham contato com estes agentes tóxicos. Estes autores encontraram também diferença significativa entre os grupos avaliados. O teste foi repetido também com trabalhadores que haviam deixado de se expor aos pesticidas há seis meses, os quais continuaram a apresentar danos genotóxicos

significativos, concluindo que além da indução dos danos, os pesticidas podem provocar alterações nos mecanismos de reparo de mutações (COLLINS et al. 2014).

Da mesma forma que no teste de micronúcleos Benedetti et al. (2013), encontraram diferença significativa no número de lesões no DNA dos agricultores submetidos ao ensaio do cometa. Estes autores trabalharam com voluntários que também se expunham a diferentes formulações de pesticidas ao longo de sua atividade. A exposição a múltiplas formulações químicas pode levar a danos como cross-link DNA-DNA e DNA-Proteína, ruptura das duas cadeias e formação de aductos de DNA (GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2000).

O ensaio do cometa tem sido amplamente utilizado para biomonitoramento ocupacional de trabalhadores e os autores Valverde; Rojas (2009) ressaltam a importância de analisar efeitos genotóxicos em longo prazo, para assim estabelecer precisamente riscos do desenvolvimento de câncer, por exemplo. Para Maluf; Riegel (2011) os linfócitos que são as células utilizadas no ensaio do cometa, podem refletir o estado geral do organismo, à medida que eles circulam através de todo o corpo humano.

Após a aplicação do questionário aos voluntários, percebeu-se que a utilização de EPIs é bastante precária entre os mesmos. Quando perguntados se faziam uso do EPI muitos hesitaram em responder, dizendo que o equipamento é desconfortável e quente, que na maioria das vezes acabam utilizando apenas alguns itens como botas, calças e blusa de manga longa, deixando de lado a máscara, viseira e touca protetora. Além disso, disseram que dificilmente utilizam luvas no momento de preparo dos agrotóxicos para pulverização. Relataram ainda, diversos incidentes de contato com os produtos químicos durante o preparo e aplicação.

Com base nas respostas obtidas, é possível associar aos estudos realizados por Bull et al. (2006) onde foi observado que a falta do uso de EPIs durante as aplicações de agrotóxicos influenciam diretamente no aumento das taxas de danos citológicos. O problema está relacionado também com as condições do EPI utilizado, que nem sempre é substituído conforme a necessidade.

A exposição contínua aos agrotóxicos, sem a devida proteção e a persistência dos danos citológicos causados por estes, podem levar a um maior nível de alterações citogenéticas. Se houverem danos no DNA que afetem os genes supressores de tumores, ou oncogenes, a célula lesionada pode se diferenciar e proliferar sem controle, levando a formação de tumores (ALBERTS et al., 2010). Os autores Beyersmann; Hartwig (2008) relacionaram os pesticidas metálicos como indutores de lesões oxidativas nas células, gerando uma cadeia de acontecimentos que pode inibir o reparo aos danos do DNA, acúmulo de

mutações, e desregulação da proliferação celular ou a inativação dos genes supressores de tumores.

Um fato importante a ser destacado, é que os voluntários da pesquisa não tem nenhuma doença crônica diagnosticada e também afirmaram nunca ter sofrido intoxicação aguda por agrotóxico.

Ainda com as respostas obtidas no questionário, verificou-se que a idade dos trabalhadores rurais voluntários na pesquisa variou de 24 a 71 anos. Contudo, verificou-se que não há relação significativa entre a idade do voluntário e a taxa de danos observada, como pode ser observado na Figura 5. Após a realização de teste estatístico utilizando as idades dos voluntários de cada teste bem como a taxa de danos correspondente, obteve-se um valor $p=0,7132$ para o teste do micronúcleo e $p=0,2586$ para o ensaio do cometa. Estes valores de p correspondem a uma não correlação entre o avanço da idade e o aumento da taxa de danos ao material genético.

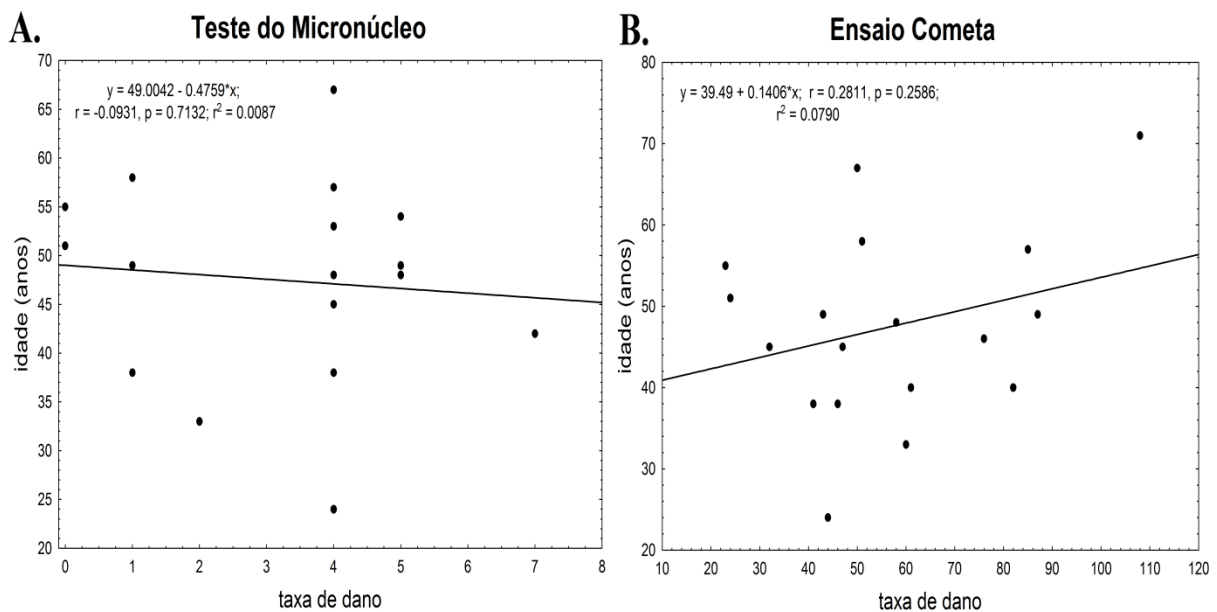


Figura 5: Gráfico comparativo idade e taxa de danos - Teste de Micronúcleos e Ensaio do Cometa

Fonte: A autora.

A não relação entre a idade dos voluntários e a taxa de danos genéticos encontrados em cada indivíduo pode estar relacionada com alguns fatores. Entre eles pode-se citar que cada um deles apresenta determinada postura no momento do contato com os agrotóxicos. Os mais jovens que apresentam elevadas taxas de danos podem estar expondo-se a pesticidas mais tóxicos ou em doses maiores do que os voluntários de maior idade trabalharam durante suas vidas. Outro fator que pode influenciar este resultado, é o fato de as células dos tecidos

utilizados (epitélio da mucosa oral e linfócitos) são altamente renováveis. Além disso, inclui-se a resposta individual de cada organismo ao metabolizar essas substâncias tóxicas e a forma de utilização do EPI.

Quando perguntados sobre o número de vezes que fazem aplicação de pesticidas em suas propriedades durante o ano, as respostas foram surpreendentemente altas, alcançando o número mínimo de dez aplicações por cultura (soja, trigo ou milho). Essas aplicações incluem a dessecação pré-semeadura, onde toda a cobertura vegetal existente incluindo plantas daninha são eliminadas, que ocorre até duas vezes antes do plantio. Além da dessecação, os agricultores relataram aplicar fungicida até quatro vezes por cultura e que a cada ataque de praga seja ela de insetos, fungos ou plantas daninha ocorrem entradas para a pulverização de agrotóxico.

Ao serem questionados sobre quais agrotóxicos utilizavam, na classe dos herbicidas foram citados o glifosato e o 2,4-D, este último mostrando expansão em seu uso no Paraná de acordo com os dados fornecidos pela Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (2015). Entre os fungicidas foram citados os ingredientes ativos azoxistrobina (pirazol), ciproconazol (triazol), piraclostrobina (carbamato) e epoxiconazol (triazol). Na classe dos inseticidas foram citados pelos agricultores o profenofós, lufenuron (organofosforados) e tiametoxam (piretróide). Conforme dados fornecidos pela ADAPAR, na Figura 5, pode-se observar que os pesticidas que mais tiveram volume de vendas no ano de 2015 foram o glifosato e seus ácidos equivalentes aparecendo em primeiro lugar com cerca de 13,05% e o outro herbicida citado pelos voluntários, o 2,4-D aparece com 2,02% do total comercializado no estado. A azoxistrobina e o ciproconazol também aparecem representando mais de 1% das vendas do estado. Os demais ingredientes ativos citados pelos agricultores correspondem a menos de 1% das vendas cada, e estão inclusos em uma lista com outros 365 compostos que são comercializados no Paraná.

Uma grande gama de estudos referentes à genotoxicidade do herbicida glifosato pode ser encontrado na literatura usando como referência organismos modelo, principalmente peixes. Dentre eles podem-se citar os estudos de Souza-Filho (2011) e Aranha (2013) que utilizaram as espécies *Poecilia reticulata* e *Colossoma macropomum* respectivamente, como modelos. Ambos os estudos confirmaram o efeito genotóxico da exposição dos animais ao ingrediente ativo glifosato através do ensaio do cometa e do teste de micronúcleos, observando um notório aumento na taxa de danos dos indivíduos expostos comparados ao controle negativo. Estudos com anfíbios e répteis mostram resultados semelhantes (BOSCH et al., 2011; GRISOLIA, 2002; POLETTA et al., 2009, 2011).

O estudo de Monroy et al. (2005), pesquisou através do ensaio cometa, os efeitos do glifosato em células humanas in vitro. Foi evidenciado dano ao DNA após o tratamento com este pesticida, que é o mais vendido no estado Paraná, corroborando os dados obtidos no presente trabalho. Resultado semelhante também foi encontrado por Mañas et al. (2009) mostrando que o glifosato causa alterações genotóxicas células hepáticas humanas e aumenta o número de micronúcleos em camundongos.

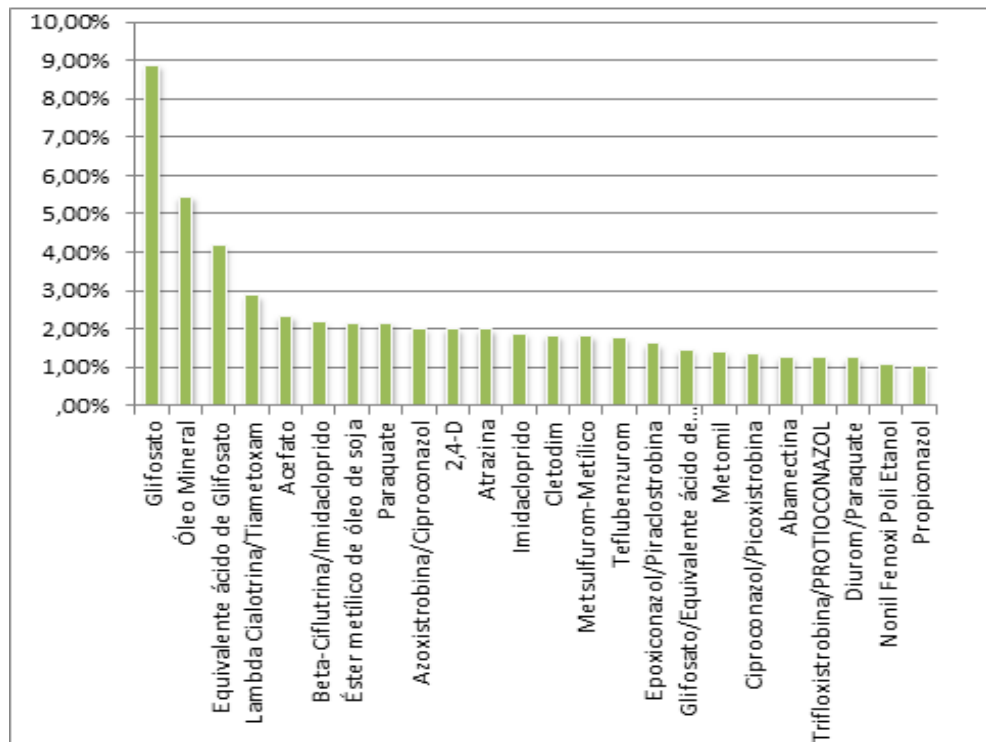


Figura 6: Pesticidas que tiveram mais de 1% do total de vendas no ano de 2015.

Fonte: Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (2015).

Semelhante ao estudo desenvolvido neste trabalho, o autor Paiva (2011), realizou biomonitoramento em agricultores de duas comunidades do Ceará, utilizando o ensaio do cometa. Dados levantados por este dão conta que os agrotóxicos azoxistrobina e o ciproconazol também são utilizados pelos agricultores da região. Após a realização do ensaio do cometa, notou-se também a diferença significativa entre os danos encontrados no grupo de agricultores e no grupo controle, apresentando elevação na taxa de danos dos agricultores, tal qual o presente trabalho.

Segundo Caldas (2000), os pesticidas organofosforados e carbamatos são inibidores da acetilcolinesterase que impedem a inativação da acetilcolina e permitem maior intensidade da ação do neurotransmissor nas sinapses colinérgicas, a nível de membrana pós-sináptica. A acetilcolina é um neurotransmissor liberado na fenda sináptica durante a transmissão do impulso nervoso nas sinapses que usam este neurotransmissor. Após a transmissão a acetilcolina deve ser hidrolisada pela acetilcolinesterase. Quando ocorre acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, é gerado uma hiperestimulação colinérgica. A intoxicação aguda por organofosforados e carbamatos provoca sintomas como salivação, sudorese, ansiedade, fraqueza, tremores, hipertensão, diarreia e até coma. Ainda segundo Caldas (2000), estes pesticidas podem causar efeitos tardios de intoxicação crônica, como a Síndrome Intermediária que provoca paralisia dos nervos cranianos, músculos respiratórios e do pescoço e a Neuropatia Tardia caracterizada pela paralisia das extremidades.

Além do risco do desenvolvimento dos prejuízos tardios como câncer e síndromes comprometedoras, os trabalhadores rurais estão suscetíveis a outro tipo de risco ocupacional, com prejuízo irreversível: o suicídio. Estudos feitos por Falk et al. (1995), no Rio Grande do Sul, apontaram o suicídio diretamente relacionado com o uso de pesticidas organofosforados, os quais produzem sequelas neurológicas incluindo efeitos comportamentais crônicos no Sistema Nervoso Central, como dificuldade de concentração, perda de memória, apatia, irritabilidade, esquizofrenia e depressão.

Estudos feitos por Souza (2007) quantificaram a taxa de suicídios nas regiões Oeste e Sudoeste Paranaense dos anos de 1990 a 2005 e os resultados são expressivos. Neste período de 15 anos 80,3% dos suicídios cometidos na região Sudoeste do estado são do sexo masculino, destes 44,7% eram agricultores, sendo o restante do percentual dividido em outras 12 profissões (SOUZA, 2007). Segundo a autora, estes índices alarmantes de auto violência tem relação com o endividamento, perda de safras, êxodo rural, concentrações de terra e também com a exposição profissional ao uso de agrotóxicos.

O presente estudo demonstrou que trabalhadores agrícolas estão constantemente expostos a substâncias citotóxicas e mutagênicas, o que foi mostrado pelo teste de micronúcleos e ensaio cometa. Assim, enfatiza-se a necessidade de estudos de biomonitoramento para avaliar e assegurar boas condições de trabalho para agricultores, conscientizando sobre o uso de EPIs. Por esta razão, além da pesquisa por danos genético, neste trabalho também foi realizada uma devolutiva aos voluntários através de uma “Ação de Conscientização”, destinada aos participantes e familiares deste projeto.

Além disso, ressalta-se a necessidade da pesquisa e difusão do uso de pesticidas menos tóxicos ou métodos alternativos de controle de pragas agrícolas.

5 CONCLUSÃO

Após o término deste estudo pode concluir-se que a taxa de danos genéticos celulares de agricultores expostos ocupacionalmente a pesticidas é significativamente maior que em pessoas do grupo controle, que não trabalham com substâncias tóxicas, o que ficou comprovado pelo teste de micronúcleos e pelo ensaio do cometa.

Além disso, com a aplicação dos questionários foi possível observar que os agricultores não fazem o uso correto dos EPIs recomendados para a pulverização de agrotóxicos, o que pode contribuir para a elevação da taxa de danos genotóxicos. Também verificou-se que a taxa de danos não tem uma relação crescente com a idade do indivíduo, estando relacionados provavelmente a quantidade de agente genotóxicos que cada indivíduo se expõe, da utilização ou não dos EPIs e também da resistência do próprio organismo.

Com a realização da ação de conscientização, foi constatado que os agricultores já tinham um breve conhecimento sobre o risco que correm com a exposição aos pesticidas. Com o repasse de informações realizados na ação de conscientização, estes puderam se tornar de fato conscientes destes riscos, porém notou-se bastante resistência por parte dos mesmos em adotar mudanças em suas práticas de trabalho como o uso completo e indispensável do EPI ao lidar com qualquer quantidade de agrotóxico.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ (ADAPAR). **Agrotóxicos no Paraná**. 2015. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=7>>. Acesso em: 20 jan. 2016.
- AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ (ADAPAR). **Dados sobre comercialização de agrotóxicos**. 2015. Disponível em: <www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSV/Agrotoxicos/RESULTADOS_PUBLICADOS/dados_siagro.xls>. Acesso em: 10 abr. 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Notícias**. 2014. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias.>>. Acesso em: 23 fev. 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Informações técnicas DDT**. 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13>>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; et al. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.
- ANDRADES, T. O.; GAMINI, R. N. Revolução verde e a apropriação capitalista. **Periódico semestral multidisciplinar do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES/JF)**, Juiz de Fora, p. 1-18, 2007. Disponível em: <http://www.cesjf.br/revistas/cesrevista/edicoes/2007/revolucao_verde.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2015.
- ARANHA, R. C. **Potencial de toxicidade dos herbicidas glifosato e imazetapir em *Colossoma macropomum* (pisces)**, 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2013.
- BARROS, J. D. S.; SILVA, M. F. P. Práticas agrícolas sustentáveis como alternativas ao modelo hegemônico de produção agrícola. **Sociedade e desenvolvimento rural**, Brasília v.4, n. 2, p. 89-103, 2010. Disponível em: <<http://www.inagrodf.com.br/revista/index.php/SDR/article/viewFile/81/81>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

BENEDETTI, D.; NUNES, E.; SARMENTO, M.; et al. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 752, n. 1–2, p. 28–33, 2013.

BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: Recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 8, p. 493–512, 2008.

BOSCH, B.; MAÑAS, F.; GORLA, N.; AIASSA, D. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 3, n. 6, p. 155–163, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Organização Pan-americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde. **Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília, 1997. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

BULL, S.; FLETCHER, K.; BOOBIS, A. R.; BATTERSHILL, J. M. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: A review. **Mutagenesis**, v. 21, n. 2, p. 93–103, 2006.

CALDAS, L. Q. A. Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides. **Centro de controle de intoxicações, Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense**, Niterói, 2000.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**. 2. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1962.

CARVALHO, N. L.; PERLIN, R. S.; COSTA, E. C. Tiametoxam em tratamento de sementes. **Monografias Ambientais**, Santa Maria, v. 2, n. 2, p. 158-175, 2011. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/remoa/article/.../1597>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

CARVALHO, M. B.; RAMIRES, A.; GATTÁS, G. J. F.; GUEDES, A. L.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; BARAUNA, J. C.; CURIONI, O. A. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 317-322, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302002000400037>. Acesso em: 01 mar. 2016.

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; et al. The comet assay as a tool for

human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 759, n. 1, p. 27–39, 2014.

COUTINHO, C.; TANIAMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S. TAKAMAYA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v. 15, p. 65-72, 2005. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/pesticidas/article/viewFile/4469/3518>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia molecular: princípios e técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; NEILL, K. L. O. The comet assay : a comprehensive review. **Mutation Research - Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, p. 37–59, 1995.

FALK, J. W.; CARVALHO, L. A.; SILVA, L. R.; PINHEIRO, S. Suicídio e uso de agrotóxicos: consequências do uso de organofosforados? **Relatório Azul**, p. 244–262, 1995.

GANTE, C. R. A. **Respostas dos organismos marinhos à azoxistrobina e à sua formulação comercial Ortiva®**. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015. Disponível em: <<https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/30853>> Acesso em: 29 jun. 2016.

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 - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 469, n. 2, p. 279–285, 2000.

GIRI, S.; GIRI, A.; SHARMA, G. D.; PRASAD, S. B. Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 519, n. 1–2, p. 75–82, 2002.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation research**, v. 518, n. 2, p. 145–50, 2002.

HATAGIMA, A. Polimorfismo genético e metabolismo dos desreguladores endócrinos na suscetibilidade ao câncer. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 357-377, 2002. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102311X2002000200002&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 26 jan. 2016.

HERNANDÉZ, A.; GÓMEZ, A. M.; PÉREZ, V.; GARCÍA-LARIO, J. V.; PENA, G.; GIL, F.; LÓPEZ, O.; RODRIGO, L.; PINO, G.; PLA, A. Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agriculture farmers. **Environmental Reseach**, Amsterdã, v. 102, n. 1, p. 70-76, 2006.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER . World Health Organization. **Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides**, v. 112. 2015. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KOIFMAN, S.; HATAGIMA, A. Exposição aos agrotóxicos e câncer ambiental. **É veneno ou é remédio?** Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/veneno-ou-e-remedio-agrotoxicos-saude-e-ambiente-e-5>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

MALACINSKI, G. M. **Fundamentos de biologia molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MALUF, M.; RIEGEL, S. W. **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MAÑAS, F.; PERALTA, L.; RAVIOLO, J.; OVANDO, H. G.; WEYERS, A.; UGNIA, L. CID, M. G.; LARRIPA, I.; GORLA, N.. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 37-41, 2009.

MATOS, A. K. V. Revolução verde: biotecnologia e tecnologias alternativas. **Cadernos da FUCAMP**, Monte Carmelo, v.10, n.12, p.1-17, 2010.

MONROY, C. M.; CORTÉS, A. C.; SICARD, D. M.; RESTREPO, H. G. DE. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. **Biomédica**, v. 25, p. 335-345, 2005.

NUNES, M. V.; TAJARA, E. H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 372-382, 1998. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101998000400011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 27 jan. 2016.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, P. R. **Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do frontline®) nos ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores**. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

Disponível em:

<<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.427.4834&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

PAIVA, J. C. G. **Biomonitoramento genético de agricultores expostos a pesticidas nos municípios de Tinguá e Ubajara - Ceará**. 2011. 111 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia, Fortaleza, 2011.

POLETTA, G. L.; KLEINSORGE, E.; PAONESSA, A.; MUDRU, M. D.; LARRIERA, A.; SIROSKI, P. A.. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in Caiman latirostris exposed in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 852–859, 2011.

POLETTA, G. L.; LARRIERA, A.; KLEINSORGE, E.; MUDRY, M. D. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup (glyphosate) in broad-snouted caiman (Caiman latirostris) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. **Mutation research**, v. 672, n. 2, p. 95–102, 2009.

R Development Core Team (2016). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

SCHERER, K.; STROHSCHOEN, A. A. G. Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. **Revista Destaques Acadêmicos**, Lajeado, v. 5, n. 3, p. 49-60, 2013.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Paraná atua para reduzir problemas com agrotóxicos**. 2014. Disponível em:

<<http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=5663>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

SILVA, D. C. **Efeitos tóxicos e genéticos ocasionados por agrotóxicos**. 2005. 57 f. Monografia (Especialização em Gestão de Recursos Naturais) - Universidade Do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2005. Disponível em: <<http://www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario/000028/0000283E.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2015.

SILVA, J. M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v.10, n. 4, p. 891-901, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232005000400013>. Acesso em: 25 jan. 2016.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL. **Estatísticas do setor**. 2009. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/estatisticas-do-setor/>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v, 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SOARES, W. L. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura**. 2010. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências e Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010. <Disponível em: http://bvssp.icict.fiocruz.br/pdf/25520_tese_wagner_25_03.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2016.

SOUZA, K. R. **SUÍCIDIO E DESENVOLVIMENTO REGIONAL: Um estudo sócio-econômico da auto-violência nas mesorregiões Oeste e Sudoeste do Paraná de 1990 a 2005**. 2007. 149 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Agronegócio) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2007.

SOUZA-FILHO, J. **Efeitos tóxicos e genotóxicos do herbicida roundup transorb® em guppy (*poecilia reticulata*) submetido a tratamento agudo**. 2011. 159 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. **Manual de coleta de material biológico**. Hospital de São Paulo, São Paulo, 2014.

VALVERDE, M.; ROJAS, E.. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutation Research**, Amsterdã, v. 683, n. 1, p. 93-109, 2009.

APÊNDICE A – Questionário

1) Qual sua idade?

2) Há quantos anos você trabalha com pesticidas?

3) Quantas vezes por ano, em média, você faz aplicação de pesticidas em suas lavouras?

4) Quais os tipos de pesticida que você utiliza?

Herbicida: _____

Fungicida: _____

Inseticida: _____

Outros: _____

5) Você utiliza os equipamentos de proteção quando faz as aplicações de pesticidas?

Quais?

6) Você já sofreu alguma intoxicação pelo uso de agrotóxicos? Quais os sintomas?

Quantas vezes você já passou por isso?

7) Você sofre de alguma doença crônica (doente há mais de três meses, como exemplo, câncer)? Qual?

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CONVITE DE PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA CIENTÍFICA (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)

Prezado(a) Colaborador(a),

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **‘ANÁLISE DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO USO DE PESTICIDAS POR AGRICULTORES DO SUDOESTE DO PARANÁ’**, sob a responsabilidade da professora **Nédia de Castilhos Ghisi** e atuação da aluna **Ana Flavia Marcelino**. Esta pesquisa tem como objetivo verificar danos nas células de pessoas em dois grupos diferentes : agricultores que fazem aplicação de agrotóxicos em suas lavouras, e pessoas que trabalhem em outras áreas. Iremos analisar os possíveis riscos das pessoas dos dois grupos desenvolverem uma doença relacionada a essa exposição aos produtos químicos, comparando os resultados entre os grupos. Para realizar esta pesquisa, precisamos coletar 5 mL de seu sangue e um pouco de sua saliva. Caso você tenha interesse em participar, deve ler este documento inteiro, que tem como objetivo deixá-lo a par da pesquisa. Este documento se chama **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, onde estão descritos todos os procedimentos e informações sobre como será feita a pesquisa, quais são os benefícios e riscos para você e o objetivo deste estudo. Se você estiver de acordo, deve preencher e assiná-lo em duas vias, sendo que uma fica para você e a outra para as pesquisadoras. Qualquer dúvida você tiver, pode questionar as pesquisadoras. Após você estar ciente de tudo que está escrito neste documento, e não tiver mais nenhuma dúvida, e e aceite preencher e assinaras duas vias deste documento, a coleta de sangue e saliva poderá ser iniciada. Com seu consentimento, iremos coletar uma amostra de saliva passando levemente um cotonete dentro de sua boca, encostando na bochecha para que as células sejam coletadas. Já o sangue será coletado pela técnica em enfermagem Maristela Brebatti, utilizando material próprio para a coleta, seringa e agulha novos, que só foram e serão usados por você. A seringa será aberta na sua frente para que não haja dúvidas da limpeza do material. A coleta de sangue pode lhe causar algum desconforto, por isso, você estará acomodado em uma cadeira ou poltrona com apoio para os braços (caso você não disponha de uma cadeira assim em sua casa iremos disponibilizar uma). Em repouso, com o braço apoiado na posição correta, a técnica em enfermagem irá coletar o sangue. Tudo isso para evitar qualquer desconforto que você possa sentir durante a coleta (Em conformidade a resolução 466/2012).

Justificativa do estudo: Doenças como o câncer podem afetar pessoas de todas as idades, independente de seus hábitos de vida. Porém, pessoas que trabalham com produtos químicos como pesticidas podem ser mais facilmente atingidas por esta doença, que se inicia devido a um defeito em uma única célula do nosso corpo, causado por um agente carcinógeno. Um carcinógeno é qualquer substância capaz de promover o câncer como, por exemplo, alguns tipos de pesticidas. Sabe-se que o uso de pesticidas se faz necessário pelo aumento da produção e mecanização das terras agrícolas. Por isso, o estudo que iremos fazer busca identificar se os agricultores tem um maior dano em suas células comparado a pessoas não expostas a essas substâncias químicas, e os riscos que esses danos oferecem a saúde.

- 1. Participação na pesquisa:** Ao participar desta pesquisa você estará auxiliando na construção do conhecimento sobre os danos que pesticidas podem causar aos seres humanos. Se você aceitar participar da pesquisa, e assinar este termo, coletaremos saliva de sua bochecha e uma pequena amostra de sangue como já explicado acima, para estudarmos suas células. Quando os resultados estiverem prontos, mostraremos a você (se desejar). Lembramos que a sua participação é voluntária; você tem a plena liberdade de não querer participar, e pode desistir, em qualquer momento, mesmo após ter confirmado a participação e assinado este documento, sem nenhum prejuízo nem penalização alguma para você.
- 2. Desconfortos, Riscos, Assistência e Benefícios.**
 - a) Desconfortos e ou Riscos:** Você pode sentir algum desconforto pelo uso do cotonete na bochecha para a coleta de suas células. Para coleta de sangue, você pode sentir alguma dor, ou posteriormente apresentar uma leve hemorragia (pequeno sangramento) ou hematoma, mas como já explicamos, a coleta do sangue vai ser feita por uma técnica em enfermagem, e com todos os cuidados necessários. Pode ser que você fique preocupado em caso de confirmação de dano em suas amostras, causando receio de doenças no futuro. Como método de assistência, se for verificado risco físico você será encaminhado ao atendimento médico. Se você sentir-se mal emocionalmente, será encaminhado ao atendimento psicológico. Caso o atendimento médico ou psicológico seja necessário, suas despesas e de seu acompanhante (caso haja necessidade) serão cobertas pelas pesquisadoras, ficando você livre de qualquer prejuízo financeiro devido a participação na pesquisa.
 - b) Benefícios:** Em caso de confirmação de prejuízos causados por pesticidas, constatando-se o risco de perigos a sua saúde, você poderá diminuir sua exposição a estes produtos. Você pode tomar consciência de como é importante usar equipamentos de proteção (EPIs) durante as aplicações de agrotóxicos, ou ainda, buscar alternativas menos agressivas a saúde e ao meio ambiente como o controle biológico de pragas e agricultura orgânica. Além disso, o

conhecimento científico obtido pode ser usado como base para criação de regulamentações de uso dos agrotóxicos, assegurando uma melhor qualidade de vida a todos que trabalham nesta área.

Confidencialidade (Sigilo e Privacidade)

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der em nenhuma das fases da pesquisa. Os resultados da pesquisa poderão ser publicados, mas sem identificar as pessoas que participaram da pesquisa.

3. Critérios de inclusão e exclusão (quem participará ou não da pesquisa)

CRITÉRIO DE INCLUSÃO:

Grupo de interesse: Agricultores homens do Sudoeste do Paraná, acima de 18 anos, que trabalhem na lavoura e estão ocupacionalmente expostos aos pesticidas.

Grupo controle: Homens acima de 18 anos, em bom estado de saúde, e que não manipulem substâncias tóxicas diariamente.

CRITÉRIO DE EXCLUSÃO:

Pessoas que já manifestem doenças crônicas e que sejam fumantes.

4. Ressarcimento ou indenização.

Nem você nem sua família receberá nenhum pagamento financeiro pela participação. Mas qualquer prejuízo ou todo tipo de gasto tido por você, em função da participação neste estudo, serão ressarcido pelos pesquisadores. Os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa lhe garantem a assistência integral gratuita devido a danos diretos/ indiretos e imediatos/ tardios pelo tempo que for necessário. Caso se sinta lesado em algum momento dessa pesquisa, garantiremos seu direito a uma indenização, como explícito na Resolução 466/2012, a qual contém os direitos dos voluntários de pesquisas com humanos.

5. Direito de sair da pesquisa

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser. A participação é voluntária. A escolha de permanecer é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir.

6. Esclarecimentos

Se tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa e/ou dos métodos utilizados na mesma, você pode procurar a qualquer momento os pesquisadores responsáveis, o CONEP ou o CEP, nos contatos abaixo:

Pesquisadores responsáveis:

Nédia de Castilhos Ghisi - Endereço: Rua Elis Regina, nº248, Bairro das Torres, Dois Vizinhos / Paraná

Telefone para contato: (41) 9667-9936, Horário de atendimento: 8:00h às 12:00h

Ana Flavia Marcelino – Endereço: Rua Prudente de Moraes, nº 871, apto 201, Centro Norte, Dois Vizinhos/ Paraná. Telefone (46 88356586) Horário de atendimento: 8:00h às 12:00h

Maristela Brembatti – Endereço: Rua Princesa Isabel, nº 07 – Santo Antônio do Sudoeste/ Paraná. Telefone (046 99084953)

Horário de atendimento: 8:00h às 12:00h

Local de realização da pesquisa: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos

Endereço, telefone do local: Estrada para Boa Esperança, Km 04, comunidade São Cristóvão. Telefone (46)3536-8414, das 14-18h, e das 19-23h.

Comitê de Ética em Pesquisa (**CEP**) para recurso, dúvidas ou reclamações na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEP/UTFPR):

O **CEP** é um colegiado interdisciplinar e independente, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos, com objetivo de defender os interesses dos participantes das pesquisas, zelando pelos seus direitos e dignidade, e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Contribui ainda para a valorização do pesquisador que recebe o reconhecimento de que sua proposta é eticamente adequada. Na UTFPR, o CEP está localizado na Rua Desembargador Westphalen, 637, 4 Andar. Bloco J1. Telefones para contato (41) 3310-4943 (41) 3310-484, e-mail: coep@utfpr.edu.br Com horário de funcionamento na Segunda, Quarta, Quinta e Sexta-Feira: 7h às 13h. (Período da Manhã) Terça-Feira: 13h às 18h (Período da Tarde).

Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) está diretamente ligada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS). Ela foi criada pela Resolução do CNS 196/96 como uma instância colegiada, de natureza consultiva, educativa e formuladora de diretrizes e estratégias no âmbito do Conselho. Além disso, é independente de influências corporativas e institucionais. A CONEP tem como principal atribuição o exame dos aspectos éticos das pesquisas que envolvem seres humanos. Como missão, elabora e atualiza as diretrizes e normas para a proteção dos sujeitos de pesquisa e coordena a rede de Comitês de Ética em Pesquisa das instituições. Cabe a CONEP avaliar e acompanhar os protocolos de pesquisa em áreas temáticas especiais como: genética e reprodução humana; novos equipamentos; dispositivos para a saúde; novos procedimentos; população indígena; projetos ligados à biossegurança e como participação estrangeira. A CONEP também se constitui em instância de recursos para qualquer das áreas envolvidas. A CONEP está localizado em Brasília (DF) no bairro Asa Norte, 510 norte, bloco A 3º andar, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde. CEP : 70.750-521 Telefone:(61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

7. Acesso aos resultados

Quando seus resultados estiverem prontos, você pode ser chamado para que estes sejam mostrados e explicados a você. Marque com um X na opção que você deseja:

() Desejo saber meu resultado, obtendo todas as informações que provém dele.

() Não desejo saber meu resultado.

Caso você queira saber seu resultado, ele será apresentado a você de maneira individual. Se estudo confirmar a presença de danos em suas células, iremos lhe informar sobre como você pode evitar continuar se expondo aos agentes que causam estas lesões.

8. Destino das amostras

As amostras de saliva e sangue que você nos forneceu serão armazenadas até a publicação dos resultados. Após isto, estas serão destruídas. Não haverá possibilidade de utilização das amostras para estudos futuros.

- 9. CONCORDÂNCIA NA PARTICIPAÇÃO:** Se você estiver de acordo em participar, de livre espontânea vontade, deverá preencher duas vias deste documento Termo de Consentimento Pós-Esclarecido e assiná-las. Uma via ficará retida com as pesquisadoras responsáveis e você receberá a outra, para consulta em caso de dúvidas.

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Pelo presente instrumento, que atende às exigências legais, o Sr. _____
_____, portador(a) da cédula de identidade

_____, declara que, após leitura minuciosa deste TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas, esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores, está ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido. Após reflexão e um tempo razoável, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, eu decidi firmar o CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em participar voluntariamente desta pesquisa.

Estou consciente que posso deixar o projeto a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

E, por estar de acordo, assina o presente termo.

Nome

completo: _____

RG: _____ Data de Nascimento: ___/___/_____

Telefone: _____

Endereço: _____

CEP: _____ Cidade: _____ Estado:

Assinatura:

Eu declaro ter apresentado o estudo, explicado seus objetivos, natureza, riscos e benefícios e ter respondido da melhor forma possível às questões formuladas.

Assinatura pesquisador: _____ Data: ___/___/_____

(ou seu representante)

Nome

completo: _____

ANEXO A – Parecer Consubstanciado emitido pelo CEP

UNIVERSIDADE
TECNOLÓGICA FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do potencial genotóxico do uso de pesticidas por agricultores do sudoeste do Paraná

Pesquisador: Nédia de Castilhos Ghisi

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 53712616.6.0000.5547

Instituição Proponente: Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.585.474

Apresentação do Projeto:

Introdução

De acordo com as pesquisadoras, no Brasil, assim como em outros países, a agricultura evoluiu com o passar dos anos, devido a necessidade de aumento na produção de alimentos no mundo. Com o advento da agricultura, após a chamada “Revolução Verde”, os produtores agrícolas precisaram modernizar suas práticas, através da mecanização das terras e principalmente com o uso de pesticidas orgânicos. A diversidade de produtos químicos destinados ao controle de pragas na agricultura é enorme, e os agricultores fazem uso destes constantemente. O problema é que muitas vezes, diferentes produtos são usados ao mesmo tempo, a pulverização é feita sem equipamentos de proteção individual, e os agricultores acabam se expondo de forma ocupacional a essas substâncias. O presente trabalho busca verificar a ocorrência de danos citológicos em agricultores expostos ocupacionalmente aos agroquímicos em comparação com pessoas de outras profissões que não utilizem substâncias tóxicas (grupo controle). Esse estudo será realizado com um grupo de 40 pessoas, sendo 20 agricultores e 20 do grupo controle. As técnicas empregadas para análise dos danos citológicos serão o ensaio do cometa e o teste de micronúcleos, utilizando células da mucosa oral e de sangue.

Endereço: SETE DE SETEMBRO 3165

Bairro: CENTRO

CEP: 80.230-901

UF: PR **Município:** CURITIBA

Telefone: (41)3310-4494

E-mail: coep@utfpr.edu.br

Continuação do Parecer: 1.585.474

Metodologia

De acordo com as pesquisadoras, após aprovação do projeto no CEP-UTFPR, terá início a busca prospectivas nas comunidades rurais e contato com agricultores do sudoeste do PR, que utilizam pesticidas e estão expostos ocupacionalmente a estes produtos. Os mesmos serão convidados a participar da pesquisa, responderão a um breve questionário (anexo 01), sobre as atividades desenvolvidas. Também serão abordadas pessoas da região sudoeste do Paraná, que não tenham contato com pesticidas em seus trabalhos, para servirem como grupo controle. Ensaio do Cometa: Será utilizado sangue periférico coletado por uma profissional técnica em enfermagem, através de venopunção no membro superior, utilizando equipamentos novos e estéreis e adotando os critérios de antisepsia indicados pelo Manual de Coleta de Material Biológico (UNIFESP, 2015). O material coletado será acondicionado em tubos com anticoagulante (EDTA), envoltos por papel alumínio, para evitar qualquer tipo de alteração. Após a coleta, as amostras serão armazenadas em geladeira a 4°C, onde será adicionada uma alíquota de 5 µl de sangue com 75 µl de agarose de baixo ponto de fusão 0,75%, a uma temperatura de 37°C em banho-maria e espalhadas em lâminas de microscopia pré-cobertas com agarose padrão 1,4%. Em seguida, estas lâminas serão cobertas com uma lamínula e armazenadas em geladeira. Após a solidificação, as lamínulas serão removidas e as lâminas armazenadas em cubetas de vidro apropriadas protegidas da luz e já com solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO), onde as lâminas ficaram de duas horas até duas semanas. Posteriormente, as lâminas serão colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese, cobertas com tampão de eletroforese (300 mM NaOH e 1 mM EDTA), onde ficarão em descanso por 30 minutos e protegidas da luz. Após, será realizada eletroforese em condições alcalinas (pH >13) a 25V e uma corrente de 300 mA por 15 minutos. A cuba da eletroforese estará envolta por gelo para manter a temperatura de 4°C e ao abrigo da luz. Após a eletroforese, as amostras serão cobertas com o tampão TRIS (0,4 M Tris pH 7,5), para serem neutralizadas por cinco minutos (3x). Em seguida, lavadas 2X em água destilada e secas em temperatura ambiente. As lâminas serão colocadas por 10 minutos em solução fixadora, sendo lavadas três vezes em água destilada. Em seguida serão colocadas em estufa para secagem. Elas serão hidratadas por cinco minutos em água destilada. As lâminas serão coradas com brometo de etídeo e observadas em microscópio de epifluorescência. Para cada pessoa, serão analisados 100 nucleóides, usando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA, seguindo as classes: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) 3 (dano extenso), 4 (dano máximo, apoptose). O escore será calculado multiplicando o número de núcleos encontrado em dada classe pelo número da classe. Teste de micronúcleo: O protocolo

Endereço: SETE DE SETEMBRO 3165

Bairro: CENTRO

CEP: 80.230-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3310-4494

E-mail: coep@utfpr.edu.br

Continuação do Parecer: 1.585.474

utilizado será baseado em Benedetti et al. (2013). Células de mucosa oral serão obtidas por esfregaço da bochecha dos indivíduos, com um cotonete, que será imerso em Tampão em um microtubo e transportado sob refrigeração para o laboratório. A solução será centrifugada a 1300 rpm por 8 minutos. O sobrenadante será retirado e o sedimento de células será lavado duas vezes com solução Salina (0,9% w/v de NaCl). Por último, será centrifugado com fixador Carnoy sob as mesmas condições de centrifugação. A suspensão será pingada sobre uma lâmina e seca ao ar a temperatura ambiente. As lâminas serão coradas com Giemsa 2% por 10 min, lavadas em água destilada e secas ao ar. Para cada indivíduo a frequência de células com núcleos alterados será contada em um total de 1.000 células. Serão avaliados a formação de micronúcleos e alterações na morfologia do núcleo sob microscópio em ampliação de 1000 vezes. Os escores do ensaio cometa e as taxas de dano obtidas no teste do micronúcleo serão planilhadas e submetidos a teste cabíveis.

De acordo com as pesquisadoras:

CRITÉRIO DE INCLUSÃO:

Grupo de interesse: Agricultores homens do Sudoeste do Paraná, acima de 18 anos, que trabalhem na lavoura e estão ocupacionalmente expostos aos pesticidas.

Grupo controle: Homens acima de 18 anos, em bom estado de saúde, e que não manipulem substâncias tóxicas diariamente.

CRITÉRIO DE EXCLUSÃO:

Pessoas que já manifestem doenças crônicas e que sejam fumantes.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com as pesquisadoras:

Objetivo primário

Avaliar o risco ocupacional ao qual estão expostos agricultores que trabalham constantemente com agrotóxicos, quando comparados a pessoas que não fazem uso destes produtos em seus trabalhos.

Objetivos secundários

- Realizar o ensaio do cometa com as células coletadas dos agricultores e de pessoas que não

Endereço: SETE DE SETEMBRO 3165

Bairro: CENTRO

CEP: 80.230-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3310-4494

E-mail: coep@utfpr.edu.br

Continuação do Parecer: 1.585.474

trabalham com agrotóxicos;

- Realizar o teste do micronúcleo com as células coletadas dos agricultores e de pessoas que não trabalham com agrotóxicos
- Comparar os resultados de agricultores e pessoas do grupo controle.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com as pesquisadoras:

Riscos:

Possivelmente alguma lesão causada pelo cotonete no esfregaço na cavidade bucal durante a coleta de células. Para coleta de sangue, o indivíduo pode sentir alguma dor, ou posteriormente apresentar uma leve hemorragia. Para minimizar estes riscos, a coleta de sangue será feita por um profissional capacitado. É possível também que haja constrangimento e situações emotivas em caso de confirmação de danos nas células do indivíduo pesquisado, causando receio de doenças como o câncer. Como método de assistência, se for verificado risco físico o sujeito da pesquisa será encaminhado ao atendimento médico. Se o risco emocional for constatado, o participante da pesquisa será encaminhado ao atendimento psicológico.

Benefícios:

Em caso de confirmação da hipótese, constatando-se o risco iminente de efeitos tóxicos e perda na qualidade de vida, os agricultores poderão, minimizar sua exposição aos pesticidas. Poderão também se conscientizar quanto a importância do uso de EPIs durante as aplicações de agrotóxicos, ou ainda, buscar alternativas menos agressivas a vida humana e ao meio ambiente como o controle biológico de pragas e agricultura orgânica. Além disso, o conhecimento científico obtido pode ser usado com base para criação de regulamentações de uso dos agrotóxicos, assegurando uma melhor qualidade de vida aos agricultores.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta caráter relevante para o meio científico.

A presente proposta é de grande importância uma vez que contribuirá para o esclarecimento da importância do uso de EPIs na lavoura pela população de agricultores.

Endereço: SETE DE SETEMBRO 3165

Bairro: CENTRO

CEP: 80.230-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3310-4494

E-mail: coep@utfpr.edu.br

Continuação do Parecer: 1.585.474

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto e o TCLE atendem a Resolução CNS 466/12.

Recomendações:

Submeter o projeto para apreciação pelo CONEP, uma vez que o mesmo é o responsável por avaliar, e acompanhar os protocolos de pesquisa em áreas temáticas especiais como: genética e reprodução humana; novos equipamentos; dispositivos para a saúde; novos procedimentos; população indígena; projetos ligados à biossegurança e como participação estrangeira.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Ver item recomendações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento das atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-UTFPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_663742.pdf	01/06/2016 19:34:44		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ANA_FLAVIA_versaoparaCONEP.docx	01/06/2016 19:32:38	Nédia de Castilhos Ghisi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TCC_ANA_FLAVIA_versao_04.docx	01/06/2016 19:31:21	Nédia de Castilhos Ghisi	Aceito
Outros	Anexo_01_Questionario.doc	16/03/2016 15:01:45	Nédia de Castilhos Ghisi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autoriza_direcao.pdf	01/03/2016 15:13:59	Nédia de Castilhos Ghisi	Aceito

Endereço: SETE DE SETEMBRO 3165

Bairro: CENTRO

CEP: 80.230-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3310-4494

E-mail: coep@utfpr.edu.br

UNIVERSIDADE
TECNOLÓGICA FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 1.585.474

Folha de Rosto	folharosto.pdf	01/03/2016 15:12:54	Nédia de Castilhos Ghisi	Aceito
----------------	----------------	------------------------	-----------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

CURITIBA, 11 de Junho de 2016

Assinado por:
Frieda Saicla Barros
(Coordenador)

Endereço: SETE DE SETEMBRO 3165

Bairro: CENTRO

UF: PR

Telefone: (41)3310-4494

Município: CURITIBA

CEP: 80.230-901

E-mail: coep@utfpr.edu.br

ANEXO B – Parecer Consubstanciado emitido pelo CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do potencial genotóxico do uso de pesticidas por agricultores do sudoeste do Paraná

Pesquisador: Nédia de Castilhos Ghisi

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 4

CAAE: 53712616.6.0000.5547

Instituição Proponente: Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.596.757

Apresentação do Projeto:

No documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_663742.pdf" postado em 01/06/2016, lê-se:

INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos no Brasil e no mundo se tornou uma prática comum e necessária com o advento da agricultura, na chamada "Revolução Verde", um amplo programa para elevar a produção agrícola no mundo. Segundo a literatura, as práticas agricultáveis cada vez mais modernas e mecanizadas, visando sempre maior produção e lucro são um dos objetivos desta revolução verde. O aumento da produção demanda rapidez e agilidade no extermínio de pragas, sejam elas vegetais ou animais, que possam comprometer a produção. Com base nas necessidades atuais de alta produtividade e agilidade, o desenvolvimento de agrotóxicos capazes de tornar o processo de produção mais eficiente tornou-se um negócio de proporções gigantescas, com o grande crescimento de empresas químicas que produzem estes químicos. Um dos agrotóxicos mais usados no Brasil, o glifosato, do grupo químico Glicina, é um potente herbicida não seletivo, capaz de matar rapidamente as plantas monocotiledôneas. Porém, por sua não seletividade, tem potencial para matar também as plantas que estão sendo cultivadas. Para

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.596.757

contornar este problema, a agricultura contou com as técnicas de genética molecular de transgenia, que por meio de alterações genéticas nos cultivares os torna resistente a determinados agentes químicos como o glifosato, permitindo a aplicação do herbicida durante a estação de crescimento. Em 2015, a IARC (Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer), agência especializada em câncer da Organização Mundial da Saúde (OMS), avaliou a carcinogenicidade em cinco pesticidas organofosforados, entre eles, o glifosato. A agência classificou o glifosato, ingrediente do herbicida mais usado no Brasil e no mundo, como provável carcinógeno em humanos, devido a evidências de estudos realizados desde 2001 nos Estados Unidos, Canadá e Suécia sobre a exposição ocupacional agrícola ao componente químico. Após esta nota da IARC, a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), comprometeu-se a fazer uma reavaliação toxicológica do ingrediente ativo. Além dos herbicidas, outros agrotóxicos são também utilizados em larga escala na agricultura, como inseticidas e fungicidas, e geralmente são considerados mais tóxicos que os primeiros. Um exemplo de inseticida é o Fipronil, pertence a classe dos fenilpirazóis. Segundo a literatura, o Fipronil atua no sistema nervoso central do inseto inibindo o receptor do ácido gama aminobutírico (GABA). O sistema receptor-GABA, responsável pela inibição da atividade neural anormal, previne o estímulo excessivo dos nervos. O Fipronil bloqueia o receptor promovendo hiperexcitação neural e morte do indivíduo. Em mamíferos, como os roedores utilizados em diversas pesquisas às quais os químicos devem ser submetidos para avaliar seus efeitos antes de qualquer atividade humana, o fipronil apresentou-se como de alto potencial carcinogênico. Um inseticida comumente utilizado pelos agricultores do sudoeste do Paraná é o Tiametoxam, de efeito sistêmico de contato e ingestão. Pertence ao grupo químico: neonicotinóide e piretróide (ADAPAR). O inseticida Tiametoxam possui por características, o amplo espectro de ação sobre insetos-praga, a baixa taxa de aplicação no campo, a excelente translocação na planta e, uma segurança ambiental favorável, em função de doses de aplicação relativamente baixas. Seu mecanismo de ação é semelhante ao do Fipronil, causando colapso no sistema nervoso do inseto. Os piretróides, bem como organofosforados são projetados para bloquear a neurotransmissão em insetos e não ser genotóxicos, porém, estudos comprovaram através do ensaio do cometa e outros testes citológicos o potencial genotóxico dos mesmos em pessoas expostas ocupacionalmente. Além de herbicidas e inseticidas, os agricultores também conta com os fungicidas. Na região sudoeste do Paraná, um fungicida utilizado é a Azoxistrobina, grupo químico da Estrubirulina. A Azoxistrobina tem ação de contato e sistêmico sobre os fungos. A Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR) estabelece normas, padrões e procedimentos, que determinam a adoção das medidas de prevenção e preservação e contribuem para a sanidade da produção agropecuária

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conept@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.596.757

paranaense. É esta agência que regulamenta os agrotóxicos que podem ser usados no Paraná. No site da ADAPAR (<http://www.adapar.pr.gov.br/>) é possível encontrar quais produtos estão liberados para utilização no Estado além da bula dos agrotóxicos, que apresenta as informações técnicas sobre os produtos. Quando pesquisado no site da ADAPAR, são encontrados 49 agrotóxicos do tipo herbicida que tem como composto ativo o Glifosato, sendo que pelo menos 13 tem alguma restrição de uso. Também são permitidos no Paraná 26 inseticidas a base do ingrediente ativo Fipronil, e 22 do ingrediente ativo Tiametoxam. Na classe dos fungicidas são permitidos 21 produtos a base de Azoxistrobina no Estado. Ainda segundo a ADAPAR, no ano de 2015, foram comercializadas cerca de 100 mil toneladas de pelo menos 253 diferentes ativos de agrotóxicos no Paraná. As vendas do herbicida glifosato correspondem a 13,20% do total de pesticidas comercializados na região sudoeste do Paraná, já as vendas do inseticida fipronil totalizam 0,49%, e tiametoxam 0,20%. Por fim o fungicida azoxistrobina totaliza 1,51% das vendas na região. Diante desses e mais uma enorme lista de produtos agroquímicos capazes de combater as “pragas” da agricultura, os produtores rurais veem nestes a oportunidade de otimizar sua produção, elevando o rendimento nas colheitas, reduzindo perdas e conseqüentemente maximizando lucros. Além disso, a agilidade de extermínio de ervas daninha, por exemplo, são mais cômodas aos produtores do que embrenhar-se no meio da plantação para capiná-las, como acontecia antes da “Revolução Verde”. Para alguns autores, sob o ponto de vista estritamente econômico, na ótica privada do agricultor, vale a pena comprar e utilizar o agrotóxico quando o seu custo encontra-se menor do que o benefício esperado na produção. Esta prática está presente também nas pequenas propriedades rurais de agricultura familiar do Sudoeste do Paraná. Em 2008, o Brasil tornou-se o principal mercado consumidor de agrotóxicos, ficando à frente dos EUA, consumindo 733,9 milhões de toneladas. Para alguns autores, este volume pode ser considerado como um verdadeiro “tsunami” na agricultura brasileira, embora os danos à saúde e, conseqüentemente, os socioeconômicos ainda se encontram “invisíveis” perante a sociedade em geral. Segundo a SEAB (Secretaria da Agricultura e do Abastecimento), anualmente, o Paraná registra em média 1,3 mil casos de intoxicações agudas por agrotóxicos. Outro tipo comum de intoxicação é a crônica, que acontece a partir de uma longa exposição a um determinado produto. As maiores vítimas são os trabalhadores rurais que desenvolvem problemas de saúde de maneira gradativa e silenciosa. É sobre os possíveis danos a saúde causados por esta enxurrada de agrotóxicos no país que o presente projeto busca tratar, mais especificamente nos riscos para os agricultores que trabalham constantemente com os defensivos, manuseando e aplicando em suas lavouras. Busca-se entrar neste campo de estudo, fazendo análises do potencial de toxicidade de

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.596.757

pesticidas causado por exposição crônica de agricultores da região Sudoeste do Paraná. Pretende-se analisar danos crônicos citotóxicos em agricultores que se expõem ocupacionalmente aos agrotóxicos há pelo menos 10 anos, comparando às análises de indivíduos não expostos diretamente aos agroquímicos.

HIPÓTESE

Será possível identificar maior efeito tóxicos e danosos ao material celular, nas células de indivíduos que usam agrotóxicos constantemente, constatando assim um risco ocupacional.

METODOLOGIA

Após aprovação do projeto no CEP-UTFPR, terá início a busca prospectivas nas comunidades rurais e contato com agricultores do sudoeste PR, que utilizam pesticidas e estão expostos ocupacionalmente a estes produtos. Os mesmos serão convidados a participar da pesquisa, responderão a um breve questionário, sobre as atividades desenvolvidas. Também serão abordadas pessoas da região sudoeste do Paraná, que não tenham contato com pesticidas em seus trabalhos, para servirem como grupo controle. Ensaio do Cometa: Será utilizado sangue periférico coletado por uma profissional técnica em enfermagem, através de venopunção no membro superior, utilizando equipamentos novos e estéreis e adotando os critérios de antisepsia indicados pelo Manual de Coleta de Material Biológico. O material coletado será acondicionado em tubos com anticoagulante (EDTA), envoltos por papel alumínio, para evitar qualquer tipo de alteração. Após a coleta, as amostras serão armazenadas em geladeira a 4°C, onde será adicionada uma alíquota de 5 µl de sangue com 75 µl de agarose de baixo ponto de fusão 0,75%, a uma temperatura de 37°C em banho-maria e espalhadas em lâminas de microscopia pré-cobertas com agarose padrão 1,4%. Em seguida, estas lâminas serão cobertas com uma laminula e armazenadas em geladeira. Após a solidificação, as laminulas serão removidas e as lâminas armazenadas em cubetas de vidro apropriadas protegidas da luz e já com solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO), onde as lâminas ficaram de duas horas até duas semanas. Posteriormente, as lâminas serão colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese, cobertas com tampão de eletroforese (300 mM NaOH e 1 mM EDTA), onde ficarão em descanso por 30 minutos e protegidas da luz. Após, será realizada eletroforese em condições alcalinas (pH >13) a 25V e uma corrente de 300 mA por 15 minutos. A cuba da eletroforese estará envolta por gelo para manter a temperatura de 4°C e ao abrigo da luz. Após a eletroforese, as amostras serão cobertas com o tampão TRIS (0,4 M Tris pH 7,5), para serem neutralizadas por

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.596.757

cinco minutos (3x). Em seguida, lavadas 2X em água destilada e secas em temperatura ambiente. As lâminas serão colocadas por 10 minutos em solução fixadora, sendo lavadas três vezes em água destilada. Em seguida serão colocadas em estufa para secagem. Elas serão hidratadas por cinco minutos em água destilada. As lâminas serão coradas com brometo de etídeo e observadas em microscópio de epifluorescência. Para cada pessoa, serão analisados 100 nucleoides, usando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA, seguindo as classes: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) 3 (dano extenso), 4 (dano máximo, apoptose). O escore será calculado multiplicando o número de núcleos encontrado em dada classe pelo número da classe. Teste de micronúcleo: Células de mucosa oral serão obtidas por esfregaço da bochecha dos indivíduos, com um cotonete, que será imerso em Tampão em um microtubo e transportado sob refrigeração para o laboratório. A solução será centrifugada a 1300 rpm por 8 minutos. O sobrenadante será retirado e o sedimento de células será lavado duas vezes com solução Salina (0,9% w/v de NaCl). Por último, será centrifugado com fixador Carnoy sob as mesmas condições de centrifugação. A suspensão será pingada sobre uma lâmina e seca ao ar a temperatura ambiente. As lâminas serão coradas com Giemsa 2% por 10 min, lavadas em água destilada e secas ao ar. Para cada indivíduo a frequência de células com núcleos alterados será contada em um total de 1.000 células. Serão avaliados a formação de micronúcleos e alterações na morfologia do núcleo sob microscópio em ampliação de 1000 vezes. Os escores do ensaio cometa e as taxas de dano obtidas no teste do micronúcleo serão planilhadas e submetidos a teste cabíveis.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar o risco citotóxico ao qual estão expostos agricultores que trabalham constantemente com agrotóxicos, quando comparados a pessoas que não fazem uso destes produtos em seus trabalhos.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Realizar o ensaio do cometa com as células coletadas dos agricultores e de pessoas que não trabalham com agrotóxicos;
- Realizar o teste do micronúcleo com as células coletadas dos agricultores e de pessoas que não trabalham com agrotóxicos
- Comparar os resultados de agricultores e pessoas do grupo controle.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.596.757

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Não se aplica.

BENEFÍCIOS

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto que visa avaliar os danos nas células de indivíduos que trabalham frequentemente manipulando pesticidas, em comparação com indivíduos que não têm exposição ocupacional a estes produtos (grupo controle).

No documento intitulado "Justificativa_Envio_CONEP_1.pdf", emitido pelo CEP em 11/06/2016, lê-se: "Projeto deve passar por apreciação pelo CONEP, uma vez que envolve pesquisa na área de genética e reprodução humana."

Embora o estudo esteja relacionado à Genética Humana, o protocolo não se enquadra em nenhuma Área Temática Especial que pressuponha análise da CONEP.

Dessa forma, a CONEP não procederá com a análise do projeto de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, a CONEP entende que o protocolo de pesquisa não se enquadra em nenhuma Área Temática (considerando as informações do item IX.4 da Resolução CNS nº 466 de 2012), não cabendo a sua análise ética à CONEP, mas somente ao CEP.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep - delibera pela devolução do protocolo de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, por não se enquadrar em nenhuma das áreas temáticas descritas no item IX.4 da Resolução CNS nº 466 de 2012.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.596.757

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_663742.pdf	01/06/2016 19:34:44		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ANA_FLAVIA_versaoparaCONEP.docx	01/06/2016 19:32:38	Nêdia de Castilhos Ghisi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TCC_ANA_FLAVIA_versao_04.docx	01/06/2016 19:31:21	Nêdia de Castilhos Ghisi	Aceito
Outros	Anexo_01_Questionario.doc	16/03/2016 15:01:45	Nêdia de Castilhos Ghisi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autoriza_direcao.pdf	01/03/2016 15:13:59	Nêdia de Castilhos Ghisi	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	01/03/2016 15:12:54	Nêdia de Castilhos Ghisi	Aceito

Situação do Parecer:

Devolvido

BRASILIA, 18 de Junho de 2016

Assinado por:
Gabriela Marodin
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br