



## A EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL LEVA A DANOS GENÉTICOS EM TRABALHADORES DA LAVOURA DE FUMO

Caroline Cardoso Nicolau<sup>1</sup>  
Vivian Kahl<sup>2</sup>  
Juliana da Silva<sup>3</sup>

### Resumo

Os trabalhadores de diferentes áreas ocupacionais estão diariamente expostos a uma diversidade de fatores ambientais que podem prejudicar a sua saúde. No Brasil, o setor fumageiro exerce grande importância na atividade econômica e social no país. Na fumicultura os indivíduos estão expostos a agroquímicos sintéticos e a nicotina (presente na folha do fumo) que constituem um potente efeito tóxico a esses agricultores. O objetivo deste estudo foi analisar os fumicultores cronicamente expostos a baixas doses de agroquímicos e nicotina em relação aos possíveis efeitos genotóxicos decorrentes da exposição ocupacional, através do Ensaio Cometa (EC) alcalino e modificado com as enzimas FPG e OGG1. Foram avaliados 101 indivíduos, 48 deles do grupo controle e 53 do exposto. Foram realizadas coletas de sangue periférico e cada indivíduo respondeu a um questionário. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa de índice de danos ao DNA entre os grupos controle e exposto, tanto para o Ensaio Cometa alcalino quanto o modificado com a enzima FPG. Porém, houve aumento significativo de índice de danos nas lâminas tratadas com FPG ( $P < 0,0001$ ) e OGG1 ( $P < 0,0001$ ), comparados ao teste alcalino, para indivíduos expostos a agroquímicos sintéticos e à nicotina. Os dados demonstram que esses danos são principalmente de origem oxidativa, pois essas enzimas atuam tentando reparar esses danos em algumas das bases nitrogenadas. Assim, torna-se cada vez mais indispensável o biomonitoramento desses fumicultores, e o cuidado com a proteção individual durante a manipulação dos agroquímicos e durante toda a safra.

Palavras-chave: Ensaio Cometa; FPG; fumicultura; genotoxicidade; danos oxidativo.

### INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de tabaco em todo o mundo, produzindo mais de 650.000 toneladas de tabaco por ano e 90% dos campos de tabaco brasileiros estão no Rio Grande do Sul. Cerca de 484 municípios do Rio Grande do Sul desenvolvem a cultura do fumo que envolvem em torno de 200.000 famílias de agricultores. O setor fumageiro exerce grande importância na atividade econômica e social no país, gerando milhares de empregos (AFUBRA, 2013). Embora elas forneçam uma elevada contribuição financeira ao país, fazendas de tabaco apresentam diversos problemas em relação a saúde dos agricultores. Agroquímicos são amplamente utilizados na fumicultura, para proteger a plantação de insetos

---

1 Aluna do curso de graduação de Biomedicina – Bolsista PIBITI/CNPq – caroline\_nicolau@hotmail.com

2 Aluna doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde. – Bolsista PROSUP/CAPES – vivian.kahl@gmail.com

3 Professor do curso de graduação de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – juliana.silva@ulbra.br

e doenças, e constituem um potente efeito tóxico a seres humanos, em especial, aos trabalhadores das lavouras que estão expostos ocupacionalmente a esses agentes. Esses agrotóxicos como herbicidas, inseticidas, fungicidas e antibrotantes, se tornam possíveis fatores para o surgimento de doenças mentais e aumento de suicídios em famílias envolvidas com a plantação de fumo. A exposição aguda e crônica aos agrotóxicos, que podem ser absorvidos por inalação, ingestão ou exposição dérmica pode causar diversas doenças, como vários tipos de câncer, lesões hepáticas, lesões renais, distúrbios do sistema nervoso, esterilidade masculina, reações alérgicas, entre outras (BOLOGNESI 2003; ANGERER et al., 2007).

Além dos agrotóxicos o trabalhador também está exposto à nicotina (pesticida natural presente na folha de fumo), que quando entra em contato com o tecido dermal pode provocar a doença *Green Tobacco Sickness* (GTS), ou doença da folha verde, que possui sintomas diversos, sendo atribuídos ao envenenamento agudo por nicotina. A exposição à nicotina é intensificada no momento da colheita, pois à medida que as folhas amadurecem são colhidas manualmente e as folhas molhadas colhidas nas primeiras horas da manhã, bem como os suores do corpo, facilitam a absorção dérmica (FASSA et al., 2014). É importante e necessário que se faça um biomonitoramento desse risco ocupacional ao quais os fumicultores estão expostos, para avaliar o efeito crônico que essa exposição pode causar, pois a exposição aguda já é bem identificada e possui efeitos imediatos. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar os produtores de fumo cronicamente expostos a baixas doses de agroquímicos e nicotina em relação aos possíveis efeitos genotóxicos decorrentes da exposição ocupacional, através do Ensaio Cometa (EC) alcalino e modificado com enzimas.

## **METODOLOGIA**

Para esse estudo foram avaliados 101 indivíduos das cidades de Santa Cruz do Sul e Sobradinho (RS). Desses, 53 indivíduos eram expostos e 48 indivíduos controles. A média de idade do grupo controle foi de 40,9 ( $\pm 12,4$ ; desvio padrão, DP) anos e do grupo exposto 49,5 ( $\pm 13,6$ ) anos, com média de 24,5 ( $\pm 16,1$ ) anos de trabalho na lavoura de fumo. Deste, 88% afirmaram não usar o equipamento de proteção individual (EPI) ou não usá-lo por completo. Os indivíduos responderam a um questionário epidemiológico adaptado (CARRANO; NATARAJAN 1988) e amostras de sangue periférico foram coletadas. Foi utilizado o Ensaio Cometa alcalino e o modificado, com as enzimas FPG e OGG1 para identificação de possíveis danos genotóxicos. Esse projeto faz parte de um doutorado aprovado pelo CEP da ULBRA e pelo CONEP sob número de protocolo 35639814.5.0000.5349.

O Ensaio Cometa é um teste utilizado para detectar dano e possível reparo no DNA de células. O método consiste na lise de membranas celulares, seguido pela indução da migração dos fragmentos do DNA em gel de agarose. O ensaio cometa alcalino foi realizado como descrito por Singh, et al. (1988) e modificado por Silva et al. (2000). As lâminas foram recobertas com agarose e amostra de sangue periférico (10 $\mu$ L) foram embebidas em 90 $\mu$ L de agarose com baixo ponto de fusão. Após a solidificação da mistura as lâminas foram mergulhadas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0-10,5) contendo 1 % (v/v) de Triton X-100 e 10 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO), protegidas da luz, a 4°C. Após 24 horas no tampão de lise as lâminas foram colocadas em cubeta de eletroforese horizontal, sendo cobertas por solução tampão alcalina (300 mM NaOH e um mM EDTA, pH > 13) recém preparada. Após o DNA foi submetido à eletroforese a 25 volts (0,90 V/cm) e 300 mA. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com solução tampão 0,4 M Tris (pH 7,5) e coradas com solução de nitrato de prata.

O ensaio cometa modificado com a enzima FPG é utilizado para detectar danos oxidativos de bases purinas (guanina e adenina), pois essa enzima atua tentando reparar esses danos. Da mesma forma, a enzima OGG1 atua reparando danos oxidativos em guaninas. Os

ensaios modificados seguem a mesma metodologia do ensaio cometa alcalino, porém, a diferença é que após as lâminas ficarem em exposição à lise, elas são colocadas em contato com a enzima em uma câmara úmida a 37°C, permanecendo por 40 minutos (COLLINS et al., 2008).

A análise foi realizada em 100 células por tratamento (50 por lâmina), utilizando microscópio óptico, onde as células foram classificadas em cinco diferentes classes de danos de acordo com o tamanho da cauda, sem danos (classe 0) até o dano máximo (classe 4). Os resultados são apresentados como unidades arbitrárias de índices de danos.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos pelo Ensaio Cometa mostraram que não houve diferença significativa entre indivíduos expostos e controles, tanto para o teste alcalino ( $P= 0,08$ ), quando com FPG ( $P= 0,25$ ). Porém, quando comparamos dentro dos mesmos grupos (controle alcalino x controle FPG e exposto alcalino x exposto FPG), há aumento significativo do índice de danos quando as lâminas são tratadas com FPG ( $P < 0,0001$ ; Tabela 1). Os danos ao DNA causados pelos agroquímicos e pela nicotina são significativamente mais evidentes quando as lâminas são tratadas com FPG, mostrando assim, que danos relacionados a exposição a agroquímicos são de origem oxidativa, conforme já observado na literatura (DA SILVA et al., 2012; KAHL et al., 2016). Acreditamos que não houve aumento significativo de danos ao DNA no tratamento alcalino em decorrência do tamanho amostral para esse estudo ou então que o dano primordial nessa exposição ocupacional é realmente de origem oxidativa. Tanto os agroquímicos sintéticos quanto a nicotina já são conhecidos na literatura como causadores de estresse oxidativo (ATTIA 2007; DA SILVA et al., 2012; KAHL et al., 2016), justificando assim, os resultados obtidos nesse estudo.

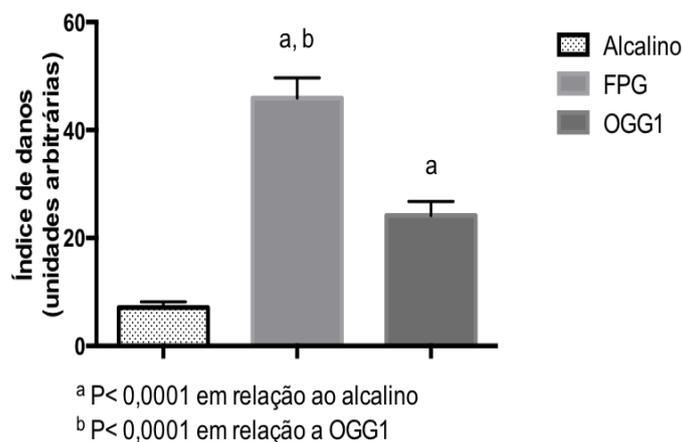
Tabela 1. Resultados do Ensaio Cometa alcalino e modificado com enzima FPG para os grupos controle e exposto (resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; teste Mann-Whitney)

Grupos	Ensaio Cometa	
	Alcalino	FPG
Controle (n= 48)	10,10 $\pm$ 1,35	40,77 $\pm$ 3,62 <sup>a</sup>
Exposto (n= 53)	7,14 $\pm$ 1,05	45,94 $\pm$ 3,72 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0,0001$  em relação ao teste alcalino, no mesmo grupo.

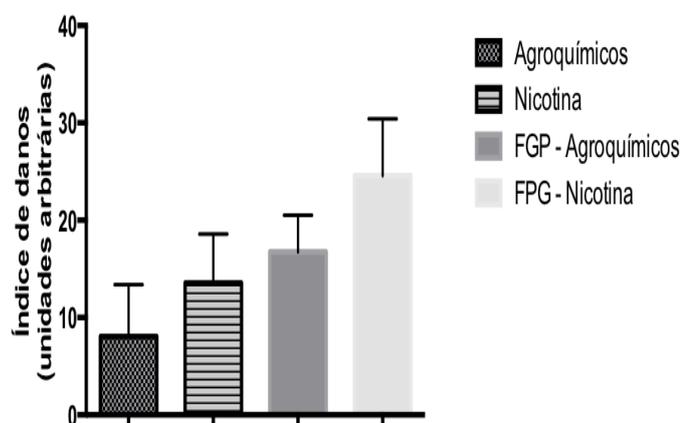
Quando comparados tipos de tratamentos das lâminas apenas nos indivíduos expostos, tanto o tratamento com FPG quanto com OGG1 apresentaram índice de danos significativamente maiores do que o índice de danos do teste alcalino ( $P < 0,0001$ ; Figura 2). O tratamento FPG também foi significativamente maior do que OGG1 ( $P < 0,0001$ ; Figura 2). Os danos oxidativos em indivíduos expostos ocupacionalmente são os mais relevantes para a genotoxicidade e uma das bases nitrogenadas mais sujeita a esse tipo de dano é a guanina (MARKKANEN et al., 2012). É comum que o tratamento com OGG1 apresente um índice menor de danos do que o tratamento com FPG, pois a OGG1 representa apenas os danos da guanina, enquanto a FPG representa tanto a guanina quanto a adenina.

**Figura 2.** Resultados para o Ensaio Cometa dos indivíduos expostos com relação ao teste alcalino e modificado com enzimas FPG e OGG1 (média  $\pm$  erro padrão; teste Mann-Whitney).



Quinze indivíduos expostos foram coletados em duas épocas da safra: aplicação de agroquímicos (plântio) e colheita. Os resultados obtidos pelo Ensaio Cometa alcalino e modificado mostraram que não há diferença significativa, independente se a coleta de sangue foi feita na época de aplicação de agroquímicos ou de colheita da folha de fumo (exposição a nicotina). Ainda assim, podemos observar um aumento de índice de danos na época de colheita, quando o indivíduo está exposto a nicotina, comparando com a aplicação de agroquímicos, para ambos os tratamentos (Figura 3). Este dado coincide com o resultado recente de Da Silva et al. (2014) que observou aumento significativo de danos na época de colheita das folhas do tabaco. Para resultados ainda mais precisos estamos aumentando o número amostral das coletas nas diferentes etapas da safra e ainda, incluir entre as análises a entressafra.

**Figura 3.** Resultados para o Ensaio Cometa de indivíduos expostos (n= 15) com relação ao teste alcalino e modificado com enzimas FPG, em duas diferentes épocas da safra: aplicação de agroquímicos e colheita, com exposição a nicotina (média  $\pm$  erro padrão; teste Mann-Whitney).



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos nesse estudo, demonstram-se evidências de danos genotóxicos devido à exposição ocupacional ao longo prazo por agroquímicos sintéticos e

nicotina e que esses danos são principalmente decorrentes de fatores oxidativos. Portanto, torna-se cada vez mais evidente que essas populações precisam ser biomonitoradas e que o uso de equipamento de proteção individual (EPI) na sua forma completa é imprescindível.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio financeiro da ULBRA, do CNPq, da CAPES e da FAPERGS (Processo SPI n. 0428-2551/14-2).

## REFERÊNCIAS

- AFUBRA (Associação dos Fumicultores do Brasil). 2013. Fumicultor Sul-Brasileiro. Disponível em: <http://www.afubra.com.br/index.php/conteudo/show/id/76> [Acesso em: 13.12.13].
- ANGERER, J.; ULRICH, E.; WILHELM, M. Humanbiomonitoring: stateof art. *Int J HygEnviron Health*, v. 210, p. 201-228, 2007.
- ATTIA, S.M.Chromosomalcompositionofmicronuclei in mouse bone marrowtreatedwithrifampicinandnicotine, analyzedby multicolor fluorescence in situ hybridizationwithpantcentromeric DNA probe.*Toxicology*, v. 235, p. 112–118, 2007.
- BOLOGNESI, C. Genotoxicity ofpesticides: a reviewofhumanbiomonitoringstudies. *Mutat Res*, v. 543, p. 251-272, 2003.
- COLLINS, A.R. et al. The cometassay: topical issues. *Mutagenesis*, v. 23, p. 143-151, 2008.
- DA SILVA, F.R. et al. Genotoxic biomonitoringoftobaccofarmers: biomarkersofexposure, ofearlybiologicaleffectsandofsusceptibility. *J HazardMat*, v. 225-226, p. 81-90, 2012.
- DA SILVA F.R.; KVITKO, K.; ROHR, P.; ABREU, M.B.; THIESEN, F.V.; SILVA, J. Genotoxic assessmentin tobaccofarmersatdifferentcrop times. *Sci Total Environ*, v. 490, p. 334-341, 2014.
- FASSA A.G.; FARIA, N.M.; MEUCCI, R.D.; FIORI, N.S.; MIRANDA, V.I.; FACCHINI, L.A. Green tobaccosicknessamongtobaccofarmers in Southern Brazil. *Am J IndMed*, v. 57, p. 725-735, 2014.
- KAHL et al. Telomeremeasurement in individuals occupationally exposed to pesticides mixtures at tobaccofields. *Environ Mol Mutagen*, v. 57, p. 74-84, 2016.
- MARKKANEN, E.; HÜBSCHER, U.; VAN LOON, B. Regulationofoxidative DNA damagerepair. *CellCycle*, v. 11, p. 1070-1075, 2012.
- SILVA et al. Effectsofchronicexposureto coal in wildrodents (*Ctenomystorquatus*) evaluatedbymultiplemethodsandtissues. *Mutat Res*, v. 470, p. 39-51, 2000.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simpletechnique for quantificationoflowlevelsof DNA damage in individual cells. *ExpCell Res*, v. 175, p. 184-191, 1988.