

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SERGIO AROUCA  
SAÚDE PÚBLICA E MEIO AMBIENTE - TOXICOLOGIA

Título:

Genotoxicidade em floricultores da região serrana do Rio de Janeiro: Uso do teste de micronúcleo na mucosa oral

Aluna: Lyssa Hoshi

Orientadores (em ordem alfabética): Ana Rosa Linde Arias

Armando Meyer

Frederico Peres

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SERGIO AROUCA  
SAÚDE PÚBLICA E MEIO AMBIENTE - TOXICOLOGIA

Título:

Genotoxicidade em floricultores da região serrana do Rio de Janeiro: Uso do teste de micronúcleo na mucosa oral

Trabalho de dissertação com fins de obtenção do título de mestre em Saúde Pública e Meio Ambiente, subárea de toxicologia, realizado na Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz.

Data de defesa:

Aluna: Lyssa Hoshi

Orientadores (em ordem alfabética): Ana Rosa Linde Arias

Armando Meyer

Frederico Peres

2009

## **Agradecimentos**

Para não incorrer em injustiças, não citarei nomes. Entretanto, tenho certeza que cada um de vocês sabe o quanto contribuiu para a realização deste trabalho. Agradeço de coração cada um que me ajudou na confecção, apoiou e acreditou. Sem dúvidas, muitas pessoas foram fundamentais, mas todas, sem exceção, são partes deste projeto, que hoje se encontra realizado na forma de dissertação.

À todos, o meu profundo agradecimento: Muito obrigada!

## Resumo

Este trabalho avaliou os possíveis efeitos genotóxicos dos agrotóxicos na população floricultora de Nova Friburgo/RJ através do teste de micronúcleo de células exfoliativas da mucosa oral. A população exposta ocupacionalmente e não-ocupacionalmente aos agrotóxicos, composta por 80 indivíduos, participou preenchendo um questionário e fornecendo amostras celulares do epitélio bucal. As lâminas foram tratadas seguindo a metodologia Feulgen-Fastgreen, codificadas e avaliadas quanto a presença de micronúcleo (MN), *broken egg* (BE), binucleação (Bi) e fragmentação (Fr). Não foi encontrada diferença significativa entre expostos e não-expostos ocupacionais. A frequência média das anormalidades nucleares desta população foi MN:  $0,08 \pm 0,1$ ; BE:  $0,05 \pm 0,14$ ; Bi:  $0,86 \pm 0,57$ ; Fr:  $0,05 \pm 0,11$ . Não houve nenhum tipo de associação entre a frequência de micronúcleos e as variáveis fumo, bebida, sexo, idade, tempo de exposição e dieta, porém, verificou-se que o fato de as pessoas sentirem cheiro de agrotóxicos em sua casa, independente de trabalhar ou não com os agrotóxicos, apresentou uma concentração maior de MN com p-valor de 0,05. A utilização de equipamento de proteção individual diminuiu ligeiramente (ausência de significância) a frequência de MN entre os expostos. A diversidade de agrotóxicos que os trabalhadores manipulam, a ausência de um grupo controle adequado, predisposição genética, diferenças nos graus e rotas de exposição, utilização de EPI de forma adequada, são fatores comuns que dificultaram uma análise de genotoxicidade neste estudo. Desta maneira, maiores investigações são necessárias para melhor compreensão da saúde desta população.

**Palavras chave:** micronúcleo, agrotóxicos, genotoxicidade, floricultores, trabalhador rural

## Abstract

This study analyzed possible genotoxic effects of pesticides in a flower producer's population of Nova Friburgo municipality, Rio de Janeiro State, through micronucleus test in exfoliative cells of the oral mucosa. The participants exposed occupationally and non-occupationally to pesticides, comprising 80 individuals, took part in the study filling out a structured questionnaire and providing samples of the oral epithelium. Slides were processed following the Feulgen-Fastgreen method, coded and analyzed for the presence of micronucleus (MN), broken egg (BE), bi-nucleation (Bi) and fragmentation (Fr). There was no significant difference between direct and non-exposed occupational individuals. The average frequency of nuclear abnormalities of this population was MN:  $0.08 \pm 0.1$ , BE:  $0.05 \pm 0.14$ , Bi:  $0.86 \pm 0.57$ ; Fr:  $0.05 \pm 0.11$ . There was any kind of association between the frequency of micronuclei and smoke, drink, sex, age, exposure time and diet variables. However, people who detected smell of pesticides in their homes, regardless of using or not pesticides in their work, showed a higher concentration of MN with p-value of 0.05. The use of personal protective equipment reduces slightly (but it is not significant) the frequency of MN between the exposed. The diversity of pesticides manipulated by workers, the lack of an appropriate control group, genetic predisposition, differences in exposure degrees and routes, appropriate use of PPE, are common factors that hampered a genotoxic analysis in this study. In this way, more investigations are necessary to better comprehend this population's health.

**Keyword:** micronucleus, pesticides, genotoxicity, flower producers, rural workers

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| Agradecimentos                             | 03 |
| Resumo                                     | 04 |
| Abstract                                   | 05 |
| Lista de tabela, figura e quadro           | 07 |
| Lista de abreviaturas                      | 08 |
| 1.0 - Introdução                           | 09 |
| 1.1 - Agrotóxicos                          | 10 |
| 2.0 - Impactos sobre a saúde               | 13 |
| 2.1 - Casos de Intoxicação                 | 13 |
| 2.2 - Efeitos Crônicos                     | 14 |
| 2.3 – Genotoxicidade dos agrotóxicos       | 15 |
| 3.0 - Justificativa                        | 17 |
| 3.1 - Agrotóxicos utilizados no Brasil     | 17 |
| 3.2 - Teste de Micronúcleo                 | 18 |
| 3.3 - Agrotóxicos e o Teste de Micronúcleo | 20 |
| 4.0 - Objetivos                            | 21 |
| 4.1 - Objetivo Geral                       | 21 |
| 4.2 - Objetivos Específicos                | 21 |
| 5.0 - Materiais e Métodos                  | 22 |
| 5.1 - Desenho de estudo                    | 22 |
| 5.2 - Caracterização do local              | 22 |
| 5.3 - Populações de estudo e comparação    | 23 |
| 5.4 - Coleta de informações                | 23 |
| 5.5 - Teste de Micronúcleo                 | 23 |
| 5.6 - Análise Estatística                  | 25 |
| 6.0 - Resultados                           | 26 |
| 6.1 – Frequência de danos citogenéticos    | 26 |
| 6.2 – Análise das médias                   | 28 |
| 6.3 – Danos Citogenéticos e variáveis      | 30 |
| 6.4 – Agrotóxicos mais utilizados          | 35 |
| 6.5 – Imagens das células                  | 36 |
| 7.0 - Discussão                            | 38 |
| 8.0 - Conclusão                            | 42 |
| 9.0 - Referências Bibliográficas           | 43 |

## Lista de Tabela

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Números de casos registrados de intoxicação humana por agrotóxicos              | 14 |
| Tabela 2: Característica do grupo estudado  | 26 |
| Tabela 3: Análise de variância Kruskal-Wallis de micronúcleos entre os diferentes grupos  | 30 |
| Tabela 4: Comparação da frequência de MN/100 células entre homens e mulheres              | 33 |
| Tabela 5: Levantamento dos agrotóxicos utilizados pelos floricultores de Nova friburgo/RJ | 36 |

## Lista de Figura

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Células da mucosa oral humana  | 19 |
| Figura 2: Esquema ilustrativo do município de Nova Friburgo  | 22 |
| Figura 3: Frequência de micronúcleos num total de 80 indivíduos analisados                         | 26 |
| Figura 4: Frequência de <i>Broken egg</i> num total de 80 indivíduos analisados                    | 27 |
| Figura 5: Frequência de células binucleadas num total de 80 indivíduos                             | 27 |
| Figura 6: Frequência de células com núcleo fragmentado num total de 80 indivíduos                  | 28 |
| Figura 7: Média da frequência relativa de micronúcleos e seus desvios-padrão                       | 29 |
| Figura 8: Dispersão da frequência de MN/100 por horas de trabalho                                  | 30 |
| Figura 9: Frequência de MN/100 por tempo de exposição (anos)                                       | 30 |
| Figura 10: Frequência de danos citogenéticos para as variáveis fumo e exposição ao agrotóxico      | 31 |
| Figura 11: Distribuição da frequência de MN/100 células segundo a idade                            | 32 |
| Figura 12: Média de frequência de MN/100 células segundo o sexo                                    | 32 |
| Figura 13: Danos citogenéticos presentes segundo fumo e bebida                                     | 33 |
| Figura 14: Média da frequência de danos citogenéticos segundo a utilização de EPI                  | 34 |
| Figura 15: Distribuição da frequência de micronúcleos segundo a ingestão de carne vermelha e peixe | 35 |

## Lista de Imagens

|  |    |
|--|----|
| Imagens 1: 1A – célula com micronúcleo; 1B – célula com micronúcleo; 1C – células normais; 1D – célula com <i>broken egg</i> ; 1E – célula com núcleo fragmentado; 1F – célula com núcleo fragmentado com filtro de fase 2; 1G – célula binucleada; 1H – célula normal | 37 |
|--|----|

## **Lista de Abreviaturas**

BE – Broken egg

Bi – binucleada

EPI – equipamento de proteção Individual

Fr – fragmentada

MN – micronúcleo



## **1.0 - Introdução:**

---

A população mundial tem crescido e alcançou o marco de aproximadamente 6.759.178.525 pessoas em 2009 (U.S. Census Bureau, International Data Base<sup>1</sup>). E para atender a este enorme contingente, é necessária uma produção mínima e eficiente de alimentos para garantir o bem-estar e sobrevivência da espécie humana.

A história da agricultura inicia-se há mais de 10 mil anos atrás. Com a domesticação de plantas, os homens nômades substituíram a vida de caçadores e coletores e adotaram o modo de vida sedentário. A data, as causas e a maneira com que se deu este início são bastante controversas e há diferenças nos relatos de estudos que variam para cada região em questão (Flannery<sup>2</sup>; Smith<sup>3</sup>).

Acredita-se que a transição da vida humana de caçadores e coletores para uma vida agrícola foi gradual (Smith<sup>3</sup>), onde a mudança climática tenha tido um papel-chave que impulsionou e levou a domesticação de plantas (Pringle<sup>4</sup>).

No período de 11.000 A.C, após o último período glacial, a Terra transformou-se, apresentando longas estações secas o que teria favorecido plantas anuais. Estas plantas morriam no período da seca deixando grãos ou tubérculos que possuíam grandes reservas energéticas, e estas constituíram uma excelente fonte de alimentação, cuja abundância permitiu que caçadores coletores se fixassem nestas áreas (Araus<sup>5</sup>; Balter<sup>6</sup>).

Independente da forma de como ela surgiu, hoje a agricultura é um ramo importante do setor primário que constitui uma atividade essencial e ocupa grandes extensões territoriais dos países ao redor do mundo. Para atingir tal demanda, existem inúmeros recursos que são empregados pelo homem, como o melhoramento genético vegetal, novos maquinários, fertilizantes, agrotóxicos, mão-de-obra especializada, entre outros.

Assim como a agricultura, a utilização de agrotóxicos também data de longos anos, onde há relatos de utilização de agrotóxicos desde antes de 2.500 A.C. O primeiro agrotóxico conhecido foi o elemento enxofre em pó utilizado na China. Posteriormente, outras substâncias como chumbo, mercúrio e arsênio também foram utilizados (Klaassen<sup>7</sup>; Hodgson<sup>8</sup>).

O diclorodifeniltricloroetano (DDT), descoberto por Paul Muller em 1939, tornou-se o agrotóxico mais utilizado no mundo. Em 1940 iniciou-se a era dos agrotóxicos sintéticos. Desde então, estes vêm sendo aplicados e continuamente desenvolvidos.

## **1.1- Agrotóxicos:**

O termo “agrotóxico”, de acordo com a Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89, regulamentada pelo Decreto nº 4.074 de 04/01/2002, no seu artigo 1, inciso IV, é definido como: produtos e componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento.

### **1.1.1- Classificação dos agrotóxicos:**

Os agrotóxicos podem ser classificados i) quanto à sua ação, ii) quanto ao grupo químico a que pertencem e iii) quanto a sua toxicidade, sendo que no Brasil, a classificação toxicológica está a cargo do Ministério da Saúde. Sua classificação quanto a sua ação e grupamento químico de acordo com o Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos (OPAS<sup>9</sup>) está representada abaixo:

#### **i) Quanto à sua ação:**

a) Inseticidas: possuem ação de combate a insetos e larvas. Os inseticidas pertencem a quatro grupos químicos distintos: organofosforados, que são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditofosfórico, carbamatos, que são derivados do ácido carbâmico, organoclorados, que são compostos à base de carbono, com radicais de cloro e piretróides, que são compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes a piretrina, substância existente nas flores do *Chrysanthemum (pyrethrum) cinenariaefolium* (Klaassen<sup>7</sup>; Caldas<sup>10</sup>; Hodgson<sup>8</sup>).

b) Fungicidas: combatem fungos. Existem muitos fungicidas no mercado. Os principais grupos químicos são: etileno-bis-ditiocarbonatos, trifenil estânico, captan e hexaclorobenzeno.

c) Herbicidas: combatem ervas daninhas. Nas últimas duas décadas, este grupo tem tido uma utilização crescente na agricultura. Seus principais representantes são: paraquat, glifosato, pentaclorofenol, derivados do ácido fenoxiacético e dinitrofenóis (Hodgson<sup>8</sup>).

Outros grupos importantes compreendem:

d) raticidas (dicumarínicos): utilizados no combate a roedores.

e) acaricidas: ação de combate a ácaros diversos.

f) nematicidas: ação de combate a nematóides.

g) molusquicidas: ação de combate a moluscos, basicamente contra o caramujo da esquistossomose.

h) fumigantes: ação de combate a insetos, bactérias: (fosfetos metálicos [fosfina] e brometo de metila).

## ii) Quanto ao grupamento químico:

a) Organoclorados: Incluem compostos químicos como clordano, DDT, pentaclorofenol, mirex, aldrin, dieldrin e hexaclorobenzeno. São substâncias químicas derivadas do petróleo, sendo pouco solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Possuem uma lenta degradação, com grande potencial de contaminação de solo e água subterrânea, por serem pouco voláteis, terem boa estabilidade química, baixa taxa de biotransformação e degradação. Tais características favorecem assim sua bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar (Klaassen<sup>7</sup>).

b) Organofosforados: São substâncias químicas que atuam como inibidores da acetilcolinesterase, acumulando acetilcolina no tecido nervoso e órgãos efetores. São compostos constituídos de ésteres de ácido fosfórico ou ésteres de ácido tiofosfóricos (ex. malation, paration e metil paration). (Klaassen<sup>7</sup>).

c) Carbamatos: São agentes como Carbaril e aldicarb, que são ésteres de N-metil (ou N, N-dimetil) de ácido carbâmico, onde sua toxicidade varia de acordo com o grupo álcool ou fenol. O modo de ação dos carbamatos também se dá pela inibição da acetilcolinesterase (Klaassen<sup>7</sup>).

d) Piretróides: Possui uma boa atividade como inseticida e um de seus representantes mais conhecidos é a permetrina. São derivados sintéticos da piretrina, obtida a partir de extratos do crisântemo. Atuam sobre as membranas dos nervos pela modificação do canal de sódio potássio, retardando a despolarização da membrana (Klaassen<sup>7</sup>).

e) Fenoxiacéticos/Clorofenox: São utilizados como herbicidas, que mimetizam a ação de

auxinas, um hormônio vegetal de crescimento. Alguns agentes conhecidos são: ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D), utilizado como agente laranja na Guerra do Vietnã, e ácido 4cloro-o-toloxiacético (MCPA). (Klaassen<sup>7</sup>, Hodgson<sup>8</sup>).

- f) Bipiridilos: Alguns agentes conhecidos são o paraquat, mofaquat e diquat, utilizados como herbicidas de contato não-seletivo, dessecando as ervas sobre as quais foi aplicado (Hodgson<sup>8</sup>).

## **ii) Quanto a sua toxicidade:**

Esta classificação é baseada no perigo que cada agrotóxico apresenta na composição e formulação, na qual a toxicidade tem como parâmetro a DL50, que por definição é a dose que mata 50% dos animais em experimentação (WHO<sup>11</sup>).

- a) Classe Ia: Extremamente Perigoso – Ex. aldicarb (carbamato) e paration (organofosforado)
- b) Classe Ib: Altamente Perigoso – Ex. carbofuran (carbamato) e zeta-cipermetrina (piretróide).
- c) Classe II: Moderadamente Perigoso- Ex. azociclotin (organotin) e clordane (organoclorado).
- d) Classe III: Levemente Perigoso- Ex. azametifos (organofosforado) e alletrin (piretróide).

## **2.0- Impactos sobre a saúde**

---

Embora os agrotóxicos tenham a finalidade de otimizar a produção agrícola, o seu uso indiscriminado representa um risco em potencial para a saúde humana e o ambiente. Existem relatos de casos graves de intoxicação por exposição direta ou indireta a esses agentes e, portanto, constituem um grave problema de saúde pública (Soares<sup>12</sup>; Araújo<sup>13</sup>, Paolini<sup>14</sup>; Heng<sup>15</sup>; Koifman<sup>16</sup>).

Os possíveis efeitos causados pela exposição a agrotóxicos variam quanto à condição da exposição, a frequência, a predisposição, o estado do indivíduo exposto e a substância a qual foi exposto. A sintomatologia mais frequente da intoxicação aguda por agrotóxicos envolve cefaléia, fraqueza, dor abdominal, tonturas, tremores e paralisias (OPAS<sup>9</sup>).

Hoje, os agrotóxicos estão presentes no mundo todo e utilizados não apenas na agricultura, mas também sob forma de produtos químicos para o controle de vetores de doenças ou ainda como repelentes, entre outros, o que torna sua abrangência ainda maior (Pastor<sup>17</sup>).

### **2.1- Casos de intoxicação:**

A tabela 1, a seguir, mostra os dados mais recentes do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX<sup>18</sup>), referente ao número de casos de intoxicação humana causada por agrotóxicos de uso agrícola no período de 1995 a 2003:

Pode-se observar que os casos de intoxicação são crescentes, sugerindo que a exposição aumenta ao longo do tempo. Visto que existe a possibilidade de haver casos não registrados oficialmente, o número real de intoxicação pode ser ainda maior.

Normalmente, a internação e o registro da pessoa ocorrem quando esta apresenta sintomas clínicos de intoxicação aguda. Entretanto em casos de intoxicação crônica, onde a exposição ao agrotóxico é decorrente do uso ao longo de vários anos e os efeitos são tardios, é muito difícil a sua determinação dada a sintomatologia vaga e difusa apresentada por uma pessoa intoxicada nestas condições (Levigard<sup>19</sup>). Este fato dificulta os estudos investigativos sobre os efeitos relacionados à exposição crônica, a caracterização do aspecto clínico da intoxicação crônica e a captação de informações sobre o efeito crônico (Faria<sup>20</sup>).

Além disso, fatores sociais, econômicos e culturais exercem um importante papel nos casos de intoxicação com os agrotóxicos (Peres<sup>21</sup>).

| Casos registrados de intoxicação humana por agrotóxicos de uso agrícola |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Região / UF   | 1995        | 1996        | 1997        | 1998        | 1999        | 2000        | 2001        | 2002        | 2003        |
| <b>BRASIL (BR)</b>  | <b>4911</b> | <b>4824</b> | <b>5474</b> | <b>5268</b> | <b>4674</b> | <b>5127</b> | <b>5384</b> | <b>5591</b> | <b>5945</b> |
| <b>NORTE (N)</b>  | <b>-</b>    | <b>1</b>    | <b>2</b>    | <b>70</b>   | <b>84</b>   | <b>29</b>   | <b>25</b>   | <b>30</b>   | <b>35</b>   |
| Rondonia (RO)   | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          |
| Acre (AC)   | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          |
| Amazonas (AM)   | ..          | 1           | 2           | 3           | 3           | 14          | 5           | 13          | 12          |
| Roraima (RR)  | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          |
| Para (PA)   | ..          | ..          | ..          | 67          | 81          | 15          | 20          | 17          | 23          |
| Amapá (AP)  | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          |
| Tocantins (TO)  | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          |
| <b>NORDESTE (NE)</b>  | <b>536</b>  | <b>656</b>  | <b>616</b>  | <b>705</b>  | <b>348</b>  | <b>489</b>  | <b>386</b>  | <b>465</b>  | <b>920</b>  |
| Maranhão (MA)   | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          |
| Piauí (PI)  | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          |
| Ceará (CE)  | 299         | 400         | 423         | 455         | 151         | 139         | 137         | ...         | ...         |
| Rio Grande do Norte (RN)  | 0           | 5           | 0           | 8           | 11          | 15          | 20          | 4           | 3           |
| Paraíba (PB)  | 17          | 16          | 25          | 42          | 24          | 22          | 32          | 35          | 63          |
| Pernambuco (PE)   | 8           | 9           | 26          | 38          | 15          | 237         | ...         | ...         | 540         |
| Alagoas (AL)  | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          |
| Sergipe (SE)  | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | 246         | 131         |
| Bahia (BA)  | 212         | 226         | 142         | 162         | 147         | 76          | 197         | 180         | 183         |
| <b>SUDESTE (SE)</b>   | <b>2629</b> | <b>2356</b> | <b>2904</b> | <b>2596</b> | <b>2463</b> | <b>2788</b> | <b>2811</b> | <b>2760</b> | <b>2978</b> |
| Minas Gerais (MG)   | 140         | 199         | 187         | 223         | 215         | 325         | 322         | 301         | 195         |
| Espírito Santo (ES)   | ...         | ...         | 275         | 148         | 228         | 337         | 480         | 412         | 424         |
| Rio de Janeiro (RJ)   | 280         | 297         | 305         | 186         | 214         | 136         | 106         | 38          | 269         |
| São Paulo (SP)  | 2209        | 1860        | 2137        | 2039        | 1806        | 1990        | 1903        | 2009        | 2090        |
| <b>SUL (S)</b>  | <b>1474</b> | <b>1535</b> | <b>1648</b> | <b>1557</b> | <b>1508</b> | <b>1496</b> | <b>1880</b> | <b>2047</b> | <b>1657</b> |
| Paraná (PR)   | 303         | 281         | 323         | 316         | 338         | 252         | 306         | 287         | 264         |
| Santa Catarina (SC)   | 392         | 425         | 428         | 467         | 402         | 469         | 605         | 816         | 497         |
| Rio Grande do Sul (RS)  | 779         | 829         | 897         | 774         | 768         | 775         | 969         | 944         | 896         |
| <b>CENTRO OESTE (CO)</b>  | <b>272</b>  | <b>276</b>  | <b>304</b>  | <b>340</b>  | <b>271</b>  | <b>325</b>  | <b>282</b>  | <b>289</b>  | <b>355</b>  |
| Mato Grosso do Sul (MS)   | 161         | 157         | 163         | 135         | 93          | 104         | ...         | 23          | 72          |
| Mato Grosso (MT)  | 40          | 52          | 54          | 61          | 62          | 43          | 36          | ...         | 16          |
| Goiás (GO)  | 71          | 67          | 87          | 144         | 116         | 178         | 246         | 266         | 267         |
| Distrito Federal (DF)   | ...         | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          | ..          |

Tabela 1: Números de casos registrados de intoxicação humana por agrotóxicos (SINITOX<sup>18</sup>)

## 2.2- Efeitos Crônicos

Os efeitos crônicos apresentam um quadro clínico indefinido e de difícil diagnóstico (OPAS<sup>9</sup>), e seus efeitos subletais são elicitados por mecanismos que são distintos daqueles de uma intoxicação aguda (Hodgson<sup>8</sup>). Depende do tipo da substância, sua quantidade, via e duração de exposição e do estado de saúde do exposto, causando efeitos de natureza diversa:

- Neurológicos – substâncias que causam alterações no sistema neurológico como: neuropatia tardia, cefaléia, diminuição da memória, alteração de sono, desorientação e alterações psíquicas (Caldas<sup>10</sup>);
- Disruptores endócrinos - um agente exógeno que interfere na produção, transporte, liberação, metabolização, ligação, ação, ou eliminação de hormônios naturais responsáveis pela manutenção da homeostase e regulação dos processos de desenvolvimento (Kavlock<sup>22</sup>);
- Imunológicos – substância que provocam alterações no sistema imune: queda da

resposta imune humoral, redução na quimiotaxia de polimorfonucleares, aumento na infecção do trato superior respiratório, susceptibilidade a patógenos e reações de hipersensibilidade;

- Teratogênicos - são substâncias capazes de interferir no processo de desenvolvimento durante o estágio embrionário, prejudicando a etapa da histogênese e organogênese (OPAS<sup>9</sup>)
- Carcinogênicos - provocam eventos moleculares que podem levar a alterações celulares culminando numa proliferação celular descontrolada e eventualmente a um estado clínico de doença (Hodgson<sup>8</sup>).
- Genotóxicos – provocam danos ao material genético que podem se perpetuar através das células-filhas ou causar apoptose.
- Mutagênicos – são substâncias que causam a mutagênese, que consiste de uma alteração estrutural do DNA, em que a proliferação celular fixa a alteração e a transfere para as células-filhas. A alteração causada não é necessariamente prejudicial ao organismo.

### 2.3 – Genotoxicidade dos agrotóxicos

Os agrotóxicos são substâncias largamente utilizadas na agricultura para proteger as plantações e na saúde pública para controlar doenças. Eles constituem um dos maiores grupos de substâncias tóxicas que são intencionalmente aplicados no ambiente para combater as pragas que atacam as plantas. Além disso, é sabido que muitos dos agrotóxicos possuem o potencial de atingir organismos não-alvos, incluindo os humanos (Sailaja<sup>23</sup>).

Estes agentes possuem em sua composição moléculas biologicamente ativas, que podem interagir com o DNA e danificar sua estrutura. Tal interação pode ser crítica para a manifestação de propriedades genotóxicas dos agrotóxicos. Alterações ao nível molecular podem ser indicativos de lesões ao material genético, os quais podem incluir: troca de cromátides irmãs, formação de micronúcleos, aberrações cromossômicas, aneuploidia, etc. (WHO<sup>24</sup>) e seu monitoramento se faz necessário para evitar num possível desenvolvimento de uma doença.

A genotoxicidade dos agrotóxicos tem sido relatada tanto em testes de sistemas *in vivo* quanto em *in vitro* (*apud* Sailaja<sup>23</sup>), detectada através de diversos ensaios: ensaio cometa, troca de cromátides-irmãs, teste Ames, aberração cromossômica, micronúcleo e entre outros.

Ao investigar as propriedades genotóxicas dos agrotóxicos, pode se quantificar e qualificar as alterações do material genético e utilizá-lo como biomarcador, monitorando a

“saúde” do material cromossômico. Entretanto, o acúmulo de mutações críticas, induzidos ou não por fatores xenobióticos, pode levar a alterações de genes que são chaves no controle do ciclo celular e ameaçar a estabilidade genômica, onde o desfecho pode ser o desenvolvimento do câncer (Fenech<sup>25</sup>). A presença de morfologia nuclear anormal que exibem pontes nucleoplasmicas, micronúcleo e bolhas nucleares são indicativos de instabilidade genômica dentro da célula (Fenech<sup>25</sup>).

Podemos observar que na literatura há numerosos artigos que relataram encontrar uma frequência de micronúcleos maior frente à exposição aos agrotóxicos (Ergene<sup>26</sup>; Gómez-Arroyo<sup>27</sup>; Pacheco<sup>28</sup>; Costa<sup>29</sup>; Sailaja<sup>23</sup>; Kehdy<sup>30</sup>; Mattiuzzo<sup>31</sup>; Bhalli<sup>32</sup>; Costa<sup>33</sup>; Tope<sup>34</sup>; Feng<sup>35</sup>; Zeljezic<sup>36</sup>). Desta forma, é interessante o monitoramento da população exposta a essas substâncias.

No levantamento sobre agrotóxicos realizado pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) (WHO<sup>37</sup>) observa-se que muitos dados a respeito de carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade e efeitos sobre cromossomos não estão disponíveis ou são insuficientes para se avaliar o impacto destas substâncias sobre a saúde humana. Calcula-se que mais de 25% dos agrotóxicos são classificados como oncogênicos segundo a IARC<sup>37</sup>. Face a insuficiência de informações e a dificuldade de desenvolver estudos de efeitos de longo prazo a respeito dos agrotóxicos, é interessante todas as tentativas de se estudar estas substâncias, agregando desta forma, novas informações ao conhecimento.



### **3.0- Justificativa:**

---

Os agrotóxicos são empregados em diversos setores, como agropecuário, saúde pública, firmas desintetizadoras, transporte e comércio, indústrias, etc., e o Brasil é um dos principais países consumidores destas substâncias, principalmente na agricultura (OPAS<sup>9</sup>).

#### **3.1- Agrotóxicos utilizados no Brasil:**

No Brasil, as vendas de agrotóxicos têm crescido nos últimos anos atingindo a marca de U\$4.243.748 no ano de 2005, registrado pela utilização de 3,2kg por hectare, sendo os herbicidas os mais consumidos segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG<sup>38</sup>).

O Brasil é um país com economia fortemente caracterizada pela exportação de produtos agrícolas, ocupando o quinto lugar no ranking mundial, sendo que esta atividade responde por 33% do produto interno bruto brasileiro (PIB) (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA<sup>39</sup>). Para atender a esta produtividade, existe uma demanda por insumos que são necessários para o desempenho desta atividade, dentre eles, a utilização de agroquímicos, como os agrotóxicos. O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxico (Faria<sup>20</sup>), ocupando o oitavo lugar no mundo (uso por hectare plantado) (SINDAG<sup>38</sup>).

No Brasil, a escassez de informações sobre o consumo de agrotóxicos, bem como sobre intoxicações por estes produtos constituem uma parte dos problemas. Além disso, a dificuldade de acesso de trabalhadores rurais aos centros de saúde e diagnósticos incorretos são fatores que contribuem para a subnotificação das intoxicações agudas (Faria<sup>20</sup>; OPAS<sup>9</sup>).

Como os agrotóxicos são poluentes ambientais e a exposição a estes poluentes podem aumentar a frequência de danos genéticos em uma dada população (Aleem<sup>40</sup>; Pitarque<sup>41</sup>), contaminando não só os alimentos na forma residual como também o próprio ambiente onde é aplicado, há preocupação com o risco de exposição à população e à ecologia local (Peres<sup>21</sup>). A importância de um monitoramento ambiental se faz necessário, de modo a haver uma avaliação eficiente a fim de assegurar uma qualidade de vida que é diretamente dependente do ambiente em que o homem se encontra inserido.

Nas atividades agrícolas é possível observar a utilização intensiva de agrotóxicos, sem os cuidados necessários, o que tem contribuído para o aumento das intoxicações ocupacionais e a degradação ambiental, sendo um dos principais problemas de saúde pública no meio rural brasileiro (Araújo<sup>13</sup>; Oliveira-Silva<sup>42</sup>; Faria<sup>43</sup>; Delgado & Paumgarten<sup>44</sup>).

Estudos têm demonstrado ocorrência de casos de intoxicação ocupacional de pessoas expostas a agrotóxicos (Delgado & Paumgartten<sup>44</sup>; Bréga<sup>45</sup>) trazendo preocupações para a saúde desta população. É de grande interesse o monitoramento quanto aos efeitos genotóxicos potencialmente induzidos por agrotóxicos, pois existe a possibilidade de danos desta natureza evoluir para doenças que terminem por trazer custos tanto para a saúde do indivíduo quanto para a saúde pública, como o câncer por exemplo (Bonner<sup>46</sup>; Šrám<sup>47</sup>).

A utilização de um teste de diagnóstico precoce pode tornar-se um meio de evitar a continuidade da exposição e com isso, o agravamento do estado de saúde. Neste caso, o teste de micronúcleo tem sido amplamente empregado como biomarcadores de efeitos para danos cromossomiais e estabilidade genômica em populações humanas (Bonassi<sup>48</sup>; Andrade<sup>49</sup>; Holland<sup>50</sup>) Estas alterações citogenéticas podem preceder danos estruturais e a detecção dos mesmos permite a identificação precoce de uma exposição e a intervenção para prevenção de um efeito grave, a doença (Amorim<sup>51</sup>).

Este biomarcador citogenético, presente em diversos estudos epidemiológicos (Neresyan<sup>52</sup>; Gómez-Arroyo<sup>27</sup>; Lucero<sup>53</sup>), fornece então medidas de danos genotóxicos. Uma vez que os eventos relacionados com a formação do micronúcleo podem ocasionar ativação de protooncogenes ou deleção de genes supressores de tumor, estes podem ser considerados fenômenos antecedentes ao desenvolvimento de neoplasias (Andrade<sup>49</sup>; Hagmar<sup>54</sup>; Prasad<sup>55</sup>).

Desta forma, este teste vem recebendo importância em estudos de monitoramento de populações expostas a substâncias genotóxicas (Ergene<sup>26</sup>; Reis<sup>56</sup>; Andrade<sup>49</sup>; Feng<sup>35</sup>; Neresyan<sup>57</sup>; Pacheco<sup>28</sup>; Minissi<sup>58</sup>; Zúñiga<sup>59</sup>; Smaka-Kincl<sup>60</sup>), que podem levar a alterações celulares de ordem genética, constituindo eventos-chave no papel da carcinogênese.

O teste de micronúcleo, frente aos outros testes, demonstra ser um método não-invasivo executável em humanos, indolor, simples e de baixo-custo, que pode ser utilizado como uma ferramenta ou marcador biológico (Prasad<sup>61</sup>; Andrade<sup>49</sup>), na detecção de exposição ocupacional a agentes genotóxicos (Sailaja<sup>23</sup>; Costa<sup>29</sup>).

### **3.2 – Teste de Micronúcleo**

O teste de micronúcleo baseia-se no princípio de que os micronúcleos são pequenas partículas consistindo de fragmentos acêntricos de cromossomos ou cromossomos inteiros, os quais permanecem na anáfase da divisão celular. Após a telófase, estes fragmentos podem ou não ser incluídos no núcleo das células filhas formando simples ou múltiplos micronúcleos (Figura 1) no citoplasma (US FDA<sup>62</sup>; Schmid<sup>63</sup>; Von Ledebur<sup>64</sup>). Os micronúcleos aparecem nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células parentais (Ribeiro<sup>65</sup>).

É muito utilizado como teste para estudo de compostos que causam quebras cromossômicas (clastogênese) e ou que interfiram na capacidade mitótica da célula (Hodgson<sup>8</sup>), funcionando como um biomarcador de efeito.

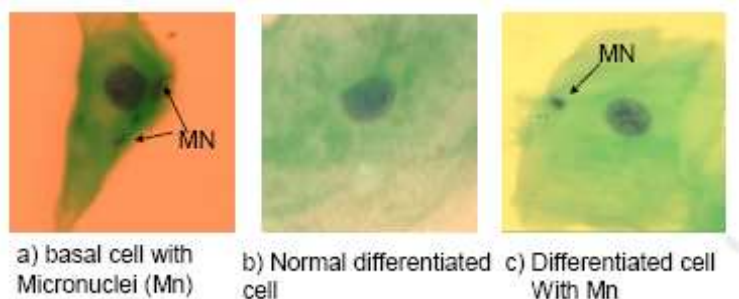


Figura 1: Células da mucosa oral humana. (Thomas<sup>66</sup>)

A avaliação de micronúcleos pode ser realizada em diferentes tipos de tecidos podendo apresentar uma frequência distinta de micronúcleos, ainda que a avaliação seja realizada num mesmo organismo. Este tipo de análise pode ser realizado retirando-se amostras de células humanas do epitélio bucal e do tecido sanguíneo (Tucker<sup>67</sup>).

No epitélio bucal, que é um tecido pavimentoso estratificado não queratinizado, a ausência de queratinização significa uma maior permeabilidade, implicando num maior poder de absorção destas células que compõem este tecido. Para o teste de micronúcleo neste sítio, podem ser coletadas para análise amostras celulares oriundas da mucosa jugal e do bordo lateral da língua. Além disso, mais de 90% dos cânceres reportados têm origem epitelial (*apud* Rosin<sup>68</sup>).

O teste também pode ser aplicado no tecido sanguíneo, que é composto por células que circulam por todo o organismo e é responsável pelo transporte de várias substâncias. São utilizadas duas linhagens de células, os reticulócitos e os linfócitos.

Pode-se considerar ainda quanto ao ensaio de micronúcleo que a realização do teste pode se dar *in vivo* e *in vitro*. Para tanto existem protocolos que orientam o procedimento na avaliação de micronúcleo quanto a esta variação da técnica descrita pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) e *Environmental Protection Agency* (EPA).

### 3.3 – Agrotóxicos e o Teste de Micronúcleo

Estudos a respeito de populações expostas aos agrotóxicos e a detecção de genotoxicidade através do teste de micronúcleo têm apresentado resultados controversos, alguns demonstrando uma relação positiva, ou seja, sugerindo que o aumento da frequência de micronúcleo estaria relacionada com a exposição aos agrotóxicos (Ergene<sup>26</sup>; Gómez-Arroyo<sup>27</sup>; Pacheco<sup>28</sup>; Costa<sup>29</sup>; Sailaja<sup>23</sup>; Kehdy<sup>30</sup>; Mattiuzzo<sup>31</sup>; Bhalli<sup>32</sup>; Costa<sup>33</sup>; Tope<sup>34</sup>; Feng<sup>35</sup>; Zeljezic<sup>36</sup>) e outros não demonstrando nenhuma associação significativa (Bolognesi<sup>69</sup>; L. Lucero<sup>53</sup>).

Ainda assim é difícil avaliar a genotoxicidade dos agrotóxicos, pois a exposição normalmente não ocorre apenas a um único agrotóxico e sim a múltiplos agrotóxicos, o que pode resultar numa interação de efeitos (aditivos, sinérgicos, potenciação, antagonismo funcional, químico, disposicional e de receptor). Estas interações então teriam um resultado final sobre a frequência de micronúcleos diferente daquela que seria observada se o indivíduo estivesse exposto a apenas um agrotóxico. Somando-se a isto, existem outras variáveis que interferem na produção de micronúcleos, como ingestão de álcool, medicamentos, fumo e dieta (Suhas<sup>70</sup>; Reis<sup>56</sup>; Wu<sup>71</sup>; Fenech<sup>72</sup>).

Dadas as dificuldades de avaliar a relação de genotoxicidade dos agrotóxicos e a frequência de micronúcleos em populações expostas, mais estudos são necessários para compreender o vínculo existente entre o trabalhador e os agrotóxicos para melhor proteger a saúde humana.

## **4.0 - Objetivos:**

---

### **4.1 - Objetivo Geral**

Analisar os efeitos genotóxicos da exposição a agrotóxicos através da utilização do teste de micronúcleo, em amostras obtidas da mucosa jugal junto a produtores de flores do município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro.

### **4.2 - Objetivos específicos**

a) Analisar a população de floricultores do município de Nova Friburgo através do teste de micronúcleo e outras anomalias nucleares verificando-se junto a variáveis de confundimento como fumo, bebida, idade, sexo, etc. (Holland<sup>50</sup>);

b) Comparar a frequência de micronúcleos na população estudada com aquela observada em uma população não-floricultora, residente no mesmo município e verificar se os agrotóxicos utilizados nesta atividade produzem algum dano genotóxico através do teste de micronúcleo nesta população;

c) Identificar os agrotóxicos mais utilizados.

## 5.0 – Materiais e Métodos

### 5.1 - Desenho de estudo

Este é um estudo transversal observacional analítico constituído de uma pesquisa de indivíduos residentes nas propriedades floricultoras de Stucky e Colônia 61.

O estudo foi realizado na localidade de Nova Friburgo com indivíduos voluntários, que trabalham com floricultura (grupo exposto ocupacional) e que não trabalham, nem manipulam agrotóxicos (grupo não-exposto ocupacional), verificando-se a frequência de formação de células micronucleadas em ambos os grupos.

### 5.2 - Caracterização do local

O município de Nova Friburgo (Figura 2) está situado na região serrana do estado Rio de Janeiro, região sudeste do Brasil (figura 6), contabilizando, no ano de 2002, uma população de 178.310 habitantes (IBGE, 2008), apresentando 12% da população residentes na zona rural. A área total do município é de cerca 933 km<sup>2</sup> sendo que destes, 5,64 Km<sup>2</sup> foram destinados ao plantio de lavouras temporárias e permanentes, em 2004.

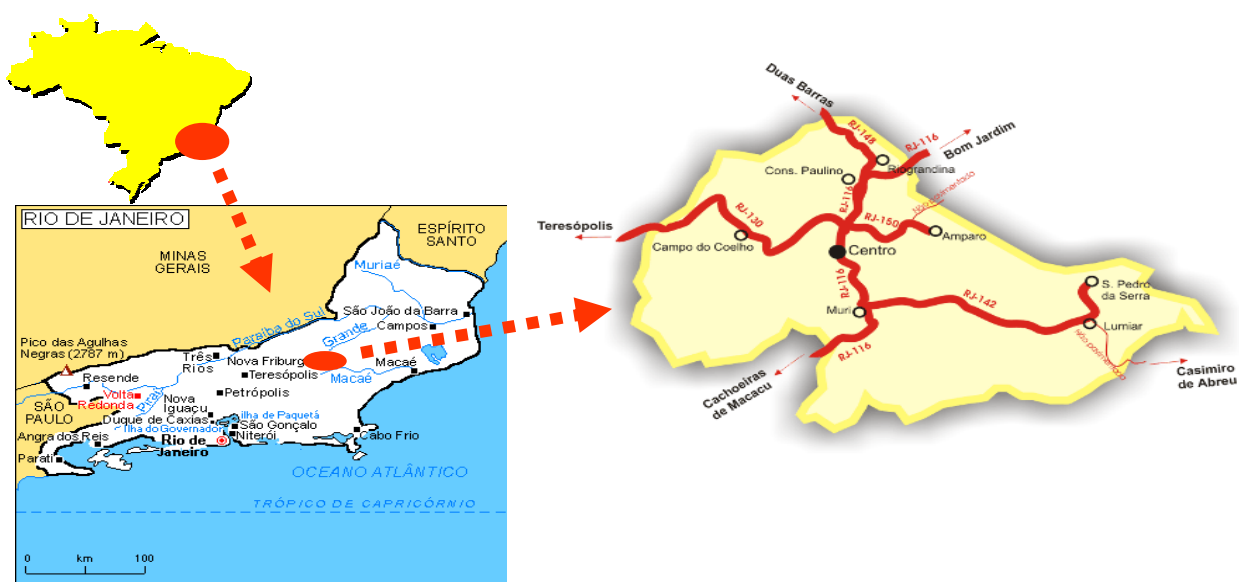


Figura 2: Esquema ilustrativo do município de Nova Friburgo

O pólo produtor de flores do município de Nova Friburgo / RJ congrega as localidades de Stucky e Colonial 61 (que, juntas, concentram aproximadamente 40 produtores) e de Vargem Alta (principal localidade produtora, com aproximadamente 200 produtores). A produção de flores da região data da década de 1950 e, segundo o Sebrae/RJ (2004), o

município de Nova Friburgo é hoje o segundo maior produtor nacional de flores, sendo superado apenas por Holambra (SP).

### **5.3 - Populações de estudo e comparação**

Cerca de 80 indivíduos, entre expostos e não-expostos ocupacionais foram convidados a participar do trabalho, respondendo a um questionário (anexo 1) e coletando amostras de células da mucosa bucal, após consentimento livre e informado (anexo 2), autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o Parecer nº. 37/08.

O critério para a classificação dos indivíduos em expostos e não-expostos foi determinado para aqueles que trabalham ativamente na agricultura e aqueles que não trabalham com agricultura e nem manipulam agrotóxicos, respectivamente.

### **5.4 - Coleta de informações**

A coleta de informações foi realizada através da aplicação de questionários diretamente ao participante do estudo. Este questionário foi composto por diversos blocos de perguntas. No primeiro bloco são coletadas informações pessoais (idade, raça, nível de escolaridade, cidade em que mora, zona da cidade que mora), o segundo bloco foi composto por questões relacionadas às condições de moradia, renda familiar, desinsetização domiciliar e contato com produtos químicos em geral; o terceiro módulo caracterizou os hábitos de vida da população (hábitos de fumo, consumo de bebidas alcoólicas e prática regulares de exercício); com o quarto módulo foram coletadas informações sobre a exposição a agrotóxicos (distância da residência a lavoura, tipo de contato com agrotóxicos, atividades realizadas na agricultura, tipos de equipamentos de proteção utilizados, tipos de vestimenta utilizada na lavoura, hábitos de higiene durante e após o contato com agrotóxicos e medidas de segurança que são utilizadas quando entram em contato com o mesmo).

### **5.5 - Teste de Micronúcleo**

A coleta do material biológico foi realizada por meio de uma escova citológica (cytobrush) retirando-se a amostra do epitélio jugal direito e esquerdo, após um enxágüe bucal realizado com água com a função de retirar material bruto que pudesse constituir um artefato no momento da análise microscópica (Thomas<sup>66</sup>).

As células de todos os indivíduos da amostra foram coletadas de sítios da mucosa oral

ausente de ulcerações e outras lesões visíveis (Reis<sup>56</sup>). Foram excluídos os indivíduos que apresentem doenças bucais visíveis que possam vir a comprometer os resultados do estudo e evitar riscos possíveis de agravamentos das lesões preexistentes.

As amostras coletadas foram depositadas e transportadas em tubos Falcon (Eurotíps Scientific) de 15mL contendo a solução tampão Tris-HCl pH 7,0 (0,01 M Tris-HCl (Merck), 0,1 M EDTA tetrassódico (Vetec), 0,02 M cloreto de sódio (Merck)) e enviadas para o laboratório, onde foram então processadas.

As amostras coletadas foram processadas conforme o protocolo descrito no artigo de Thomas<sup>66</sup> e colaboradores e Holland<sup>50</sup> e colaboradores com algumas modificações. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm por três vezes, desprezando-se o sobrenadante e completando o volume de 5mL com o tampão Tris-HCl. Este procedimento auxilia na remoção de bactérias e restos alimentares que podem prejudicar a contagem. Cerca de 40µl da solução contendo as amostras foram transferidas para lâminas, secas ao ar livre por 24 horas ou mais, e posteriormente, fixadas em metanol a 80%.

A metodologia escolhida para a coloração foi a de Feulgen-Fast Green, que consiste na utilização do corante Schiff e contra-coloração de Fast-Green. Para a sua realização, as lâminas foram imersas em uma solução de HCl a 1N por 10 minutos a uma temperatura de 60°C, lavadas com água e coradas no Schiff por no mínimo uma hora e 30 minutos no escuro, e em seguida, lavadas com água. Após, as lâminas foram coradas com a solução alcoólica de Fast-Green a 0,1% por 10 segundos e lavadas em água corrente para posterior leitura.

A escolha pelo sítio da coleta de amostra de células de origem da mucosa jugal deve-se ao fato da facilidade da coleta do material, ser uma técnica não invasiva e de simples execução, onde a identificação de micronúcleos já se mostrou de grande eficiência (Fenech<sup>72</sup>; Speit<sup>73</sup>).

Foram avaliadas as células e os micronúcleos de acordo com os seguintes critérios sugeridos por Holland<sup>50</sup> e colaboradores: (a) perímetro redondo que sugere uma membrana; (b) ter menos que um terço do diâmetro do núcleo principal, mas grande o suficiente para discernir a forma e a cor; (c) Feulgen positivo, coloração rosa em um campo iluminado; (d) intensidade de coloração similar ao do núcleo; (e) textura similar ao do núcleo; (f) mesmo plano focal que o núcleo; (g) ausência de sobreposição, ou ligação com o núcleo. Além disso, outras alterações nucleares que indicam danos no DNA foram analisadas e contabilizadas: (a) broto nuclear (“*broken egg*”); (b) célula binucleada; (c) núcleo fragmentado (Holland<sup>50</sup>).

A análise consistiu de uma avaliação de no mínimo 1000 células de cada duplicata da amostra. Na análise, foram consideradas variáveis como bebidas, medicamentos, idade, sexo e fumo como potenciais fatores de confundimento (Wu<sup>71</sup>; Lucero<sup>53</sup>).



## 5.6 - Análise Estatística

As análises estatísticas foram efetuadas utilizando-se o software BioStat 2008 v. 5. Primeiramente, procedeu-se o cálculo das frequências (análise univariada) totais de micronúcleos e outras alterações citogenéticas nos grupos estudados.

Foram realizados cálculos para observar a distribuição da frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares dentro deste grupo

Foram comparadas médias de frequência relativa de variáveis como fumo, bebida, horas de trabalho, sexo, etc. obtidas no questionário segundo micronúcleo, *broken egg*, células binucleadas e núcleo fragmentado, almejando-se o intervalo de confiança de 95%.

## 6.0 - Resultados

Esta população é composta por muitos descendentes europeus, muitos deles suíços. A população participante pode ser caracterizada conforme o quadro abaixo:

| <b>Características</b>                | <b>Homens</b> | <b>Mulheres</b> |
|---------------------------------------|---------------|-----------------|
| <b>n</b>                              | 68            | 12              |
| <b>Idade média (anos)</b>             | 42,32         | 45,25           |
| <b>Nível educacional</b>              |               |                 |
| Analfabeto                            | 12%           | 16,6%           |
| E. fundamental incompleto             | 63,83%        | 66,66%          |
| E. fundamental completo               | 8,51%         | 0               |
| E. médio completo                     | 0             | 16,6%           |
| E. médio completo                     | 2,12%         | 0               |
| <b>Relação de trabalho</b>            |               |                 |
| Proprietário                          | 56,25%        | 12,5%           |
| Empregado                             | 20,83%        | 25%             |
| Meeiro                                | 8,33%         | 12,5%           |
| Ajuda família                         | 14,58%        | 50%             |
| <b>Tempo médio de trabalho (anos)</b> | 21,17         | 21,57           |

Tabela 2: Característica do grupo estudado

Neste trabalho, o número de participantes que responderam ao questionário totalizou, entre expostos e não exposto ocupacionais, 52 pessoas, representando um percentual de 35% que não responderam. Dentre as pessoas que responderam ao questionário, 45 pessoas assumiram trabalhar diretamente com o agrotóxico e sete não manipulavam ou trabalhavam diretamente com agrotóxicos, constituindo então a amostra controle. O número de pessoas que forneceram amostra biológica, entretanto, foi maior, constituindo um grupo de 80 indivíduos.

Ao analisar os dados, foi possível observar por meio do questionário que as pessoas que constituíam o grupo controle não eram adequados para tal classificação. Ainda que tenham afirmado não manipular agrotóxicos, estas pessoas residiam muito próximos à área rural, sendo então expostas indiretamente. Considerando isto, todas as pessoas participantes deste trabalho são consideradas expostas, 45 de forma direta e sete de forma indireta.

### 6.1 –Frequência de danos citogenéticos

Primeiramente, com fins de caracterização quanto aos danos citogenéticos desta população, os dados da frequência de micronúcleo (MN) (Figura 3), broken egg (BE) (Figura 4), células binucleadas (BiN) (Figura 5) e células com o núcleo fragmentado (Fr) (Figura 6)

foram graficamente representados com o seguinte resultado:

Verifica-se que frequência de micronúcleos nesta amostra apresenta uma distribuição onde 33,75% não apresentaram micronúcleos e 76,25% apresentaram alguma frequência destes, principalmente na faixa de 0,5 a 2,5 MN/100 células analisadas.

A presença de valores não inteiros para a frequência de danos citogenéticos se deve à transformação dos valores brutos em proporção de x alterações para cada 100 células avaliadas, com a finalidade de padronizar as médias comparadas.

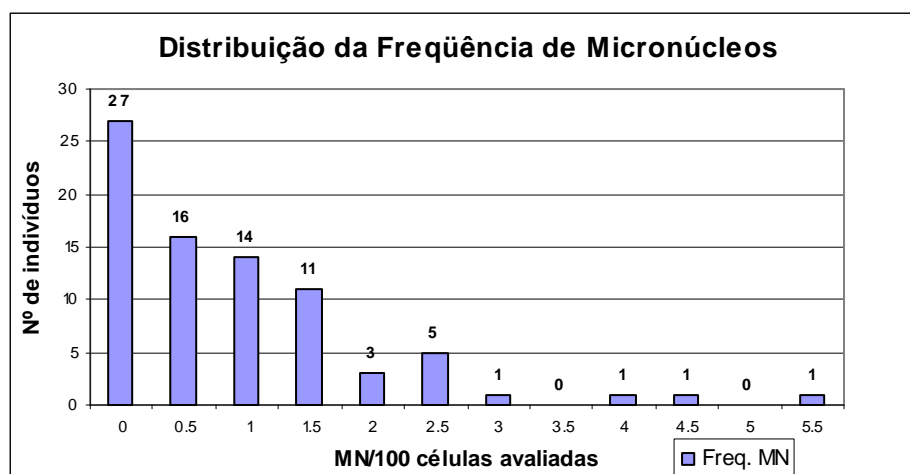


Figura 3: Frequência de micronúcleos num total de 80 indivíduos analisados

Com relação aos *broken eggs*, do total de 80 indivíduos analisados, 47 (58,75%) não apresentaram qualquer tipo de dano e apenas uma amostra apresentou um número muito alto em comparação aos demais.

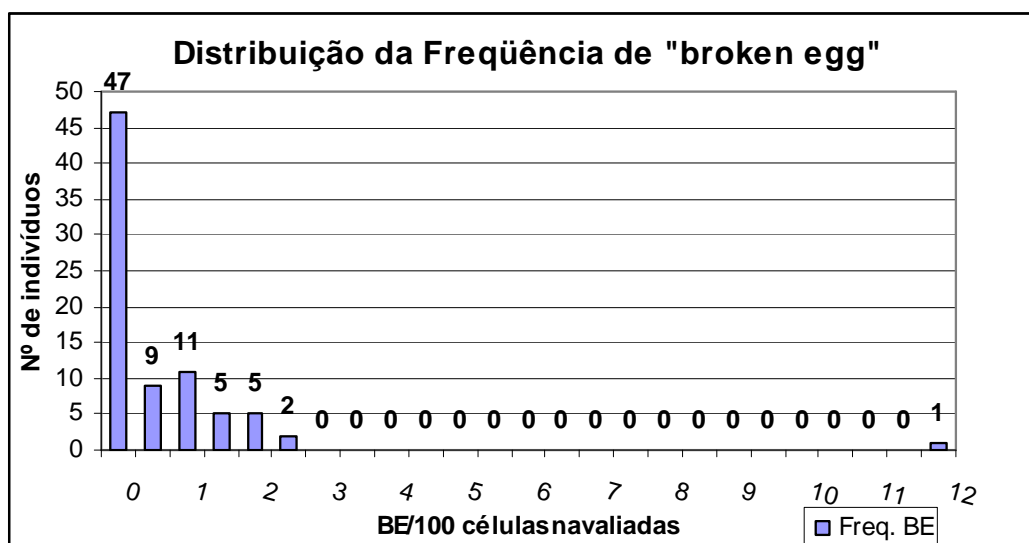


Figura 4: Frequência de *Broken egg* num total de 80 indivíduos analisados.

Já no que tange a frequência de células binucleadas, foi observado que a maioria dos indivíduos analisados apresentaram tal alteração. Quantitativamente, cerca de 90% da amostra, apresentou uma frequência entre 2 e 15 células com a alteração para cada 100 células analisadas.

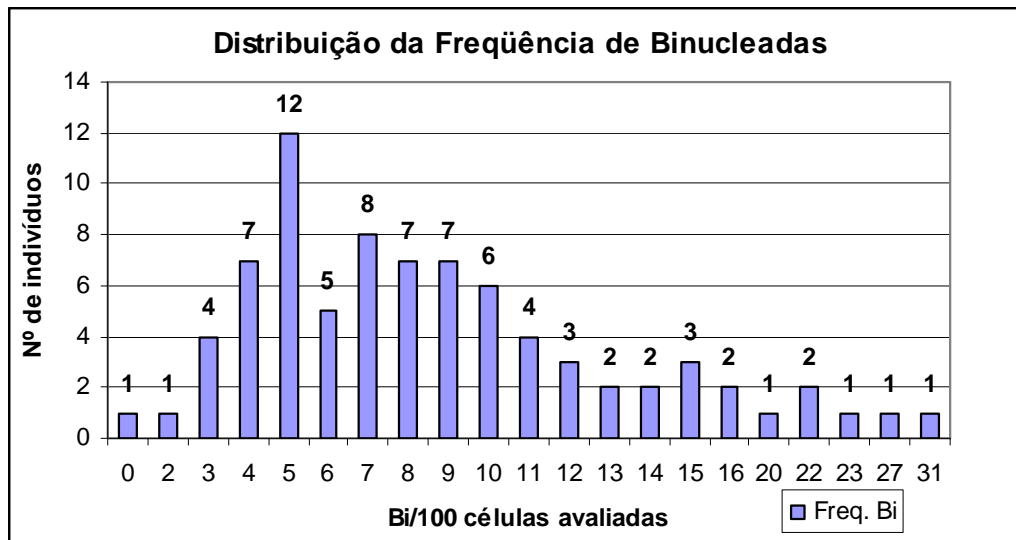


Figura 5: Frequência de células binucleadas num total de 80 indivíduos.

Por fim, 48 indivíduos não apresentaram alterações do tipo núcleo fragmentado. Entretanto, mais uma vez, algumas poucas amostras apresentaram alterações bastante elevadas.

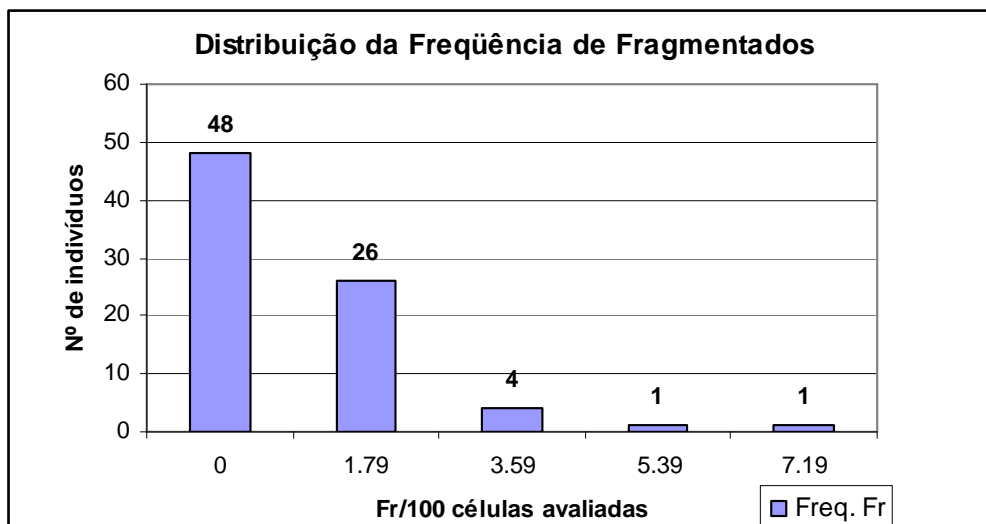


Figura 6: Frequência de células com núcleo fragmentado num total de 80 indivíduos

## 6.2 – Análise das médias

Uma vez que neste trabalho não há um grupo controle adequado, recorreu-se a literatura à procura de um grupo controle que pudesse servir como parâmetro de comparação. Optou-se pelos resultados obtidos por Gómez-Arroyo e colaboradores (2000), que analisaram a frequência de micronúcleos entre floricultores mexicanos e verificaram uma diferença significativa entre os expostos e não expostos.

Além disso, para fins complementares, foi incluído um grupo denominado indeterminado, oriundo de indivíduos que não responderam ao questionário, porém contribuíram fornecendo amostra biológica para análise (n=28).

O grupo denominado exposto apresentou uma média de 0,084 MN/100 células (sd:0,091), enquanto que os expostos indiretos apresentaram 0,057 MN/100 células (sd: 0,055). Já os de exposição indeterminada apresentaram média de 0,071 MN/100 células (sd: 0,128). Por fim, o grupo controle, oriundo de Gómez-Arroyo<sup>27</sup> e colaboradores, apresentou média de 0,037 MN/100 células (sd: 0,023).

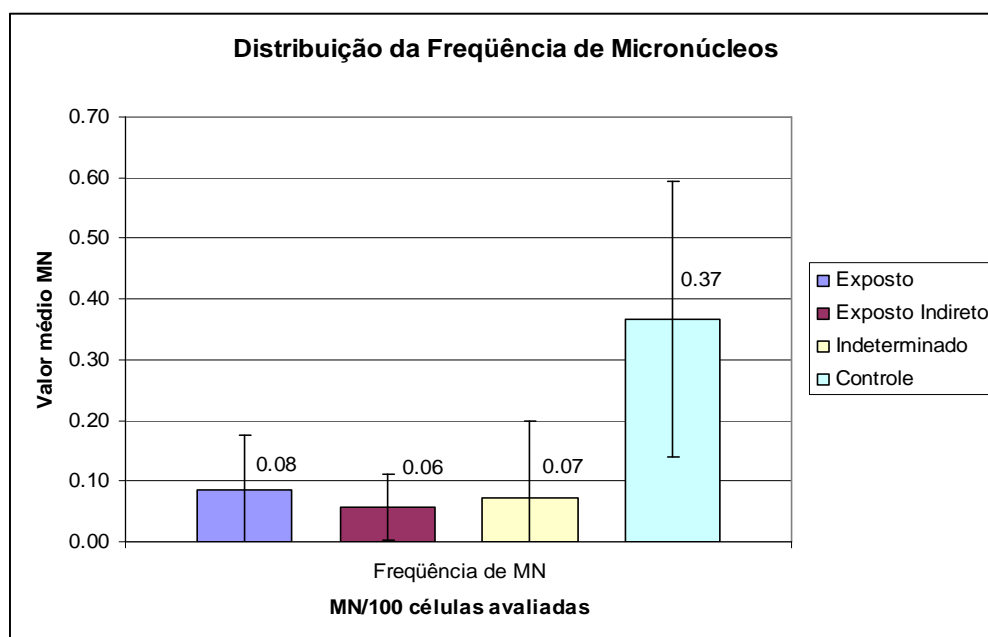


Figura 7: Média da frequência relativa de micronúcleos e seus desvios-padrão.

Para realização das comparações, primeiramente verificou-se que a distribuição da frequência de micronúcleos não segue uma distribuição normal, assumindo-se então uma distribuição não paramétrica. Em seguida, foi realizada a comparação de frequência de micronúcleos através do teste de Kruskal-Wallis ANOVA, entre expostos, expostos indireto, indeterminado e controle, obtendo-se os seguintes resultados:

| Comparação Múltipla de amostras MN |     |            |        |          |
|------------------------------------|-----|------------|--------|----------|
|                                    | n   | Média e DP |        |          |
| Exposto                            | 45  | 0,08±0,09  |        |          |
| Exposto Indireto                   | 7   | 0,06±0,05  |        | p = 0,64 |
| Indeterminado                      | 28  | 0,07±0,13  | G.L. 2 | p = 0,23 |
| Controle                           | 30  | 0,37±0,23  | G.L. 3 | p = 0,32 |
| Total                              | 110 | 0,58±0,15  |        |          |

Tabela 3: Análise de variância Kruskal-Wallis de micronúcleos entre os diferentes grupos

O p-valor de 0,32 indica que não há uma diferença significativa entre as amostras comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Ao analisar os expostos, expostos indiretos e controle, também houve ausência de diferença entre as amostras, com p-valor de 0,23.

O mesmo ocorre quando se utilizou o teste de Mann-Whitney para verificar se há diferença na frequência de micronúcleos entre os expostos e expostos indireto, com o p-valor de 0,6. Quanto às outras anormalidades nucleares, não foram encontradas diferenças significantes entre as amostras comparadas.

### 6.3 – Danos Citogenéticos e variáveis

No gráfico abaixo podemos observar que o aumento no tempo (horas/semana) de aplicação de agrotóxicos não implica numa frequência maior de micronúcleos nos floricultores de Nova Friburgo.

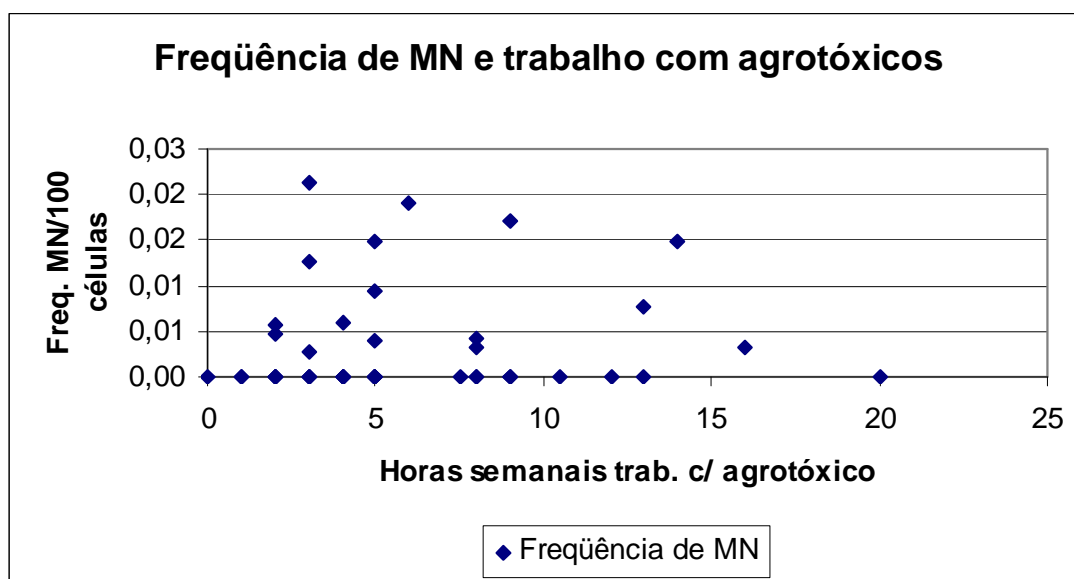


Figura 8: Dispersão da frequência de MN/100 por horas de trabalho (n=34)

O tempo, em anos, de manipulação de agrotóxicos também não apresentou nenhuma associação com a frequência de micronúcleos (Figura 9)

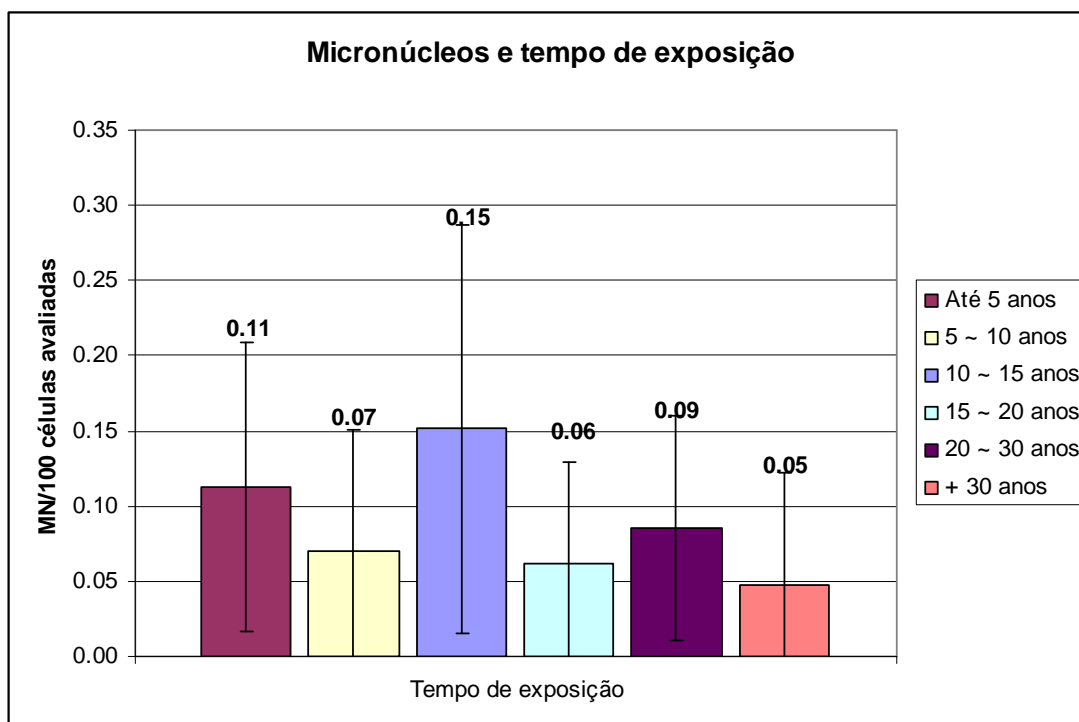


Figura 9: Frequência de MN/100 por tempo de exposição (n=34)

Os resultados da comparação de médias de danos citogenéticos, segundo o critério de exposição e fumo, estão graficamente demonstrados na figura 10: Podemos observar através do gráfico que as pessoas classificadas como expostos indiretos, de uma maneira geral, apresentam danos citogenéticos num nível maior que os expostos direto, ainda que de modo discreto.

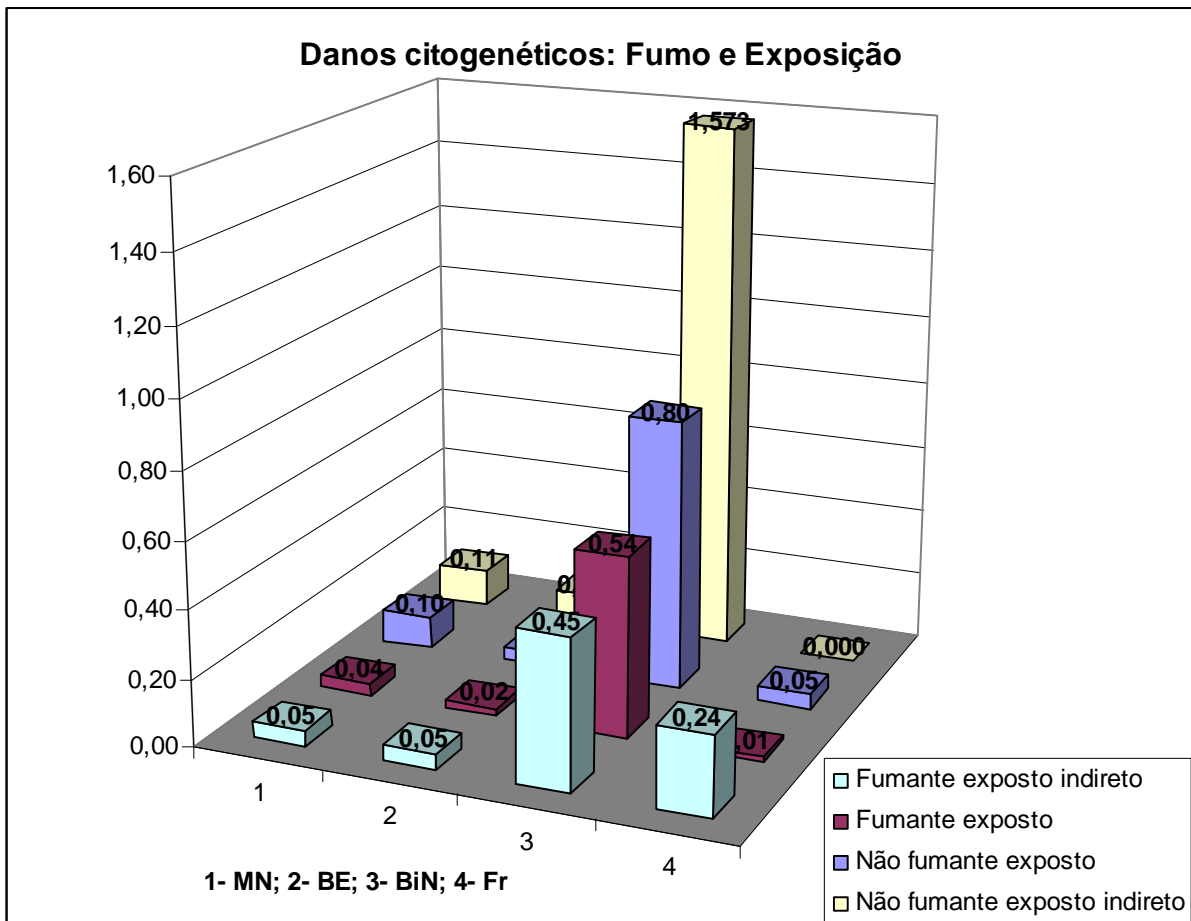


Figura 10: Frequência de danos citogenéticos para as variáveis fumo e exposição ao agrotóxico (n=45).

Ao analisarmos a frequência de micronúcleos segundo a idade dos indivíduos, observamos uma ausência de correlação entre estas duas variáveis (Figura 11).

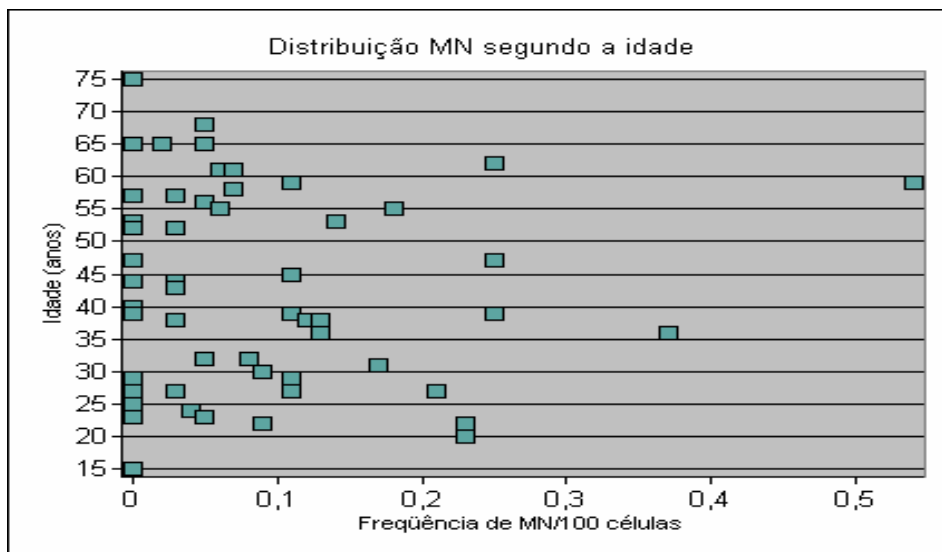


Figura 11: Distribuição da frequência de MN/100 células segundo a idade (n=56)



A distribuição da frequência de micronúcleos segundo o sexo, apresentou para os homens uma média de 0,09 e um desvio-padrão de 0,11 e para as mulheres uma média de 0,04 com um desvio-padrão de 0,04 (Figura 12). Abaixo, uma tabela com o resultado estatístico comparando a frequência deste dano genético entre homens e mulheres, onde se observou que não há uma diferença significativa entre eles, com p-valor de 0,27 para o teste de Mann-Whitney.

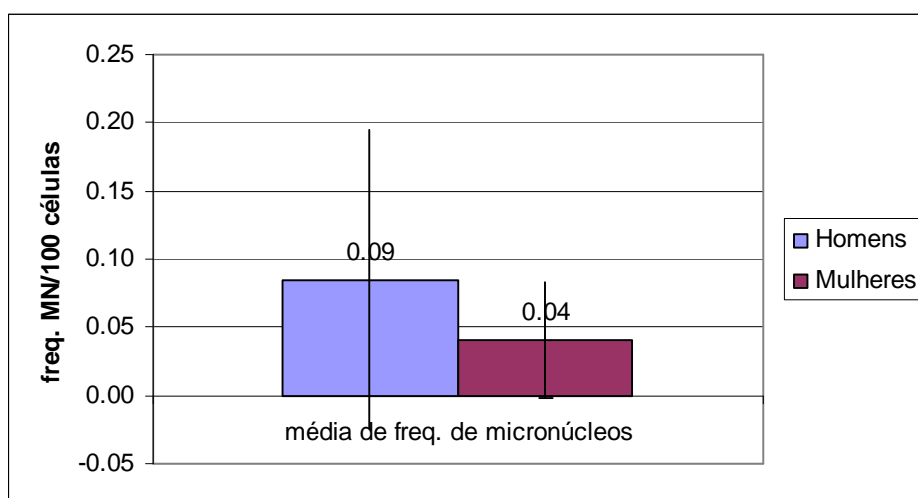


Figura 12: Média de frequência de MN/100 células segundo o sexo (n=80).

| Comparação de duas amostras segundo MN |    |            |
|--|----|------------|
|  | n  | Média e DP |
| Homens                                 | 68 | 0,09±0,11  |
| Mulheres                               | 12 | 0,04±0,04  |
| Total                                  | 80 | p = 0,27   |

Tabela 4: Comparação da frequência de MN/100 células entre homens e mulheres

A figura 13 apresenta a distribuição de danos citogenéticos, numa amostra de 44 indivíduos da região, segundo a exposição fumo e bebida, onde se nota uma concentração ligeiramente maior de danos do tipo micronúcleo e uma grande alteração para células binucleadas em pessoas que afirmaram não fumar e não beber.

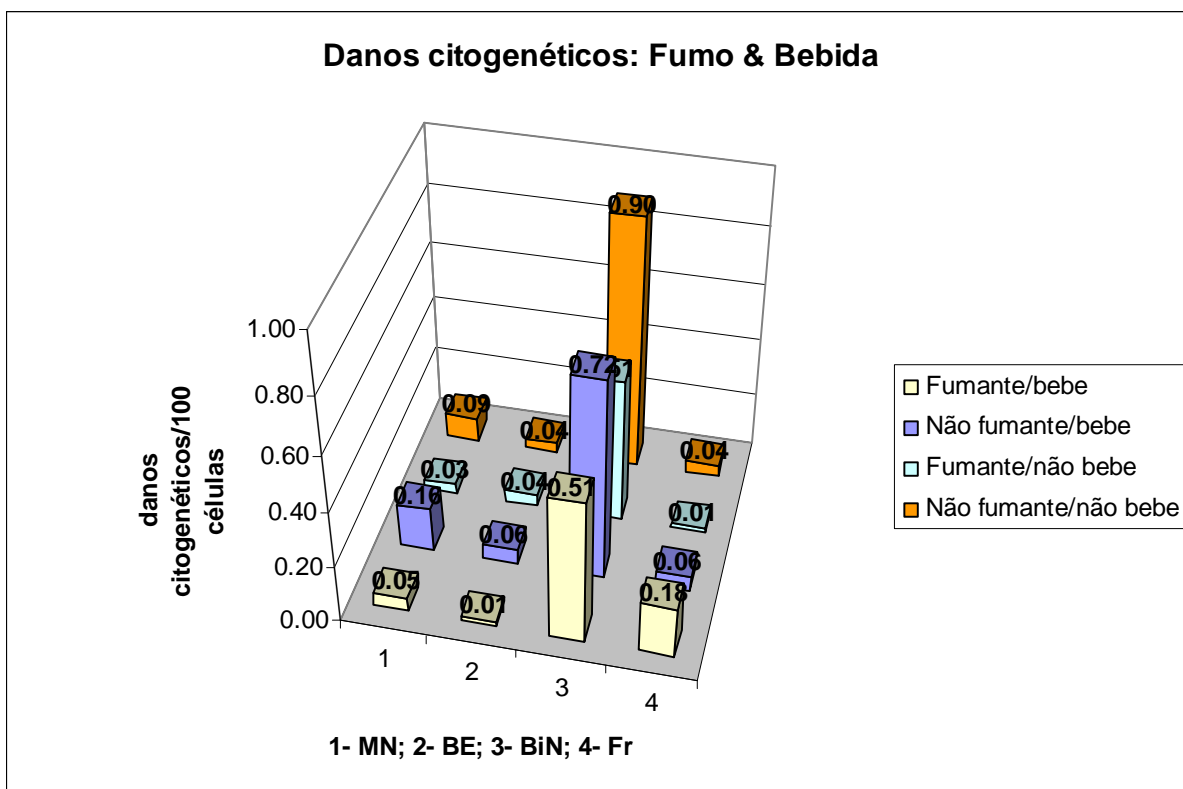


Figura 13: Danos citogenéticos presentes segundo fumo e bebida (n=44).

No que tange ao uso de EPI, podemos observar que, exceto para células binucleadas, os danos citogenéticos apresentam-se ligeiramente superiores para quem não utiliza equipamento de proteção individual (EPI) ao aplicar agrotóxicos. Entretanto, as diferenças não foram significativas: Mann-Whitney, com p-valor igual a 0,8; 0,3; 0,3; 0,3 para as respectivas alterações celulares (Figura 14).

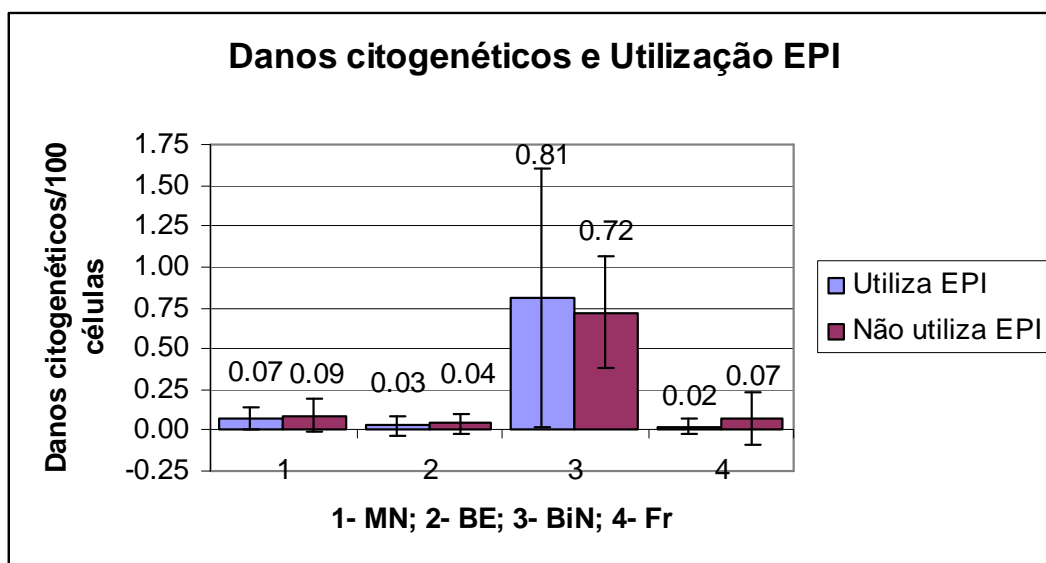


Figura 14: Média da frequência de danos citogenéticos segundo a utilização de EPI (n=44)

O consumo de carne, principalmente vermelha, parece ter influenciado a frequência de micronúcleos. Os indivíduos que reportaram um alto consumo de carne também apresentaram maior frequência de MN que o grupo de menor consumo. Entretanto, tal diferença Ao comparar a frequência de distribuição de micronúcleos do grupo que menos ingere carne com o grupo que ingere mais, não foi achada nenhuma diferença significativa, com p-valor 0,18 no teste Mann-Whitney. E p-valor de 0,31 no teste de Kolmogorov-Smirnov (Figura 15).

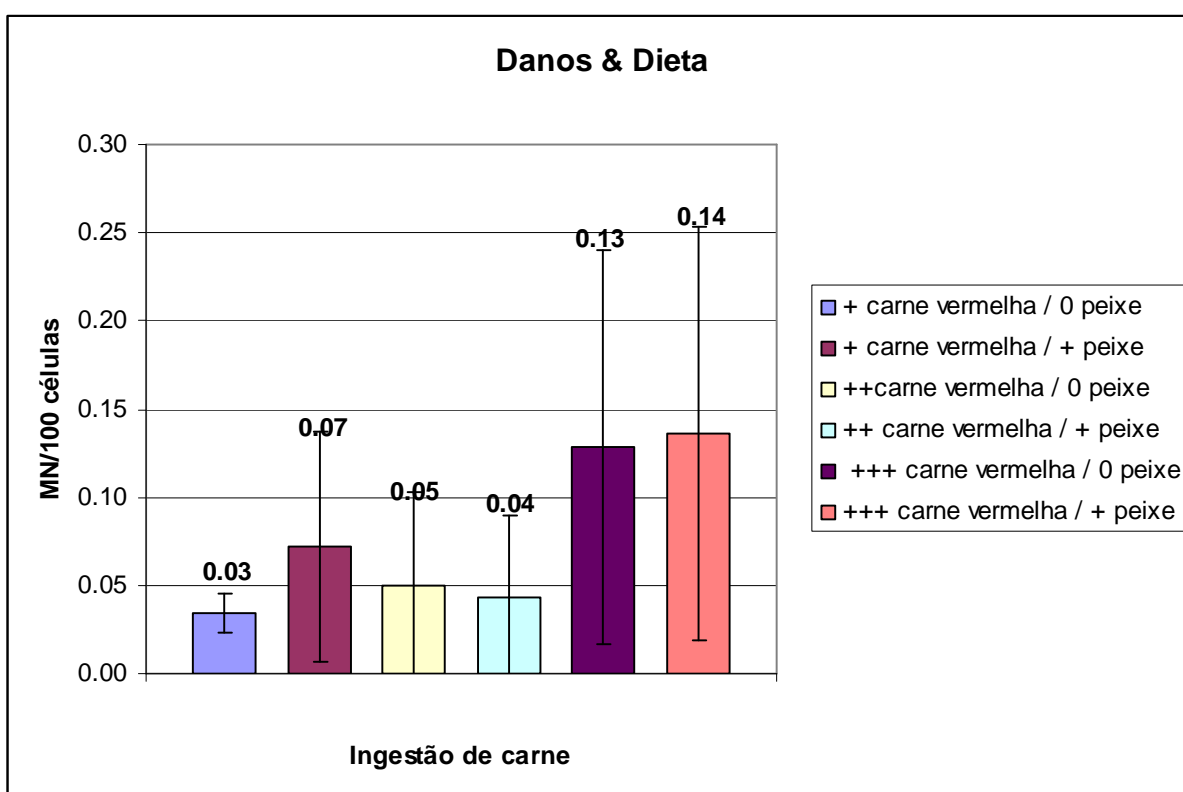


Figura 15: Distribuição da frequência de micronúcleos segundo a ingestão de carne vermelha e peixe (n=56).

#### 6.4 – Agrotóxicos mais Utilizados

Foi realizado um levantamento dos agrotóxicos mais utilizados na região e classificados segundo o tipo, produto, número de usuários, classe toxicológica e grupamento químico.

| Tipo       | Produto   | Nº usuários | Classe (WHO)              | Grupo Químico                |                        |
|------------|-----------|-------------|---------------------------|------------------------------|------------------------|
| Inseticida | Tamaron   | 10          | II - Altamente Tóxico     | Organofosforado              |                        |
|            | Stron     | 3           | I - Extremamente Tóxico   | Organofosforado              |                        |
|            | Decis     | 7           | III - Medianamente Tóxico | Piretróide                   |                        |
|            | Vertimec  | 10          | III - Medianamente Tóxico | Avermectina                  |                        |
|            | Confidor  | 1           | IV - Pouco Tóxico         | Piretróide                   |                        |
|            | Orthene   | 1           | IV - Pouco Tóxico         | Organofosforado              |                        |
|            | Folisuper | 10          | I - Extremamente Tóxico   | Organofosforado              |                        |
|            | Fastac    | 2           | II - Altamente Tóxico     | Piretróide                   |                        |
|            | Microzol  | 1           | IV - Pouco Tóxico         | Inorgânico                   |                        |
|            | Folidol   | 1           | I - Extremamente Tóxico   | Organofosforado              |                        |
| Fungicida  | Astro     | 1           | III - Medianamente Tóxico | Organofosforado              |                        |
|            | Dithane   | 27          | III - Medianamente Tóxico | Ditiocarbamato               |                        |
|            | Censor    | 7           | III - Medianamente Tóxico | Imidazolinona                |                        |
|            | Forum     | 23          | III - Medianamente Tóxico | Morfolina                    |                        |
|            | Orthocide | 2           | I - Extremamente Tóxico   | Dicarboximida                |                        |
|            | Polyram   | 1           | III - Medianamente Tóxico | Ditiocarbamato               |                        |
|            | Curzate   | 1           | III - Medianamente Tóxico | Ditiocarbamato               |                        |
|            | Antracol  | 2           | II - Altamente Tóxico     | Ditiocarbamato               |                        |
|            | Sportak   | 1           | I - Extremamente Tóxico   | Imidazolilcarboxamida        |                        |
|            | Titanium  | 2           | IV - Pouco Tóxico         | Estrobilurina                |                        |
|            | Mancozeb  | 1           | II - Altamente Tóxico     | Ditiocarbamato               |                        |
|            | Amistar   | 3           | IV - Pouco Tóxico         | Estrobilurina                |                        |
|            | Midas     | 1           | II - Altamente Tóxico     | Ditiocarbamato               |                        |
|            | Herbicida | Glifosato   | 1                         | IV - Pouco Tóxico            | Glicina substituída    |
|            |           | Tordon      | 2                         | I - Extremamente Tóxico      | Ácido ariloxialcanóico |
| Espalhante | Adesil    | 1           | I - Extremamente Tóxico   | Alquil fenol poliglicol éter |                        |

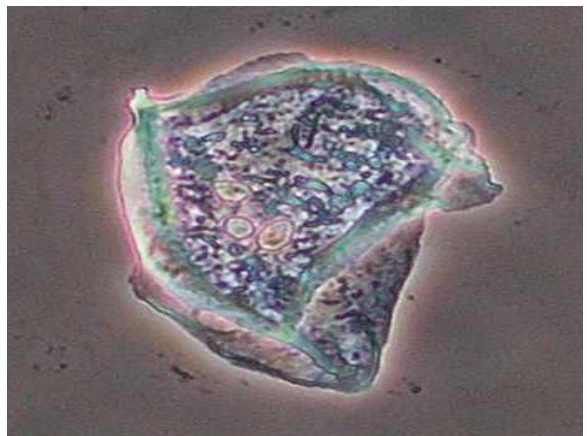
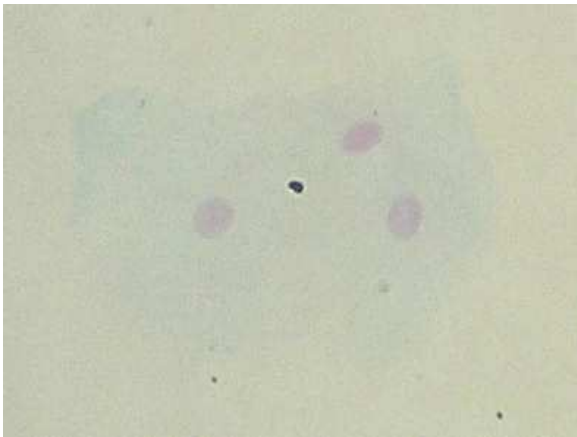
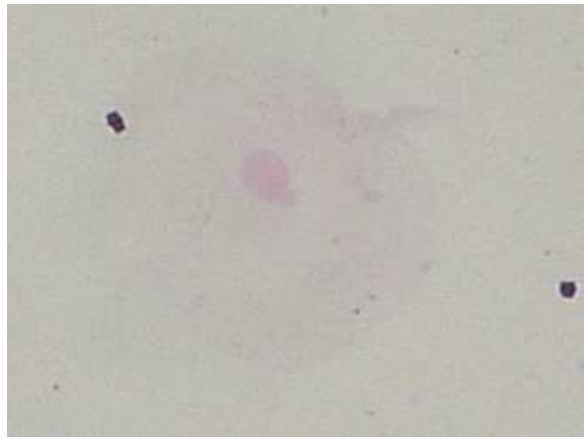
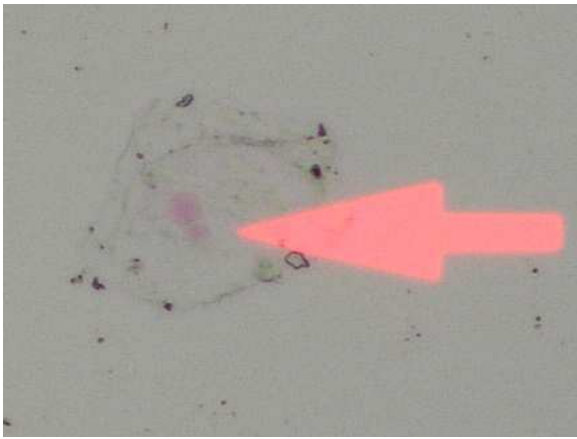
Tabela 5: Levantamento dos agrotóxicos utilizados pelos floricultores de Nova friburgo/RJ

## 6.5 – Imagens das células

Verificamos a seguir as imagens das amostras obtidas de diferentes indivíduos da população floricultora de Nova Friburgo.

Todas as amostras apresentam células coloridas com Schiff, e apenas as imagens 1C, 1E e 1F foram contra-coloradas com fast-green, exibindo uma coloração esverdeada no citoplasma e núcleo azulado.

Todas as imagens foram obtidas no aumento de 200x (objetiva de 20 e ocular de 10) no microscópio Olympus BX-51.



Imagens 1: 1A – célula com micronúcleo; 1B – célula com micronúcleo; 1C – células normais; 1D – célula com *broken egg*; 1E – célula com núcleo fragmentado; 1F – célula com núcleo fragmentado com filtro de fase 2; 1G – célula binucleada; 1H – célula normal

## 7.0 – Discussão

---

Os danos citogenéticos têm sido propostos como parâmetros para avaliação de efeitos genotóxicos de agentes químicos e físicos. Neste sentido, o teste de micronúcleo em células exfoliadas provenientes da mucosa oral tem sido empregado como uma ferramenta valiosa na detecção de danos genéticos causados por exposição ambiental, estilo de vida e procedimentos médicos (Speit<sup>73</sup>; Suhas<sup>70</sup>; Nersesyan<sup>57</sup>).

A mucosa oral é composta por um epitélio com regiões queratinizadas, como a gengiva e o palato duro e regiões não queratinizadas, como bochecha e assoalho oral. Sua camada basal é mitoticamente ativa para recompor a mucosa que atua como uma barreira permeável aos xenobióticos, onde as células levam aproximadamente 14 dias para atingir a superfície epitelial (Speit<sup>73</sup>; Squier<sup>74</sup>).

A detecção de micronúcleos em células epiteliais exfoliadas requer que o agente genotóxico ultrapasse a barreira e alcance a camada basal que possui atividade mitótica elevada, induzindo danos citogenéticos que são transformados em micronúcleos durante a divisão celular e, posteriormente coletada quando estas células migram para a superfície da mucosa (Speit<sup>73</sup>).

Além do micronúcleo, outras alterações podem estar presentes nas células exfoliadas, tais como *broken egg*, proveniente de uma amplificação gênica, células binucleadas, causada por uma citocinese defeituosa, e células com núcleo fragmentado, indicativo de falha mitótica. Todas essas alterações citogenéticas, incluindo o micronúcleo, são danos ao material genético, onde a presença de uma proporção elevada é sugestiva de uma exposição a substâncias genotóxicas (Holland<sup>50</sup>).

Desta maneira, acredita-se que exposições a xenobióticos, como agrotóxicos, possam ser detectados por meio de biomarcadores de fácil acesso, minimamente invasivo, indolor, rápido e baixo custo, como o teste de micronúcleo, a fim de monitorar populações humanas.

A contaminação por agrotóxicos ou qualquer outra substância pode ocorrer na forma de inalação de gases, vapores, fumaças, misturas ou partículas, ingestão e ou através da absorção dérmica (Roth<sup>75</sup>). No estudo realizado, os indivíduos que afirmaram ter contato dérmico (n=31) com os agrotóxicos apresentaram uma discreta elevação na média de frequência de danos frente aos que não tiveram contato dérmico respectivamente.

No nosso estudo, outro dado interessante observado é que os indivíduos que afirmaram sentir cheiro do agrotóxico em suas residências apresentaram uma frequência significativamente maior de micronúcleos que aqueles que nada sentiam (p-valor 0,05).

Entretanto, o fato de preparar os agrotóxicos a serem aplicados nas lavouras não causou nenhuma alteração na frequência de danos citogenéticos.

Dados na literatura a respeito do teste de micronúcleo em indivíduos expostos aos agrotóxicos têm se mostrado controverso, conforme observado por Tope<sup>34</sup> e colaboradores.

Alguns estudos como o de Costa<sup>27</sup> e colaboradores, Acquavella<sup>76</sup> e colaboradores, Blair<sup>88</sup> e colaboradores (1992), Blair e Zahm<sup>77</sup>, Keller-Byrne<sup>78,79</sup> e colaboradores e Khuder & Mutgi<sup>80</sup>, encontraram uma associação positiva entre a exposição aos agrotóxicos e o aumento na frequência de micronúcleos. Entretanto, Bolognesi<sup>69</sup> e colaboradores, Castro<sup>81</sup>, Ramirez e Cuenca, Pastor<sup>82,83</sup> e colaboradores não encontraram associação significativa entre agrotóxicos e micronúcleo.

Neste trabalho, realizado na população floricultora de Nova Friburgo, não foi encontrada diferença significativa na frequência de micronúcleos entre expostos e os expostos indiretos (p-valor de 0,9). Entretanto, observou-se uma tendência de aumento dos micronúcleos entre os agricultores considerados expostos, quando comparados com os expostos indiretamente. É possível que, se tivéssemos obtido uma amostra controle realmente não exposta e com número adequado, ou mesmo se o número de indivíduos expostos indiretamente tivesse sido maior, teríamos observado uma diferença mais contundente entre os grupos. Mas com um grupo comparativo, de apenas 7 indivíduos, a grande maioria das comparações não atingiu significância estatística.

A comparação com o grupo de exposição indeterminada, composto por indivíduos que não responderam os questionários, mas que doaram amostras biológicas, e o grupo controle proveniente de indivíduos mexicanos não expostos aos agrotóxicos, também não detectou diferenças significativas. Este grupo controle foi inserido com fins de comparação, uma vez que este se mostrou diferente do grupo exposto de modo significativo na população floricultora investigada (Gómez-Arroyo<sup>27</sup>).

Observamos que a população floricultora de Nova Friburgo classificada como exposta apresentou uma média de 0,08 micronúcleos em 100 células, valor semelhante encontrado pelo Speit<sup>73</sup> e colaboradores entre os controles num trabalho que avaliava o efeito genotóxico do formaldeído nas células bucais (0,09/100 MN).

Entretanto a média encontrada neste trabalho é considerada menor do que aquelas encontradas na literatura, mesmo entre os controles: 0,38/100 (Gómez-Arroyo<sup>27</sup>), 0,47/100 (Lucero<sup>53</sup>), 0,32/100 (Sailaja<sup>23</sup>; Costa<sup>29</sup>). Esta diferença encontrada pode ser devido a diferença de perfil genético da população estudada, desconhecimento do quantitativo de agrotóxico a que a pessoa foi exposta, condição da exposição e da mistura de substâncias a que os indivíduos foram expostos (Lucero<sup>53</sup>).

A coloração adotada neste procedimento foi Feulgen, conforme sugerido por Fenech<sup>72</sup> e colaboradores, no intuito de padronizar o teste de micronúcleo mundialmente. Feulgen-Fast Green é um método que se mostra específico para DNA, reduzindo o número de falso-positivos (Holland<sup>50</sup>), e conseqüentemente a quantidade de micronúcleo encontrada. Entretanto, somando-se a isto, há relatos de ocorrência de subcontagem contribuindo para um menor número de micronúcleos encontrados (Casartelli<sup>84</sup>).

Outros fatores podem interferir na quantificação dos danos citogenéticos: o teste de micronúcleo é baseado na contagem visual das lâminas, podendo haver variação na interpretação e reconhecimento das células, a reprodutibilidade de biomarcadores de DNA entre laboratórios é limitada quando se compara populações locais, e diferente qualidade óptica dos microscópios utilizados (Fenech<sup>85</sup>) são diversidades presentes em todos os estudos as quais não se pode irrelevar.

A utilização de equipamento de proteção individual (EPI), pode ter proporcionado uma certa proteção, apresentando uma discreta diminuição de danos citogenéticos sem que houvesse diferença significativa de MN, BE e Fr entre os usuários e não-usuários. Costa<sup>29</sup> e colaboradores também verificaram que a utilização de medida proteção individual influenciou na freqüência de MN bucal, encontrando resultados semelhantes. Entretanto, independente do uso de equipamento de proteção, seja por modo inadequado de utilização ou ineficiência, Kehdy<sup>30</sup> e colaboradores, verificaram a presença de indução de danos cromossomiais em trabalhadores que manipulam agrotóxicos. Além disso, a afirmação do uso do EPI é proveniente de uma informação auto-declarada.

O valor médio obtido da freqüência de MN com relação ao hábito de fumar, não influenciou os parâmetros citogenéticos avaliados, o mesmo encontrado por Costa<sup>29</sup> e colaboradores e Kehdy<sup>30</sup> e colaboradores. Assim como não houve qualquer fator de proteção associado.

Assim como o hábito de fumar, a ingestão de álcool pareceu não influenciar na freqüência dos parâmetros examinados, resultados estes corroborados por outros estudos (Kehdy<sup>30</sup>; Sailaja<sup>23</sup>; Roth<sup>75</sup>). Embora na literatura sejam encontradas referências que apontam que fumo e ingestão de álcool provocam uma elevação na concentração de MN (Wu<sup>71</sup>; Reis<sup>56</sup>).

A freqüência de MN entre os floricultores demonstrou não haver nenhum tipo de correlação com o tempo de exposição (categorizados em anos de trabalho) aos agrotóxicos. Observou-se que quanto maior o tempo de trabalho, menor sua média de MN/100 (gráfico 9), mas este achado é exatamente o contrário do que Sailaja<sup>23</sup> e colaboradores e Bolognesi<sup>86</sup> e colaboradores encontraram, onde trabalhadores rurais com dez anos e mais de dez anos de



trabalho, possuíam uma frequência de MN maior em comparação aos que tinham menos de 10 anos de exposição aos agrotóxicos.

Ao verificar a distribuição de MN segundo a idade, observamos que não há uma diferença significativa e que a frequência do dano concentra-se num patamar baixo, apresentando-se em torno de 0,1MN/100 examinadas ao longo do tempo.

Entretanto, em um estudo de coorte foi encontrado um aumento significativo da frequência de MN na coorte mais idosa em relação a coorte mais nova (p-valor 0,05) (Thomas<sup>66</sup>). Bloching<sup>87</sup> e colaboradores também encontraram correlação positiva entre idade e MN ( $r=0,204$ , p-valor= 0,042, correlação de Pearson). A idade é uma consequência inevitável do ciclo de vida de qualquer organismo, e seus efeitos resultam no aumento de eventos de instabilidade genética que associadas à diminuição da capacidade de reparo celular poderiam explicar o aumento de MN conforme o passar do tempo (Thomas<sup>66</sup>).

Estudos de Costa<sup>29</sup> e colaboradores, Sailaja<sup>23</sup> e colaboradores não observaram entre os trabalhadores expostos uma relação entre MN e sexo, dados que estão de acordo com o resultado apresentado neste trabalho. Por outro lado, Suhas<sup>70</sup> e colaboradores (2004), Bloching<sup>87</sup> e colaboradores encontraram uma associação positiva. A explicação para este efeito é geralmente atribuída a eventos aneuplóides envolvendo o cromossomo x, onde a frequência de MN é maior nas mulheres do que nos homens (Costa<sup>33</sup>).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), uma agência reguladora cuja finalidade institucional é promover a saúde da população por intermédio de controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços, realizou uma reavaliação dos agrotóxicos. Esta reavaliação decorre do fato de o Brasil ocupar em 2008, o posto de maior consumidor de agrotóxicos em todo o mundo. Foram encontrados alguns problemas relacionados às substâncias ativas presentes, dentre eles, o glifosato, um dos produtos utilizados pela população de Nova Friburgo. (ANVISA<sup>89</sup>)

## **8.0 – Conclusão**

---

Neste trabalho não foi possível detectar os possíveis efeitos genotóxicos causados pelos agrotóxicos na população de floricultores de Nova Friburgo, através do teste de micronúcleo e avaliação de outras anormalidades nucleares, bem como sua associação com as variáveis de confundimento.

Além disso, verificou-se que a frequência de danos citogenéticos avaliados entre os expostos e expostos indiretos foram semelhantes, com pequena tendência de aumento entre os expostos. Analisando os questionários, a categorização dos expostos indiretos pelo fato de não trabalhar com os agrotóxicos não foi a mais adequada, uma vez que a exposição, mesmo que indireta, pode afetar com níveis variados de profundidade e talvez, até de forma mais grave, do que aqueles que manipulam o agrotóxico diretamente, pois estes, cientes do perigo, podem tomar medidas preventivas.

Este fato pode ser devido a ausência de um grupo controle adequado oriundo do mesmo grupo populacional para estudos de comparação, os diferentes graus e vias de exposição a que os indivíduos estão submetidos em suas tarefas diárias. Somando-se a isto, os floricultores manipulam não apenas um, mas uma diversidade de agrotóxicos que podem comprometer de diferentes maneiras a sua saúde e a das pessoas com quem convivem nas proximidades.

Ainda que não fosse possível chegar a um consenso a respeito da citotoxicidade causada pelos agrotóxicos através do ensaio de micronúcleo no nível em que os agricultores hoje se encontram expostos, é inegável observar que muitos estudos sugerem que a exposição a essas substâncias possuem uma associação positiva que trazem determinados prejuízos à saúde (Acquavella<sup>76</sup>; Blair<sup>88</sup>; Blair e Zahm<sup>77</sup>; Keller-Byrne<sup>78,79</sup>; Khuder and Mutgi<sup>80</sup>).

Considerando que a técnica de micronúcleo é amplamente aplicada, acessível, rápida e indolor, mais estudos podem ser realizados e necessários para melhor compreender a genotoxicidade dos agrotóxicos.

## **9.0 - Referências Bibliográficas:**

---

- 1 - U. S. Census Bureau, International Data Base, 2009. [www.census.gov/ipc/www/idb/worldpopinfo.html](http://www.census.gov/ipc/www/idb/worldpopinfo.html) (acessado em 13/fev/2009).
- 2 - Flannery KV. The origins of agriculture. Annual Reviews of Anthropology, 1973; 2: 271-310.
- 3 - Smith BD. The origins of agriculture: Between Foraging and Farming. Science, 1998; 279 (5357): 1651-1652.
- 4 - Pringle H. Neolithic Agriculture: The Slow Birth of Agriculture. Science, 1998; 282: 1446.
- 5 - Araus JL, Ferrio JP, Bruxó R, Voltas J. The historical perspective of dryland agriculture: lessons learned from 10000 years of wheat cultivation. Journal of Experimental Botany, 2007, 58 (2): 131-145.
- 6 - Balter M. Seeking Agriculture's Ancient Roots. Science, 2007, 316: 1830-1835.
- 7 - Klaassen CD. ed. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2001.
- 8 - Hodgson E. A textbook of modern toxicology. United States of America: Wiley-Interscience, 3<sup>rd</sup>, 2004.
- 9 - Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) - MANUAL DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE DE POPULAÇÕES EXPOSTAS A AGROTÓXICOS. Brasília, 1997.
- 10 - Caldas LQA (coordenador). Intoxicações Exógenas Agudas. Centro de Controle de Intoxicações – Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2003.
- 11 - World Health Organization (WHO). The WHO recommended classification of pesticide by hazard and guidelines to classification. WHO Library, 2005.
- 12 - Soares WL, Freitas EAV de, Coutinho JAG. Trabalho rural e saúde: intoxicações por agrotóxicos no município de Teresópolis – RJ, 2005; 43 (4): 685-701.
- 13 - Araújo ACP, Nogueira DP, Augusto, LGS. Pesticide impact on health: a study of tomato

cultivation. Rev. Saúde Pública, 2000; 34 (3): 309-313.

14 - Paolini M, Mesirca R, Pozzetti L, Maffei F, Vigagni F, Hrelia P, Cantelli-Forti G. Genetic and non-genetic biomarkers related to carcinogenesis in evaluating toxicological risk from Fenarimol. Mutation Research, 1996; 368: 27-39.

15 - Heng ZC, Ong T, Nath J. In vitro studies on the genotoxicity of 2,4 -dichloro-6 nitrophenol ammonium (DCNPA) and its major metabolite. Mutation Research, 1996; 368: 149-155.

16 - Koifman S, Koifman R J, Meyer A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. Cadernos de Saúde Pública, 2002; 18 (2): 435-445.

17 - Pastor S, Gutiérrez S, Creus A, Cebulska-Wasilewska A, Marco R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. Mutation Research, 2001b; 495: 147-156.

18 - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX). Ministério da Saúde, Fiocruz. [www.fiocruz.br/sinitox](http://www.fiocruz.br/sinitox) (acessado em: 12/jul/2007).

19 - Levigard YE. A Interpretação dos Profissionais de Saúde Acerca das queixas de nervos no meio rural – Uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2001.

20 - Faria NMX, Fassa AG, Facchini LA. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para a realização de estudos epidemiológicos. Ciência e Saúde Coletiva, 2007; 2 (001): 25-38.

21 - Peres F, Oliveira-Silva J J, Della-Rosa H V, Lucca S R. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. Ciência & Saúde Coletiva, 2005; 10 (0); 27-37.

22 - Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa D, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan M., Sinks T, Tilson HA. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the USEPA –sponsored workshop. Environmental Health Perspect, 1996; 104 (4): 715-740.

- 23 - Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi P V, Mahboob M, Rahman RF, Vuyyuri SB, *et al.* Genotoxic Evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutation Research*, 2006; 609: 74-80.
- 24 - World Health Organization (WHO). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Preamble, 2006; Lyon, France.
- 25 - Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discovery Today*, 2002; 7 (22): 1128-1137.
- 26 - Ergene S, Çelik A, Çavas T, Kaya F. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environment International*, 2007; 33: 877-885.
- 27 - Gómez-Arroyo S, Díaz-Sánchez Y, Meneses-Pérez MA, Villalobos-Pietrini R, León-Rodríguez J. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research*, 2000; 466: 117-124.
- 28 - Pacheco A O, Hackel, C. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 2002; 18 (6): 1675-1683.
- 29 - Costa C, Silva S, Coelho P, Roma-Torres J, Teixeira JP, Mayan O. Micronucleus analysis in a Portuguese population exposed to pesticides : Preliminary survey. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2007; 210: 415-418.
- 30 - Kehdy FSG, Cerqueira EMM, Bonjardim MB, Camelo RM e Castro MCL. Study of cytogenetic effects of occupational exposure to pesticides on sanitation workers in Belo Horizonte, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 2007; 6 (3): 581-593.
- 31 - Mattiuzzo M, Fiore M, Ricordy R, Degrassi F. Aneuploidy-inducing capacity of two widely used pesticides. *Carcinogenesis*, 2006; 27 (12): 2511-2518.
- 32 - Bhalli JA, Khan QM, Haq MA, Khalid AM, Nasim A. Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in pesticides production industry. *Mutagenesis*, 2006; 21 (2): 143-148.

- 33 - Costa C, Teixeira JP, Silva S, Roma-Torres J, Coelho P, Gaspar J, Alves M, Laffon B, Rueff J, Mayan O. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis*, 2006; 21 (5): 343–350.
- 34 - Tope A, Bebe FN, Panemangalore M. Micronuclei frequency in lymphocytes and antioxidants in the blood of traditional limited-resource farm workers exposed to pesticides. *Journal of Environmental Science and Health part B*, 2006; 41: 843-853.
- 35 - Feng S, Kong Z, Wang X, Peng P, Zeng E Y. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005; 61: 239–246.
- 36 - Zeljezic D & Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in humans lymphocytes by 2,4 dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicology*, 2004; 200 (1): 39-47.
- 37 - World Health Organization (WHO). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Volume 30 Miscellaneous Pesticides, 1998.
- 38 - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) <http://www.sindag.com.br/> (acessado em 06/dez/2007).
- 39 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) Estatísticas Agrícolas. [http://www.agricultura.gov.br/portal/page?\\_pageid=33,968707&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL](http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,968707&_dad=portal&_schema=PORTAL) (acessado em 06/dez/2007).
- 40 - Aleem A, Malik A. Genotoxicity of the Yamuna River water at Okhla (Delhi), India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005; 61: 404–412.
- 41 - Pitarque M, Carbonell E, Lapena N, Marsa M, Torres M, Creus A. No increase in micronuclei frequency in cultured blood lymphocytes from a group of filling station attendants. *Mutation Research*, 1996; 367: 161-167.
- 42 - Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Meyer A, Perez F, Sarcinelli PN, Mattos RCO da C, *et al.* Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 2001; 35 (2): 130-135.
- 43 - Faria NMX, Facchini LA, Fassa AG. Rural work and pesticide poisoning. *Cad. Saúde Pública*, 2004; 20 (5): 1298-1308.

- 44 - Delgado I F, Paumgartten F J R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 2004; 20 (1): 180-186.
- 45 - Bréga SM, Vassilieff I, Almeida A, Mercadante A, Bissacot D, Cury PR, Freire-Maia DV. Estudos clínicos, citogenéticos e toxicológicos em trabalhadores expostos a pesticidas em Botucatu, São Paulo, Brasil. *Cadernos de saúde Pública*, 1998, 14 (3): 117-123.
- 46 - Bonner MR, Lee WJ, Sandler DP, Hoppin JA, Dosemeci M, Alavanja MCR.. Occupational Exposure to Carbofuran and the Incidence of Cancer in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives*, 2005; 113 (3): 285-289.
- 47 - Šrám RJ & Binková B. Molecular Epidemiology Studies on Occupational and Environmental Exposure to Mutagens and Carcinogens, 1997-1999. *Environmental Health Perspectives*, 2000; 108 (1): 57-70.
- 48 - Bonnassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 2007, 28 (3): 625-631.
- 49 - Andrade MG, Reis SRA, Robinson WM, Borges-Osório MR. Micronúcleo : um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. *Revista Odonto Ciência*, 2005; 20 (48): 137-141.
- 50 - Holland NT, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M.. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, 2008; 659: 93-108.
- 51 - Amorim LCA. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação de exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2003; 6 (1): 1-13.
- 52 - Nersesyan AK. Re: Gomez-Arroyo S, Díaz-Sanchez Y, Meneses-Pérez MA, Villalobos-Pietrini R, De Leon-Rodríguez J. Cytogenetic biomonitoring in Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research*, 2002; 513 (1-2): 223-225.
- 53 - Lucero L, Partor S, Suárez S, Durbán R, Gómez C, Parrón T, Creus A, Marcos R. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei

analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research*, 2000; 464: 255–262.

54 - Hagmar L, Strömberg U, Tinnenberg H, Mikoczy Z. The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2001; 204: 43-47.

55 - Prasad MPR, Mukundan MA, Krishnaswamy K. Micronuclei and Carcinogen DNA Adducts as Intermediate End Points in Nutrient Intervention Trial of Precancerous Lesions in the Oral Cavity. *Oral Oncology, European Journal of Cancer*, 1995; 31B (3): 155-159.

56 - Reis SRA, Espírito Santo AR, Andrade MGS, Sadigursky M. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Brazilian Oral Research*, 2006; 20 (2): 97-102.

57 - Nersesyan AK, Vardazaryan NS, Gevorgyan AL, Arutyunyan RM. Micronucleus level in exfoliated buccal mucosa cells of cancer patients. *Archive of Oncology* 2002; 10 (1): 35-36.

58 - Minissi S, Ciccotti E, Rizzoni M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research*, 1996; 367: 245-251.

59 - Zúñiga G, Torres-Bungarin O, Ramirez-Munoz MP, Ramos A, Fanti-Rodriguez E, Portilla E, *et al.* Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutation Research*, 1996; 369: 123-127.

60 - Smaka-Kincl V, Stegnar P, Lovka M. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Research*, 1996; 368: 171-179.

61 - Prasad MPR. Micronuclei and Carcinogen DNA adducts as intermediate end points in nutrient intervention trial of precancerous lesions in the oral cavity. *European Journal of Cancer. Part B: Oral Oncology*, 1995; 31 (3):155-159.

62 - U.S. Food and Drug Administration (FDA). Office of Food Additive Safety, Redbook 2007. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. IV.C.1.d. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 2007. [www.fda.gov/~redbook/red-toca.html](http://www.fda.gov/~redbook/red-toca.html) (acessado em 06/dez/2007).

63 - Schmid W. The Micronucleus test. *Mutation Research*, 1975; 31: 9 -15.

64 - Von Ledebur M. & Schmid W. The Micronucleus test Methodological Aspects. *Mutation*



Research, 1973; 19: 109-117.

65 - Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. Mutagênese ambiental. Canoas: Editora ULBRA; 2003.

66 - Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. Mutation Research, 2008; 638: 37-47.

67 - Tucker JD & Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. Mutation Research, 1996; 365:147-159.

68 - Rosin MP, Gilbert A. Modulation of genotoxic effect in humans, in: M.L. Mendelson, R.I. Albertini (Eds.), Mutation and the Environment, Part E. Wiley, New York, NY, 1990, pp. 351–359.

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

70 - Suhas S, Ganapathy KS, Gayatri Devi, Ramesh C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. Mutation Research, 2004; 561:15–21.

71 - Wu P, Lohc C H, Hsieh LL, Liu TY, Chen CJ, Liou SH. Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. Mutation Research, 2004; 562: 27–38.

72 - Fenech M, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmüller S, Holland N. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells – a Human Micronucleus (HUMN) project ([www.humn.org](http://www.humn.org)) initiative commencing in 2007. Mutagenesis, 2007; 1: 3-4.

73 - Speit G, Schmid O, Fröhler-Keller M, Lang I, Triebig G. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. Mutation Research, 2007; 627: 129-135.

74 - Squier CA & Kremer MJ. Biology of Oral Mucosa and Esophagus. Journal of the National Cancer Institute Monographs, 2001; 29: 7 – 15.

75 - Roth DM, Zechlinsk G, Martino-Roth MG. Avaliação de genotoxicidade em Cirurgiões-

Dentistas da cidade de Pelotas-RS através do teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal. Ver. Fac. Odontol. Bauru, 2002; 10 (4): 209-214.

76 - Aquavella J, Olsen G, Cole P, Ireland B, Kaneene J, Schuman S, Holden L. Cancer among farmers: a meta-analysis. *Ann. Epidemiol.*, 1998; 8: 64-74.

77 - Blair A & Zahm SH. Agricultural exposures and cancer. *Environmental Health Perspectives*, 1995; 103 (8): 205-208.

78 - Keller-Byrne JE, Khuder SA, Schaub E A. Meta-analysis of leukemia and farming. *Environ. Res.*, 1995; 71: 1-10.

79 - Keller-Byrne JE, Khuder SA, Schaub E A. Meta-analysis of prostate cancer and farming. *Am. J. Ind. Med.*, 1997; 31: 580-586.

80 - Khuder SA & Mutgi AB. Meta-analysis of multiple myeloma and farming. *Am. J. Ind. Med.*, 1997; 32: 510-516.

81 - Castro R, Ramírez V, Cuenca P. Micronúcleos y otras anormalidades nucleares en El epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Revista de Biología Tropical* , 2004; 52 (3):

82 - Pastor S, Creus A, Parrón T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S, Marcos R. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*, 2003; 18 (3): 249-258.

83 - Pastor S, Lucero L, Gutiérrez S, Durbán R, Gómez C, Parrón T, Creus A, Marcos R. A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis*, 2002; 17 (1): 79-82.

84 - Casartelli G, Monteghirfo S, De Ferrari M, Bonatti S, Scala M, Toma S, Margarino G, Abbondandolo A. Staining of micronuclei in squamous epithelial cells of human oral mucosa, *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 1997; 19: 475-481

85 - Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Bigatti MP, Bolognesi C, Cao J, De Luca G, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hadjidekova VV, Hrelia P, Jaworska A, Joksic G, Krishnaja AP, Lee TK, Martelli A, McKay MJ, Migliore L, Mirkova E, Müller Wu, Odagiri Y, Orsiere T, Scarfi MR, Silva MJ, Sofuni T, Surrales J, Trenta G, VorobtsovaI, VralA, Zijno A,

HUMANMICRONUCLEUS project. Intra- and Inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in the binucleated human lymphocytes Results of an International slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research*, 2003; 534:45-64.

86 - Bolognesi C, Perrone E, Landini E. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis*, 2002, 7 (5): 391 – 397.

87 - Bloching M., Reich W., Schubert J., Grummt T. and Sandner A. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral Oncology*, 2007; 44 (3): 220-226.

88 - Blair A, Zahm SH, Pearce NE, Heineman EF, Frumeni Jr JF. Clues to cancer etiology from studies of farmers. *Scand. J. Work. Environ. Health*, 1992; 18: 209-215.

89 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)  
<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/020409.htm> (acessado em 20/06/2009)