

SIMONE CONCEIÇÃO MACIEL

**DESENVOLVIMENTO BIOSSENSOR
COLORIMÉTRICO PARA TRIAGEM DE
CONTAMINAÇÃO POR CARBAMATOS
E ORGANOFOSFORADOS**

Trabalho final do Mestrado Profissional,
apresentado à Universidade do Vale do
Sapucaí, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Aplicadas à Saúde.

POUSO ALEGRE – MG

2017

SIMONE CONCEIÇÃO MACIEL

**DESENVOLVIMENTO BIOSSENSOR
COLORIMÉTRICO PARA TRIAGEM DE
CONTAMINAÇÃO POR CARBAMATOS
E ORGANOFOSFORADOS**

Trabalho final do Mestrado Profissional,
apresentado à Universidade do Vale do
Sapucaí, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Aplicadas à Saúde.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Manoel Araújo Teixeira

COORIENTADORES: Prof. Dr. José Antônio Soares

Prof. Dr. José Dias da Silva Neto

POUSO ALEGRE – MG

2017

Maciel, Simone Conceição

Desenvolvimento biossensor colorimétrico para triagem de contaminação por carbamatos e organofosforados./Simone Conceição Maciel. – Pouso Alegre: UNIVAS, 2017.
38f.

Trabalho Final do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade do Vale do Sapucaí.

Título em inglês: Development of colorimetric biosensor for sorting of contamination by carbamates and organophosphates

Orientador: Prof. Prof. Dr. Manoel Araújo Teixeira

Coorientadores: Prof. Dr. José Antônio Soares/ Prof. Dr. José Dias da Silva Neto

1. Biossensor.
2. acetilcolinesterase.
3. morango.
4. 5.organofosforados. 6. carbamatos I. Título.

CDD: 628.16

UNIVERSIDADE DO VALE DO SAPUCAÍ

**MESTRADO PROFISSIONAL EM
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE**

COORDENADOR: Prof. Dr. Taylor Brandão Schnaider

Linha de Atuação Científico-Tecnológica: Padronização de procedimentos e inovações em lesões teciduais

Dedico este trabalho ao meu amado marido Reginaldo Bueno Pereira,
aos meus pais Benedito Maciel e Maria Maciel por acreditar e investir em mim,
à minhas amadas irmãs Eliane, Elaine e Fabiane,
ao meu querido tio Francisco Xavier Maciel,
aos meus familiares e amigos pelas alegrias, tristezas e dores
compartilhadas no processo de obtenção deste título tão almejado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela existência e por poder a cada dia, tornar-me digna de sua essência e luz.

Ao Prof. Dr MANOEL ARAÚJO TEIXEIRA, professor do programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas a Saúde da Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVÁS), orientador deste trabalho, pelo direcionamento, orientações, correções, sugestões e por sua incansável paciência no decorrer de todo o processo e principalmente por me ensinar a ser pesquisadora.

Ao Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO SOARES, pela orientação deste trabalho, pelas correções e sugestões.

Ao Prof. Dr. JOSÉ DIAS DA SILVA NETO, professor do programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas a Saúde da UNIVÁS pelas orientações e sugestões, a minha admiração por tanta dedicação e competência.

Aos Professores LYDIA MASAKO FERREIRA, DANIELA FRANCESCATO VEIGA, DIBA MARIA SEBBA TOSTA DE SOUZA, GERALDO MAGELA SALOMÉ, FIORITA GONZALES LOPES MUNDIN, MARIA JOSÉ AZEVEDO DE BRITO. ROCHA, TAYLOR BRANDÃO SCHNAIDER, ANA BEATRIZ ALKMIM TEIXEIRA LOYOLA e ADRIANA RODRIGUES DOS ANJOS MENDONÇA por todos os ensinamentos, orientações e sugestões tão importantes para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr NEIL FERREIRA NOVO e à Prof^a. Dr.^a YARA JULIANO, professores de bioestatística do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Saúde da UNIVÁS, pela orientação e condução da análise estatística dos resultados deste trabalho.

Aos coordenadores da UNIVÁS VIRTUAL, JULIANA E CLÉBERSON, pela oportunidade em fazer parte da equipe de tutores.

Agradeço a UNIVÁS VIRTUAL pela bolsa concedida.

Agradeço a todos os agricultores, pela boa vontade em participar da pesquisa.

Aos profissionais da Cooperativa dos Morangueiros Pantanense (COOMPA), pela recepção e a colaboração em nosso projeto.

Aos demais profissionais do laboratório de Biologia da Univás e equipe de saúde do PSF de Bom repouso. Muito abrigada pela colaboração.

Por fim, ao longo de todo o processo que levou à realização desta defesa, tive a o privilégio de ter convivido com pessoas realmente fantásticas, que me apoiaram em todos os sentidos, que me deram palavras de incentivo e fé, pessoas das quais nunca vou me esquecer. Todas as palavras que aqui dedico não serão suficientes para descrever a quanto privilegiada me sinto por tê-las em minha vida.

*O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.*

José de Alencar (1829- 1877)

RESUMO

Contexto: organofosforados e carbamatos são produtos químicos utilizados na agricultura com potencial para causarem contaminação nos seres humanos e que contribui para o desenvolvimento de lesões teciduais. **Objetivo:** desenvolver um biossensor colorimétrico para detectar contaminação por organofosforados e carbamatos em amostras de urina de residentes rurais que trabalham com a cadeia de produção de morangos. **Método:** é um estudo primário, observacional, analítico, prospectivo e transversal, participaram da pesquisa 75 agricultores das cidades de Bom Repouso e Pouso Alegre, que trabalhassem no manuseio direto com carbamatos e organofosforados. No estudo in vivo, em um recipiente de vidro foi colocado 8 μL de acetilcolinesterase e mais 8 μL do reagente Ellman's (DTNB), e em seguida adicionado 10 μL da amostra de urina. Essa mistura ficou sob reação por 20 minutos, quando foi adicionado 20 μL de acetilcolina. Durante cinco minutos observou-se se havia a coloração de amarelo da reação para os casos de não contaminação por agrotóxico, e incolores para os casos de contaminação. Todas as amostras avaliadas pelo biossensor foram comparadas com o teste bioquímico de colinesterase plasmática. **Resultados:** o biossensor diagnosticou 11 agricultores com contaminação, dos quais 4 foram confirmados pelo teste da colinesterase plasmática no sangue, dois ficaram na zona limítrofe dos valores de referência e cinco deram como contaminação falsa positiva. Todas as avaliações de não contaminação pelo biossensor foram confirmadas pelo teste padrão de colinesterase plasmática. **Conclusão:** o biossensor mostrou ser confiável e seguro para triagem de contaminações de moradores de zona rurais pelos grupos químicos dos carbamatos e organofosforados.

Palavras-chave: Biossensor. Acetilcolinesterase. Morango. Organofosforados. Carbamatos.

ABSTRACT

Context: organophosphates and carbamates are pesticides used in agriculture with the potential to cause contamination in humans. **Objective:** to mount a colorimetric biosensor for qualitative screening of organophosphates and carbamates contamination in urine samples of rural residents who work with the strawberry production chain. **Material:** 75 people, including farmers and residents of Bom Repouso and Pouso Alegre, who worked in the direct or indirect handling of carbamates and organophosphates, were included in this study. 8 μl of acetylcholinesterase and 8 μl of Ellman's reagent (DTNB) were placed in a glass recipient, and then 10 μl of the urine sample was added. This mixture was under-reacted for 20 minutes when 20 μl of acetylcholine was added. For five minutes it was observed if there was the yellow staining of the reaction for the cases of non-contamination by pesticide, and colorless for the cases of contamination. All samples evaluated by the biosensor were compared with the clinical test of plasma cholinesterase. **Results:** contamination was reported in 11 farmers, four of whom were confirmed by blood plasma cholinesterase test, two were in the borderline reference range, and five were found to be false positive contamination. All evaluations of non-contamination by the biosensor were confirmed by the standard plasma cholinesterase assay. **Conclusion:** the biosensor showed to be reliable and safe for the screening of contaminations of rural inhabitants by the chemical groups of carbamates and organophosphates.

Keywords: Biosensor. Acetylcholinesterase. Strawberry. Organophosphate. Carbamates

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Por cento – uma parte em cem partes
°	Graus
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
AChE	Acetilcolinesterase
ATCh	Acetilcolina
BSA	Albumina de soro bovino
COOMPA	Cooperativa dos Morangueiros Pantanenses
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (Reagente de Ellman)
EPI's	Equipamentos de proteção individual
<i>et al</i>	E colaboradores
F	Feminino
H	Horas
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
L	Litros
Ltda	Limitada
M	Masculino
M	Medida
Mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
n°	Número
Na ₂ HPO ₄	Monohidrogenofosfato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecidas
TNB	Cor amarelada
Un	Unidade
RPM	Revolução por minutos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A e B: vidros de Durhan utilizados como suporte para indicação da reação colorimétrica.....	12
Figura 2 - Participante da pesquisa segundo o gênero	13
Figura 3 - Intoxicações detectadas pelo biossensor e confirmadas pelo teste da colinesterase.....	14
Figura 4 - Modelo do biossensor	16
Figura 5 - Modelo expandido do biossensor.	18

TABELA

Tabela 1- Quantidades de soluções que contem no biossensor.....09

Tabela 2 - Características dos voluntários avaliados no projeto quanto ao sexo, idade, pH, resultado do sensor, colinesterase plasmática e valore de referência.....34

SUMÁRIO

1 CONTEXTO	1
1.1 A produção de morango.	1
1.2 O cenário agrícola e a exposição do agricultor aos agrotóxicos aplicados na cultura do morango.	1
1.3 Biossensores e potencial de aplicações	4
2 OBJETIVO	6
3 MÉTODOS.....	7
3.1 Delineamento do estudo	7
3.2 Critérios éticos para coleta das amostras	7
3.2.1 Critérios de inclusão	7
3.2.2 Critérios de não inclusão	7
3.2.3 Critérios de exclusão	7
3.3 Construção do biossensor	7
3.3.1 Preparo das Soluções	8
3.3.2 Suporte para o biossensor	9
3.4 Testes comparativos in vivo dos resultados do biossensor e da acetilcolinesterase plasmática (sangue)	10
3.5 Análise estatística dos dados	11
4 RESULTADOS/PRODUTO	12
4.1 Resultado	12
4.2 Produto	15
4.2.1 Descrição do biossensor colorimétrico.....	15
4.2.2 - Estrutura do biossensor.....	15
4.2.3 - Os testes	16
4.2.4- O lacre	17
4.2.5 Equipamentos auxiliares.....	17
4.2.6 Condições de armazenamento e transporte.....	18
4.2.7 Cuidados especiais.....	18
4.2.8 Condições para ocorrência das reações.....	19
4.2.9 Valores de referência.....	19
4.3 A metodologia	19

5 DISCUSSÃO	20
5.1. Aplicabilidade.....	22
5.2. Impacto Social	23
6. CONCLUSÃO.....	25
7. REFERÊNCIAS	26
8 ANEXOS	31

1 CONTEXTO

1.1 A produção de morango.

No Brasil, a produção total do morango alcançou, em 2011, 133 mil toneladas e ocupou 3.718 hectares de área (EMATER, 2011). Para 2015, foram previstos, 105 mil toneladas da fruta; algo em torno de 30 toneladas/hectare (ha), podendo dobrar esses números em lugares que tenham culturas mais tecnificadas (REISSER JR; ANTUNES, 2014). Apesar de não configurar como uma das principais “*commodities*” no cenário comercial brasileiro e do mundo, o investimento em tecnologia é constante na busca por maior produção e menor número de problemas fitossanitários, principalmente em pequenas propriedades. A introdução de variedades mais resistentes, utilização de novas tecnologias e os avanços da comercialização e as condições climáticas favoráveis ao cultivo são fatores que impulsionaram a produção de morango no país (DUARTE FILHO, 2006; FACHINELLO, 2011).

Minas Gerais foi o primeiro estado a produzir morango (*Fragaria ananassa*), seguido do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (FAEMG, 2016). O cultivo dessa fruta é de considerável expressão econômica para esses estados e também para o Espírito Santo (PEREIRA *et al.*, 2013) e Santa Catarina que produzem em menor quantidade. O cultivo do morango pode ser encontrado em aproximadamente 106 municípios brasileiros (REISSER JR; ANTUNES, 2014).

O maior produtor do país em 2011 foi Minas Gerais, a produção alcançou 72 mil toneladas de morango em 1.790 hectares (EMATER, 2011). Já em 2012, a área plantada aumentou para 1.926 hectares (ha) e a colheita chegou a 89,4 mil toneladas (EMATER, 2013). O Sul de Minas é a principal região produtora do estado, tendo como destaques os municípios de Espírito Santo do Dourado com 270 ha; Estiva com 234 ha; Bom Repouso e Senador Amaral, 200 ha e Pouso Alegre com 144 ha (FAEMG, 2016).

1.2 O cenário agrícola e a exposição do agricultor aos agrotóxicos aplicados na cultura do morango.

Os agrotóxicos são uns dos mais importantes fatores de riscos para a saúde humana. Trabalhos científicos têm relatado preocupações de pesquisadores e instituições com as elevadas concentrações de agrotóxicos em amostras de morango analisadas pela ANVISA, as quais demonstraram que desde 2002, ela encontra-se no “ranking” das frutas mais

contaminadas no Brasil (OSHITA, JARDIM 2012; OSHITA, JARDIM 2015). Os últimos resultados apresentados no relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) no ano de 2012, o morango foi o alimento com o maior grau de contaminação entre as amostras analisadas, sendo que do percentual de 59% de insatisfação das amostras, 38% delas estavam contaminadas com agrotóxicos não autorizados para a cultura, 6% estavam acima dos limites máximos permitidos para os agrotóxicos liberados e 15% apresentavam as duas irregularidades. Mais preocupante ainda é o relato de mais de 30 ingredientes ativos que não são permitidos para uso no cultivo do morangueiro, entre os quais estão o metamidofós e endossulfam que foram proibidos para uso no Brasil, além de captana, carbendazim e clorpirifós que possuem uso restrito (ANVISA, 2013).

Quase todos os funcionários e patrões que trabalham em uma lavoura de morango tem contato direto ou indireto com agrotóxicos, seja no preparo da calda química para a aplicação do produto, na aplicação dos pesticidas ou mesmo em ambas. O tempo médio de exposição do funcionário que faz a aplicação dos produtos químicos é de quase duas horas por aplicação (MESQUITA FILHO; PEREIRA 2011).

Os organofosforados e carbamatos, a partir da década de 70, passaram a serem os pesticidas mais utilizados no mundo. Desde então, têm aumentado drasticamente os casos de intoxicação por efeitos tóxicos pela exposição aguda ou crônica, mesmo em baixas doses. Um dos principais desafios para enfrentar a contaminação por agrotóxico é compreender mais profundamente sua ação, tanto sobre o meio ambiente quanto sobre a saúde humana (BEDOR, 2008). No Sistema de Informações sobre Agrotóxicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estão registrados 38 substâncias ativas da classe dos organofosforados, entre eles, acefato, bromofós, clorpirifós, diazinona, diclorvós, etoprofós, fenclorvós, fentiona, malationa, metamidofós, parationa metílica, pirimifós e temefós (ANVISA *et al.*, 2013). No entanto, não são todos liberados ou registrados para o uso no cultivo do morango.

Os organofosforados (OPs), historicamente usados como inseticidas e como agentes químicos de guerras, são de grande importância para a saúde pública, por sua elevada toxicidade. O metamidofós, a parationa metílica, o fosmete, o forate, o triclorfom, o carbofurano, o monocrotofós, o clorpirifós e o acefato pertencem ao grupo químico dos OPs, e alguns foram incluídos no processo de revisão de seus registros pela ANVISA. Os OPs são inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase (AChE) e provocam efeitos tóxicos sobre os diferentes sistemas dos seres vivos a eles expostos (EDWARDS; TCHOUNWOU, 2005),

Os carbamatos são utilizados como inseticidas e herbicidas. Entre eles, profam, clorprofam, barban, asulam, carbutilato, clorbufam, desmedifam, suepe, carbaril e carbofurano (GALLI *et al.*, 2006).

Os efeitos dos carbamatos e organofosforado sobre o SNC incluem cefaleia, tonturas, inquietação, ansiedade, insônia, confusão, tremor, disartria, ataxia, e, em casos graves, convulsões, coma e depressão do centro respiratório. A fraqueza e paralisia musculares são de particular relevância, uma vez que podem culminar em paralisia respiratória e morte. As intoxicações severas por organofosforados resultam numa paralisia despolarizante, precedida por espasmos musculares e fasciculações. Frequentemente, é necessária ventilação mecânica uma vez que pode ocorrer paralisia dos músculos estriados intercostais e diafragmáticos, outras doenças podem ocorrer no SNC, tais como, Alzheimer e Parkinson (KING e AARON, 2015).

Grande número de intoxicação se deve principalmente ao uso inadequado de agrotóxicos, por não serem seguidas as recomendações dos rótulos e bulas dos produtos, por não utilizarem os equipamentos de proteção individual, por falta de acesso à informação técnicas dos produtos, pelo fácil acesso aos produtos mais perigosos e a falta de capacitação para seu uso (GARCIA e FILHO, 2005).

Diante dos sintomas descritos e da alta mortalidade que é atribuída ao trabalho rural, faz-se necessário o estabelecimento de determinadas normas para que sejam reguladas todas as etapas que envolvam a utilização desses insumos. Em geral, leva em conta na atualidade, apenas a utilização de novas substâncias para pesquisa, desenvolvimento de novos produtos e culminam com o descarte final de embalagens (TERRA, 2008; VERGER e BOOBIS, 2013). A exposição ocupacional do agricultor é vista como uma preocupação, mas com poucos trabalhos direcionados para solução dessa problemática, tanto pelas universidades, como também pelas indústrias e pelos órgãos responsáveis pela fiscalização dessa atividade (TERRA, 2008; VERGER e BOOBIS, 2013).

A intoxicação aguda por inibidores da acetilcolinesterase como os organofosforados e carbamatos foi descrita como a causa responsável por mais mortes do que qualquer outra classe química (KING; AARON, 2015). Estes compostos são particularmente preocupantes nos países em desenvolvimento, onde pesticidas altamente tóxicos estão facilmente disponíveis e estão na base de exposições acidentais (GUNNELL *et al.*, 2007).

Em um estudo sobre as substâncias aplicadas na agricultura foi revelado para os agrotóxicos mais utilizados no campo, 87% possuem potenciais carcinogênicos e 7% são potencialmente pré – carcinógenos, indicando uma evidente situação de vulnerabilidade para o câncer de pele e suas lesões (BEDOR, 2008). Em março de 2015 a Agência Internacional de

Pesquisa em Câncer (IARC) realizou uma publicação na IARC volume 112, onde foram classificados cinco ingredientes ativos de agrotóxicos como potencial de carcinogenicidade, são eles: o herbicida glifosato e os inseticidas malationa e diazinona como prováveis agentes carcinogênicos, além dos inseticidas tetraclorvinfós e parationa como possíveis agentes carcinogênicos. Desses a malationa e a diazinona e o glifosato são autorizados e amplamente usados no Brasil, como inseticidas em campanhas de saúde pública para o controle de vetores e na agricultura, respectivamente (BRASIL, 2017).

Os relatos sobre intoxicações iniciaram sua produção intelectual na década de noventa (MATUDO; *et al*, 1990). Desde então, a produção científica na área foi muito baixa, com relatos de apenas cinco trabalhos sobre o tema intoxicação por agrotóxicos e os efeitos para a saúde do trabalhador (SIQUEIRA e KRUSE, 2008). Na medicina preventiva e intervencionista faz-se cada vez mais necessário um programa para o desenvolvimento de metodologias e avaliações no campo para o monitoramento de intoxicações aguda dos moradores rurais que trabalham e convivem em áreas de aplicações de agrotóxicos. Além disso, para a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) estima que para cada caso registrado de intoxicação exógena por agrotóxico, ocorrem cerca de cinquenta outros sem notificação ou que apresentam notificação errada (OMS/OPAS, 2012).

Crianças e adolescentes que residem em áreas de cultivo ou próximas a elas, podem estar expostas tanto pela pulverização dos agentes agrotóxicos, como pela contaminação das mãos e de objetos ao tocar o solo, que em caso de crianças com pouca idade, há o risco de levá-los à boca. Além desses fatores, percebeu-se que os pais também podem levar contaminação para suas residências, por meio de roupas contaminadas, equipamentos de trabalho ou pelo próprio corpo. Além disso, sabe-se que na agricultura familiar, as crianças residem nos locais onde os pais trabalham, aumentando a probabilidade de contato com os agrotóxicos e suas embalagens. O risco das crianças desenvolverem câncer também existe durante a gestação, quando a mãe é exposta aos agrotóxicos. Esse risco aumenta quando o período de exposição é mais prolongado e quando há uma exposição a maiores doses de agrotóxicos (ZAHM, *et al* 1998; RIGOTTO, 2011).

A superação de um quadro tão negativo na agricultura do Brasil, em especial a do morango, constitui-se num grande desafio que é o desenvolvimento de tecnologias que cheguem até o campo de forma simples e aplicada a população que está exposta a um risco de saúde grave (GREGOLIS, *et al* 2012).

1.3 Biossensores e potencial de aplicações

Biossensores são dispositivos que permitem detectar, qualificar e quantificar espécies contaminantes, e com uso de componentes biológicos, como diversos tipos de proteínas, enzimas ou anticorpos, para essa avaliação. Têm por base um gerador de sinal (ótico, eletroquímico, etc.) para detectar uma alteração química e um transdutor que fornece o resultado numa forma mensurável (MALON *et al.*, 2014).

O National Research Council (Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos) define biossensor como um dispositivo de detecção que incorpora um organismo vivo ou um produto derivado de sistemas vivos (por exemplo, uma enzima ou um anticorpo) e um transdutor para fornecer uma indicação, sinal, ou outra forma de reconhecimento da presença de uma substância específica (LUONG; *et al.* 2008).

Representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes, devido às suas características únicas, tais como seletividade, baixo custo relativo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, introdução e facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para rápidas análises de monitoramento no campo (ARYA, *et al* 2008.; NISTOR *et al.*, 1999). Entretanto, é necessário enfatizar que estas ferramentas não podem e não devem ser vistas como uma substituição das técnicas analíticas clássicas e instrumentais, como os exames de sangue, mas sim como um complemento a essas (NISTOR *et al.*, 1999).

Os biossensores colorimétricos são sistemas simples e rápidos, em que uma substância cromogênica é utilizada, a fim de criar uma cor associada a uma variação química. A identificação óptica é feita principalmente por olho nu. Alguns estudos indicam monitorização ambiental fácil e rápida com um mecanismo transdutor à base de compostos fenólicos colorimétricos para pesticidas (THÉVENOT *et al.*, 2001).

2 OBJETIVO

Desenvolver um biossensor colorimétrico para detectar contaminação por organofosforados e carbamatos em amostras de urina de residentes rurais que trabalham com a cadeia de produção de morangos.

3 MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

O estudo in vitro caracterizou-se por ser um estudo primário, observacional, analítico, prospectivo e transversal realizado uma parte no laboratório de Fitoterapia da unidade Fátima da Universidade do Vale do Sapucaí (Univás) e outra parte do experimento foi realizada em campo nas cidades de Bom Repouso e Pouso Alegre.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética que emitiu a liberação para a coleta dos dados, sob o número do protocolo CAAE- 60502016.3.0000.5102, (Anexo 1).

3.2 Critérios éticos para coleta das amostras

Foram incluídos 75 trabalhadores em zona rural das cidades de Bom Repouso e Pouso Alegre. As coletas seguiram os critérios de inclusão, não inclusão e exclusão descritos abaixo:

3.2.1 Critérios de inclusão

- Ambos os gêneros com idade igual ou superior aos 18 anos;
- Trabalhar diretamente ou indiretamente com agrotóxicos;
- Assinar e aceitar as condições estabelecidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecidas (TCLE); (Anexo 2).

3.2.2 Critérios de não inclusão

- Morador da cidade, que se encontrava no campo, mas que não tem atividade rotineira com agrotóxicos.

3.2.3 Critérios de exclusão

- Erro na coleta do sangue ou urina;
- Voluntários que decidiram sair da pesquisa em qualquer momento de sua execução.

3.3 Construção do biossensor

3.3.1 Preparo das Soluções

O tampão de fosfato de sódio 0,1 M foi preparado pela mistura das soluções A (0,2 M de Na_2HPO_4) e B (0,2 M de NaH_2PO_4), e com adição dos respectivos volumes para obtenção das soluções tamponadas pH 7,0 e pH 7,4. A solução tampão foi preparada com água destilada esterilizada e adição de 15% (p/p) de glicose (MURAT KAVRUK, 2010).

Foi preparada a solução estoque de acetilcolinesterase (AChE), de concentração final 137 Un/mL, A enzima liofilizada foi dissolvida em solução tampão de fosfato de sódio (0,02 M) pH 7,0, contendo 1 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA) para estabilização. A solução estoque foi armazenada a -20°C . Para construção do biossensor, a solução estoque foi diluída em solução tampão de fosfato de sódio pH 7,4, para concentração final 12 Un/mL de AChE (MURAT KAVRUK, 2010).

A solução estoque do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) de concentração 5,0 mg/mL foi preparada em tampão 0,1M pH 7,4, e usada em concentração diluída (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para preparo do biossensor. Para o substrato de acetilcolina (AChI), uma solução estoque de 29 mg/mL foi preparada e usada no biossensor em concentração diluída de 290 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MURAT KAVRUK, 2010).

Todas as soluções estoque foram armazenadas a -20°C , diluídas em condições resfriadas para obtenção das soluções de trabalho, e transportadas também sob resfriamento para as análises de campo.

TABELA 1- Quantidades de soluções que contem no biossensor

	Amostra controle (μL)	Amostra (μL)	
Enzima Colinesterase	8	8	
DTNB	8	8	
[Fungicida]	0	10	
Esperar a reação por 20 minutos			
Acetilcolina	20	20	
Esperar a reação por 5 minutos			

3.3.2 Suporte para o biossensor

Foram testados alguns tipos de suportes para as reações das soluções do biossensor, sendo respectivamente, lâminas com sílica gel, papel de acetato de celulose, policloreto de vinila, tubos de vidro tipo Durhan e disco de papel de seda.

A sílica gel para cromatografia em camada delgada foi preparada no laboratório de botânica da Univás. Na construção desse suporte foram utilizado 7g da sílica em 16 mL de água destilada, em seguida, a mistura foi colocada em estufa a 110° C por 2h para desidratação. O produto resultante da desidratação foi colocado sobre lâmina de vidro de 2,5 por 7,5 cm. Nesse material não foi determinada a espessura das camadas da sílica gel sobre as lâminas. Cada lâmina com sílica serviu de suporte para receber as soluções constituintes do biossensor.

Um papel de filtro de acetato de celulose, 0,45 μ m Whatman®, foi utilizado como suporte para ocorrência das reações. Foram recortados tamanhos adequados para receber as soluções do biossensor.

Filme plástico de policloreto de vinila foram cortados e receberam as soluções constituintes do biossensor. Cada um desses discos continha 0,3 mm de altura e 1,0 cm de largura.

Tubos Durhan são recipientes de vidro pequenos, cilíndricos, medindo 5X20 mm. Neste trabalho, eles foram utilizados como suporte para a recepção das reações do biossensor.

Discos de papel de seda de tamanho 5cm de diâmetro, foram colocados sobre lâminas de vidro para receber as soluções dos biossensor. Foram utilizados furadores de rolhas em latão para padronizar o tamanho de cada um dos discos.

Dentre os materiais testados como suporte os tubos de vidro Durhan indicou o melhor resultado para visualização da reação colorimétrica.

3.4 Testes comparativos in vivo dos resultados do biossensor e da acetilcolinesterase plasmática (sangue)

Nos tubos de Durhan fo colocado 8 μ L de acetilcolinesterase (AChE) e mais 8 μ L de reagente DTNB, e em seguida adicionado 10 μ L da amostra de urina. Essa mistura ficou sob reação por 20 minutos, quando foram adicionados 20 μ L de acetilcolina (AChI). Durante 5 minutos observou-se se houve a coloração de amarelo do produto final da reação para os casos negativos (de contaminação por agrotóxico), e incolores para os casos positivos de contaminação por agrotóxico. Para cada amostra foi realizado um controle (branco da reação) com as mesmas dosagens das soluções, não acrescentando a amostra de urina.

Para o trabalho de campo, as soluções do biossensor foram transportadas em caixa térmicas e mantidas em temperatura entre 2 a 8° C durante toda fase do experimento.

As amostras de urina dos agricultores foram coletada em campo e mantidas em coletor estéril em temperatura ambiente, sendo verificado o pH com fita de indicador de pH descartável. O volume da amostra nunca foi inferior a 12 mL, conforme metodologia descrita para coleta de urina para análise clínica.

Todos que participaram do teste colorimétrico do biossensor, também foram submetidos à coleta de sangue para análise da colinesterase plasmática (análise clinica), sendo assim preenchida uma ficha de identificação do paciente constando: nome, data de nascimento, endereço e tipo de amostra solicitada.

A coleta do sangue foi realizada em seguida a coleta da urina de cada indivíduo, sendo utilizada seringa hipodérmica de 5 ml com agulha 25 x 0,8 (Saldanha Rodrigues Ltda). A antissepsia da pele foi realizada com algodão umedecido em álcool 70%.

Foram retirados 4 mL de sangue e colocados em tubos contendo anticoagulante, sendo homogeneizados por inversão de cinco a oito vezes para evitar hemólise, mantendo em repouso na posição vertical por 30 minutos para retrain o coágulo e em seguida centrifugados a 3.000 rpm durante 10 minutos, (centrifugada Alpha Ltda, modelo- A1, n°- 679, Série- A). As coletas e o teste do biossensor foram desenvolvidos em campo.

As amostras de sangue foram encaminhadas com as fichas de identificação dos pacientes no mesmo dia da coleta para o laboratório Métodos, unidade central, localizado Rua Bernardino de Campos, 139 - Centro, Pouso Alegre – MG.

3.5 Análise estatística dos dados

Os dados foram processados pelo *software Minitab*, versão 18, por meio do teste de Friedman. A resposta das intoxicações pelas duas metodologias utilizadas foi obtida pela análise blocado por gênero.

O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5%, considerando-se significantes os valores de p menores ou iguais a 0,05.

4 RESULTADOS/PRODUTO

4.1 Resultado

Entre os suportes testados em laboratório o que demonstrou melhor resultado para o teste in vivo foi o realizado nos tubos de vidro de Durham (Figura 1A e B). Essa observação foi evidenciada pela diferenciação da cor do produto final das reações. Respectivamente, indicado por produto incolor (amostra contaminada por carbamato ou organofosforado) e produto de cor amarelada (amostra não contaminada por carbamato ou organofosforado) analisadas pelo biossensor.

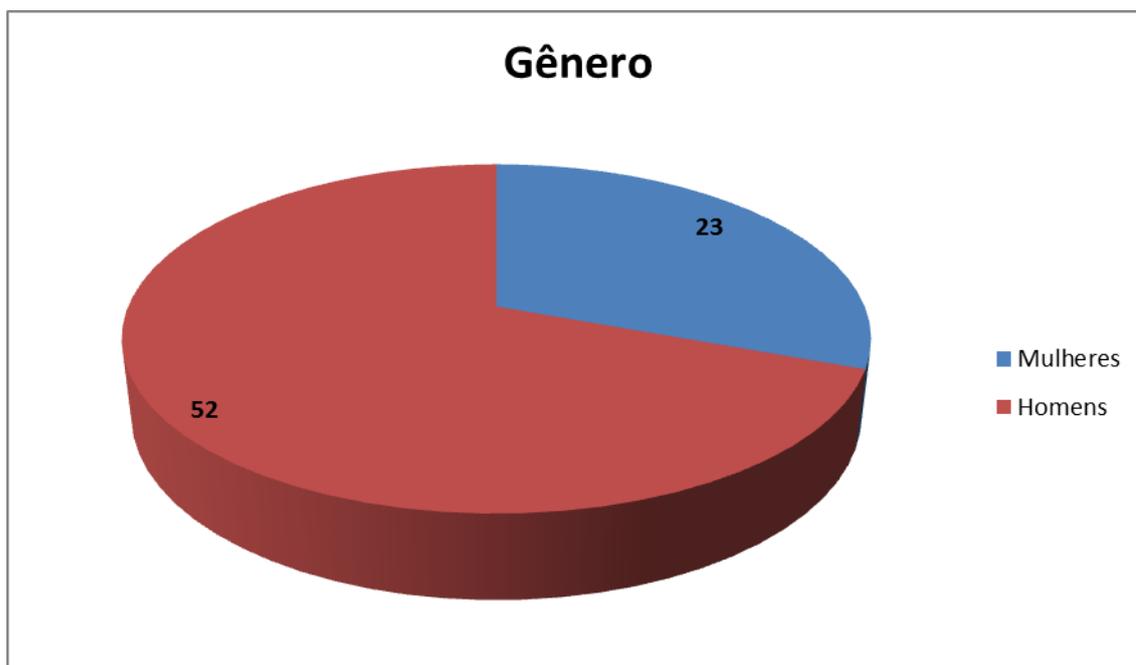


Figura 1 - A e B: vidros de Durham utilizados como suporte para indicação da reação colorimétrica.

O método utilizado na triagem de contaminação das amostras de urina por agrotóxicos mostrou que os resultados foram obtidos em 30 minutos após o seu início.

Dos 75 participantes a maior parte é pertencente ao gênero masculino. Esse resultado mostra uma prevalência duas vezes maior de homens exercendo esse tipo de atividade em relação às mulheres (Figura 2).

Figura 2 - Participantes da pesquisa segundo o gênero



A idade média dos trabalhadores rurais dessa pesquisa foi de 39, 7 anos e a variação da faixa etária foi apresentada na tabela 1.

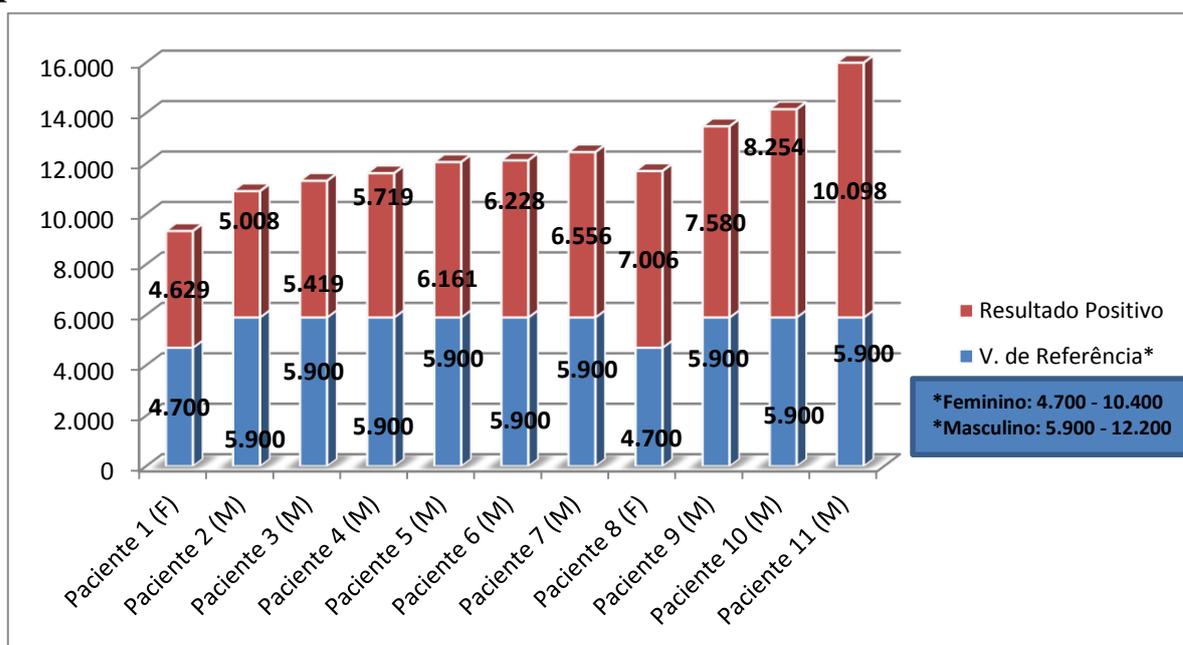
Tabela 2: Faixa etária e número de moradores rurais participantes da pesquisa

Faixa etária dos moradores rurais	Nº de moradores rurais
20 até 30 anos	17
31 até 40 anos	17
41 até 50 anos	19
51 até 60 anos	18
Acima de 61 anos	4

No universo das amostras, a contaminação detectada pelo biossensor foi de 14,6%, enquanto que no teste com a colinesterase plasmática foi de 5,3%. Todos os resultados do biossensor para as amostras não contaminadas foram corroboradas pelo teste da colinesterase plasmática.

No entanto, não houve unanimidade dos dois testes com relação aos apontamentos para amostras contaminadas. Apenas 4 das 11 amostras detectadas pelo biossensor foram confirmadas pelo teste da colinesterase plasmática, conforme mostra figura 3.

Figura 3 – Intoxicações detectadas pelo biossensor e análise do teste da colinesterase plasmática.



Valores de referência em unidade (U/L).

Duas dessas amostras tiveram os seus resultados na faixa limite do valor de referência, são elas as dos pacientes 5 e 6.

Nos teste estatísticos blocado para amostras de urina de mulheres se constatou que todos os resultados do biossensor contaminadas foram confirmados pelo teste clínico de colinesterase plasmática. Essa análise indicou que para o sexo feminino não houve diferença estatística entre os dois métodos de detecção (Anexo 4)

Por outro lado, os resultados positivo detectados pelo biossensor para amostras contaminadas para o gênero masculino não foram confirmados no teste clínico de colinesterase plasmática. Sendo assim, houve diferença estatística entre os dois métodos para amostras do gênero masculino,(Anexo 4).

4.2 Produto

O trabalho apresentou dois produtos como resultados da pesquisa desenvolvida. O primeiro foi o desenvolvimento de um biossensor colorimétrico que possibilita a triagem de intoxicação em pacientes por agrotóxicos dos grupos químicos de carbamatos e fosforados. O segundo foi o desenvolvimento de uma metodologia rápida que permite que os resultados da triagem em relação à contaminação por agrotóxicos seja realizada em torno de 30 minutos após a coleta da amostra.

4.2.1 Descrição do biossensor colorimétrico

A presente invenção aplica-se ao desenvolvimento de um biossensor colorimétrico para triagem de pessoas que estejam contaminadas por agrotóxicos dos grupos carbamatos e organofosforados.

O princípio do produto baseia-se na reação da enzima acetilcolinesterase, da acetilcolina e DTNB (reagente de Ellman) na presença de amostra de urina.

A avaliação dos resultados é referendada numa alteração colorimétrica dos produtos da reação, respectivamente, para amostra de urina contaminada por agrotóxicos (produto incolor) e amostra de urina não contaminada (produto de cor amarelada).

4.2.2.1 - Estrutura do biossensor:

A estrutura do biossensor (Figura 4) é um invólucro feito para conter os seus componentes. Podendo este ser feito de material inerte metálico, de polímero, fibra de vidro, material cerâmico, e/ou qualquer material sólido capaz de conter os componentes do biossensor;

A forma do biossensor (Figura 4) pode ser esférica, paralelepipedica, parabólica, tubular e/ou de qualquer forma que permita a inserção dos compostos e amostras e visualização dos resultados do teste realizado pelo biossensor;



Figura 4: Modelo esférico do biossensor

O biossensor pode possuir uma tampa ou invólucro (Figura 5, item 5) para evitar que os componentes do teste e seus equipamentos auxiliares de vazarem ou se separem do corpo do biossensor.

4.2.3 - Os testes

Os testes (Figura 5 - itens 6 e 8) foram feitos em dois containers separados por um lacre (figura 5 – item 7). No primeiro container a mistura AB (acetilcolinesterase e DTNB) entrou em contato com a urina (C). Em seguida houve o rompimento do lacre, e a combinação ABC entrou em contato com o composto D (acetilcolina) no segundo container.

Os containers de teste (Figura 5 – itens 6 e 8) podem ser feitos de material translúcido, não reagente, podendo serem feitos de vidro, polímero, cristal ou qualquer outro material translúcido, inerte e capaz de conter os reagentes.

O resultado será lido na alteração colorimétrica dos produtos da reação. Para amostra de urina contaminada por agrotóxicos (produto incolor) e amostra de urina não contaminada (produto de cor amarelada).

4.2.4- O lacre

O lacre (Figura 5 – item 5) pode ser de qualquer material, translúcido ou não, não reagente com os compostos ABCD, e de característica rompível. O lacre pode ser feito de material metálico, polímero, papel ou derivados de celulose, e/ou de qualquer substância ou material que separa os containers de teste.

4.2.5 Equipamentos auxiliares

O biossensor contém equipamento(s) (Figura 5– item 4) com o formato de uma pipeta para coletar C (urina), despejar no container para que ocorra as reações com as soluções AB, e também com a função de romper o lacre para que a segunda fase das reações ocorram.

Os equipamentos auxiliares podem ser feitos de qualquer material, de preferência translúcido para permitir a visualização do volume da amostra coletada, não reagente com compostos ABCD. O material dos equipamentos auxiliares podem ser metálicos, poliméricos, cerâmicos, cristalinos ou de qualquer material que possa ser feito para coletar, despejar ou romper o lacre do teste.

Os equipamentos utilizados para realizar a coleção e despejo da amostra no container de teste deve obrigatoriamente possuir um volume máximo menor do que o volume do container do teste.

Os volumes dos containers, equipamentos auxiliares e dos compostos e amostras são escaláveis de acordo com a necessidade de visualização do resultado do teste, da quantidade de compostos AB, D e da amostra, com o volume do equipamento auxiliar obedecendo a limitação estabelecida.

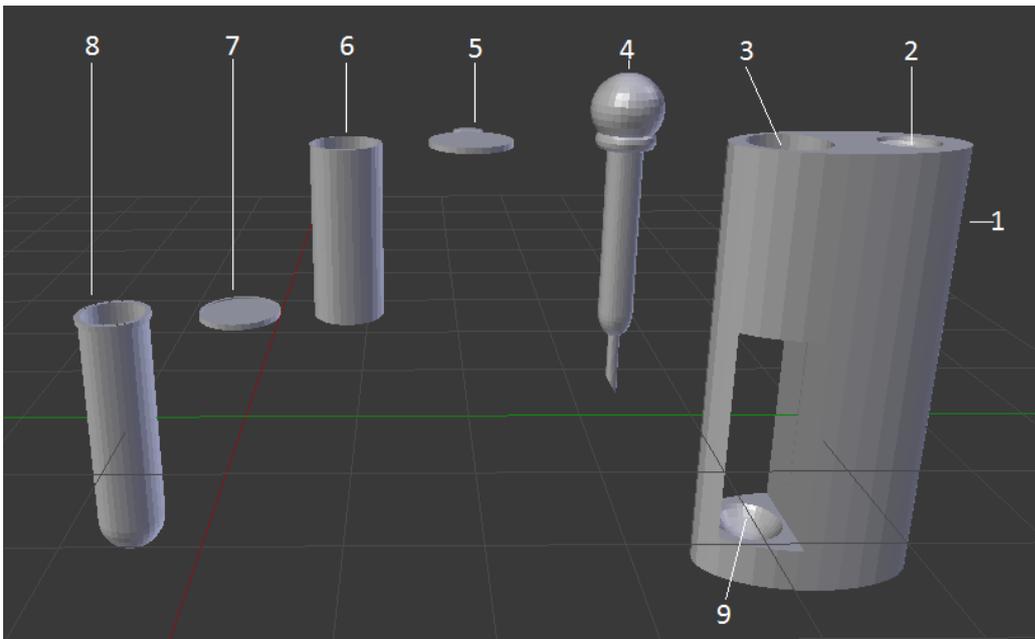


Figura 5: Modelo expandido do biossensor.

Constituintes:

- 1: Corpo do biossensor.
- 2: Encaixe do equipamento auxiliar.
- 3: Encaixe dos containers dos teste.
- 4: Equipamento auxiliar (pipeta).
- 5: Tampa do encaixe dos testes.
- 6: Container do teste 1.
- 7: Lacre separador do teste 1 e 2.
- 8: Container do teste 2.
- 9: Área de encaixe e visualização do teste 2.

4.2.6 Condições de armazenamento e transporte

A temperatura de armazenamento e transporte do biossensor deverá ser de 2° a 8° C em caixa térmica.

4.2.7 Cuidados especiais

- a) Para uso de triagem in vivo;
- b) Recomenda-se a confirmação para amostras contaminadas pelo biossensor com o teste de sangue da colinesterase plasmática;
- c) Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;
- d) Descarte do material deverá ser realizado preferencialmente em lixo hospitalar

4.2.8 Condições para ocorrência das reações

Para ocorrência da reação as soluções precisam estar nas concentrações adequadas, na validade do tempo de vida útil e na faixa de pH e temperatura apropriadas.

4.2.9 Valores de referência

Como é um teste visual não existe diferença e nem valores de referência específicos para homens e mulheres.

Os resultados fornecidos por este biossensor deve ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico de intoxicação.

4.3 A metodologia

A metodologia de análise descrita por meio do biossensor levou em média 30 minutos para dar os resultados para o indivíduo avaliado. Isso representa um ganho de tempo muito grande em relação ao teste clínico disponível no mercado, que atualmente leva em média uma semana para emitir os resultados dos exames pela coleta de sangue e avaliação da colinesterase.

Algumas vantagens dessa metodologia também são observadas em relação a sua praticidade e facilidade de aplicação. Ela pode ser usada em postos de saúde, laboratórios de análise clínicas e também no local de trabalho, onde há pessoas que fazem o manuseio de agrotóxicos. Isso inclui lavouras de cultivos de frutas, verduras, cereais e grãos comercializados pelo agronegócio brasileiro, além de lojas de insumos agrícolas, onde os vendedores também tem contato direto com substâncias contendo carbamatos e organofosforados. Sendo possível à triagem de indivíduos com suspeita de contaminação por agrotóxicos. Os pacientes poderão ser encaminhados mais precocemente para médicos especialistas que poderão evitar o agravamento dessa contaminação para um quadro mais avançados de câncer.

5 DISCUSSÃO

As quatro amostras de urina contaminadas foram coletadas de indivíduos com faixas de idade diferentes, pois duas pessoas estavam no grupo entre 30 e 40 anos e as outras duas em grupos de idade que variaram entre 50 e 60 anos. Esse resultado mostrou que a contaminação no campo ocorre independente de idade do indivíduo avaliado, ou seja, ela está relacionada a outros fatores. De maneira geral, o perfil epidemiológico das intoxicações por agrotóxicos no Brasil ocorre na maioria dos casos em indivíduos do sexo masculino, em idade produtiva (15 a 49 anos), com maior percentual de intoxicação acidental, seguida de circunstâncias intencionais e com predomínio por inseticida agrícola (REBELO *et al.*, 2011).

A velocidade do teste realizado pelo biossensor no local da atividade do paciente é um avanço que certamente trará contribuição significativa no diagnóstico das intoxicações por organofosforados e carbamatos. Uma vez que, o paciente encaminhado para realização dos exames clínicos já passou por uma triagem de contaminação utilizando o biossensor. Isso contribuirá com esse tipo de diagnóstico, pois os exames disponíveis para detecção de intoxicações por agrotóxicos são demorados. Os organofosforados e carbamatos são absorvidos através das vias dérmica, respiratória, entre outras, atingindo altas concentrações em tecido adiposo, fígado, rins, glândulas salivares, tireóide, pâncreas, pulmões, estômago, intestinos, sistema nervoso central (SNC) e músculos. Entretanto, essas moléculas são facilmente biotransformados no fígado. A excreção destes compostos e de seus produtos de biotransformação é rápida, ocorrendo em maior parte pela urina e em pequenas proporções pelas fezes, quase sempre nas primeiras 48 h. Os níveis de excreção ocorrem nas primeiras 24 h após a absorção. A intoxicação acidental é letal num número reduzido de indivíduos, mas, no entanto, constitui um problema relevante em locais onde pesticidas organofosforados, altamente tóxicos, estão disponíveis (CHOWDHARY *et al.*, 2014).

Perante esse problema, necessita-se da busca por ferramentas que auxiliem no diagnóstico ou mesmo na triagem precoce de intoxicação. Os biossensores representam um equipamento promissor para suplementar as técnicas já existentes, devido às suas características únicas, abrindo caminho ao diagnóstico descentralizado, com enorme diminuição do intervalo entre a coleta da amostra, o tempo de avaliação e a decisão terapêutica (WALKER; GINGOLD, 1993; SILVA, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu diretrizes para o desenvolvimento de diagnósticos em ambientes pobres em recursos. Estes testes devem ser: (I) economicamente acessíveis; (II) sensíveis; (III) específicos; (IV) de fácil utilização; (V) rápidos e robustos; (VI) independentes da utilização de equipamentos; e (VII) acessíveis a

quem deles precisa (COSTA et al., 2014). O biossensor desenvolvido neste trabalho atende a todas essas diretrizes. Podendo ser útil em relação à lacuna que ainda existe entre os profissionais de saúde e os moradores da zona rural, que é o diagnóstico das intoxicações e das doenças causadas por agrotóxico.

A perspectiva de O'farrell (2009) e da equipe de Posthuma-Trumpie; Korf; Van Amerongen (2009) é que a tendência futura da utilização de sensores venham cada vez mais serem aplicados em diagnósticos clínicos e em áreas tão diversas como a veterinária, agricultura, alimentação, saúde, segurança ambiental. Estima-se que a receita global para o mercado dos sensores continuará a registrar um forte crescimento e ultrapassar a marca dos 14 bilhões de euros nos próximos 7 anos. A maior parte deste crescimento deve-se a um aumento da utilização de sensores na segurança e biodefesa, monitorização ambiental e nos diagnósticos domésticos. Atualmente, os sensores são usados nas mais diferentes aplicações em contraste com a subutilização que havia nos primeiros dez anos do início do século XXI (MEHROTRA, 2016). Sem dúvida que este crescimento em aplicações e expansão para outros mercados foi fortemente auxiliado pelas inovações nestes dispositivos (MEHROTRA, 2016).

Os resultados de contaminação obtidos nesta pesquisa pelas duas metodologias confirmam a segurança de triagem pelo biossensor, bem como também aponta alto índice de contaminação na zona rural dos moradores das cidades de Senador Amaral e Pouso Alegre por substâncias dos grupos químicos abordados. Essa constatação é preocupante e exige atenção das autoridades políticas e da saúde desses municípios. Pesquisa realizada no Brasil entre 2000 e 2009 apontou que 679 trabalhadores da agropecuária faleceram em decorrência de intoxicações ocupacionais por agrotóxicos (SANTANA *et al* 2013). O Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos registrou a ocorrência de 12.534 notificações para intoxicação por agrotóxicos no Brasil no ano de 2013. Um acompanhamento do empregador em relação à saúde do seu empregado, por meio do biossensor pode evitar óbitos nesta atividade trabalhista.

Trabalhos utilizando biossensores enzimáticos foram descritos por Minakshi (2008) que pesquisou sobre a determinação dos triglicérides por meio da imobilização das enzimas lipase, glicerol-kinase e glicerol-3-fosfato. Teixeira (2014) desenvolveu um sensor para monitorização de antibióticos em águas de aquicultura. Neste trabalho foi desenvolvida uma reação que em contato com antibióticos desenvolveu uma coloração típica. A intensidade da coloração estava relacionada com a concentração desse antibiótico. Por outro lado, existem as dificuldades de se trabalhar com biossensores colorimétricos. Eles podem apresentar

desvantagens, como tempo de vida das soluções, as variações de pH; temperatura das amostras, entre outras.

A utilização de uma ferramenta simples e de diagnóstico rápido evita não somente as intoxicações agudas, mas também uma série de outras

5.1. Aplicabilidade

Uma das vantagens do desenvolvimento do biossensor para a detecção de intoxicações por carbamatos e organofosforados é a facilidade de análise, pois ele pode ser transportado até as lavouras, onde se encontra o trabalhador rural. Outras vantagens que também podem ser descritas são o curto tempo de análise e a disponibilidade dos resultados em aproximadamente 30 minutos. Portanto, o desenvolvimento do biossensor melhora e enriquece os recursos de triagem de intoxicações no campo, algo que hoje é escasso, preocupante e que requer um empenho da comunidade científica, de política da saúde e do agricultor e de moradores da zona rural para que as melhorias possam acontecer.

Os dados disponíveis no Brasil normalmente são baseados nos que são relatados no Sinitox (FARIA, 2007), banco de dados onde pode haver subnotificações de intoxicações por agrotóxicos. Nessa lacuna o biossensor poderá ter uma importância primordial para melhorar as estatísticas de intoxicações no campo. Devido as suas características de portabilidade, entre outras, possibilitará o pesquisador leva-lo até o campo e fazer a coleta de dados de intoxicações de maneira mais rápida, barata e “in loco”.

O aparelho poderá ser adquirido, facilmente, em farmácias, laboratório ou mesmo em postos de saúde. É de fácil manuseio o que permitirá que os resultados sejam obtidos e avaliados por pessoas com capacidade mínima de leitura.

A agricultura passa por um momento gradual de mudança na sua forma de produção, principalmente, no que diz a respeito à sustentabilidade. Neste caso, o biossensor pode ajudar como uma ferramenta de auxílio preventivo e educativo aos agricultores, as empresas, e às instituições de saúde, com relação à redução de contaminações por moléculas dos grupos carbamatos e organofosforados.

Por fim, o biossensor pode ser precursor de uma nova política de saúde pública de controle de intoxicações agudas e crônicas direcionada para os moradores da zona rural, pois o fato de poder apontar “in loco” indícios de possíveis contaminações possibilitará que as cobranças aos órgãos competentes sejam realizadas com antecedência e que ações de intervenção aconteçam, antes mesmo que se estabeleça um cenário de epidemiologia.

5.2. Impacto Social

No Brasil não existem estatísticas rigorosas sobre a dimensão das intoxicações no campo causadas por carbamatos e organofosforados, mas existem informações relativas à toxicidade. O biossensor pode ser uma ferramenta futura que poderá proporcionar essa estatística para a saúde no Brasil e no mundo. Esse instrumento e a metodologia nele empregada poderão ser utilizados por pesquisadores e outros profissionais na obtenção de pré-informações pertinentes à contaminação aguda, em termos qualitativos. Os dados poderão ser obtidos com facilidade, pois o biossensor pode ser transportado para as áreas agrícolas, onde poderá mostrar a contaminação de cada indivíduo em tempo real de exposição.

O biossensor não caracteriza o diagnóstico definitivo de intoxicação, mas poderá ser uma ótima triagem no campo para a indicação de contaminações por agrotóxicos. Dessa maneira, somente os casos relatados como positivos pelo biossensor deverão ser encaminhados para a realização de exames médicos mais detalhados para a comprovação da contaminação. Acredita-se que o valor de cada análise realizada pelo biossensor será 50% menor em relação aos valores dos testes de análise pelo sangue, o que permitirá que essa triagem seja feita com a comunidade rural, em especial aquela que trabalha diretamente com a aplicação de carbamatos e organofosforados.

Para a agricultura do sul de Minas Gerais, onde prevalece o cultivo do morango, batata e café, culturas afamadas pela grande quantidade de agrotóxico despejadas em seus cultivos, o biossensor pode ser utilizado como uma ferramenta para o monitoramento e articulações dos órgãos e secretarias que cuidam da saúde do município, e em especial, da saúde do morador da zona rural, que exerce atividade agrícola como forma de sustentação financeira da sua família. Com a utilização do biossensor no campo será possível à identificação precoce das intoxicações por agrotóxicos, e com isso antever o aparecimento dos sintomas, promovendo uma saúde com mais qualidade e respeito ao morador rural.

Uma vez conhecendo a real situação de contaminação da rede do agronegócio será possível uma política de saúde preventiva a contaminação por carbamatos e organofosforados na área agrícola. Uma política pública bem realizada a partir dos dados revelados pela utilização do biossensor poderá refletir diretamente no número de mortes por suicídios ou pela presença de doenças como câncer ou outras desencadeadas pela contaminação por agrotóxicos, tanto no sul de Minas como no Brasil e no mundo.

Atividades relacionadas à agricultura, pecuária, exploração florestal e aquicultura, bem como às atividades de exploração industrial desenvolvidas em estabelecimentos agrários, são regida pela Lei 5.889/73 do Ministério do Trabalho e Emprego. No artigo 168 da lei 7.855 de 1989 está descrito sobre a obrigatoriedade do exame médico por conta do empregador no ato da admissão, na demissão e periodicamente. Na cultura do morango, batata e outras, o biossensor poderá ser utilizado na triagem apontando para o empregador apenas os trabalhadores com suspeita de intoxicações. Neste caso, o acompanhamento da saúde dos moradores da zona rural pode ser realizado periodicamente em decorrência da facilidade de se fazer o teste nas lavouras ou em suas residências, onde se encontram essas pessoas. Essa prática no campo poderá ser desenvolvida pelo programa de saúde da família, e muitas são as vantagens de uma intervenção dessa magnitude, tanto para o município como para agricultura em geral. Os donos de lavouras poderão acompanhar de perto a saúde do seu funcionário, e com isso podem evitar processos trabalhistas.

Além disso, os municípios que possuem a agricultura como atividade econômica poderá ter uma medicina preventiva ao invés de uma medicina interventiva.

6. CONCLUSÃO

O biossensor desenvolvido mostrou ser capaz de captar dados em condições de campo. Os resultados mostraram margem de confiança e segurança quando comparados com a ferramenta de análise clínica disponível para o diagnóstico de contaminações de agricultores em relação aos grupos de carbamatos e organofosforados. No entanto, novas pesquisas de aprimoramento deverão ser realizadas buscando aumentar a produtividade, replicabilidade e repetitividade em condições operacionais do biossensor.

7. REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Sistema de Informação sobre Agrotóxicos – SIA, Módulo Pós Registro. Citação e referências a documentos eletrônicos. Apud GRIZA FT, ORTIZ KS, GEREMIAS D, VALLADÃO THIESEN F. Avaliação da contaminação por organofosforados em águas superficiais no município de Rondonia - Rio Grande do Sul. Quím. Nova. 31(7) São Paulo 2008.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). 2013. Sistema de Informação sobre Agrotóxicos – SIA, Módulo Pós Registro. 2013. Citação e referências a documentos eletrônicos. [acesso em 17 out 2016]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/sia.htm>.

Arya, SK, Datta M, Malhotra BD. Recent advances in cholesterol biosensor. Biosensors and Bioelectronics, (23), p.1083–1100, 2008.

Brasil. Ministério da saúde. Posicionamento do instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos. 2017. [acesso em 07 fev 2017]. Disponível em: www1.inca.gov.br/.../posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf.

Bedor CNG. Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na fruticultura e sua implicação para a vigilância da saúde. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhaes da Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

Chowdhary S, Bhattacharyya R, Banerjee D. 2014. Acute organophosphorus poisoning. Clinica Chimica Acta, 431, pp.66–76.

Costa M, Veigas B, Jacob J, Santos D, Gomes J, Baptista P, Martins R, Inácio J, Fortunato E. Low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: Lab-on-paper”, Nanotechnology 2014; (25):1-12.

Duarte Filho J. Cultivares de morango. In: Carvalho SP (Coord.). Boletim do morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico. Belo Horizonte: FAEMG, 2006.

Edwards, FI; Tchounwou, Pb. Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure scientific review. International Journal of Environmental Research and Public Health, vol. 2, n. 3, p. 430-41, 2005.

Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (Emater). Dados confirmam que cultivo de morango cresce cada vez mais na agricultura familiar. 2011. [acesso em 17 out 2016]. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_paginas_internas&id=7916#.WK-RePIvvg0

Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (Emater). Produtores de Morango buscam nas hortaliças alternativas para aumentar renda. 2013. [acesso em 17 out 2016]. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_paginas_internas2&id=10716#.V

Fachinello JC, Pasa MS, Schmitz JD, Leitzke Betemps D. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. Rev. Bras. Frutic. 2011; 33: 109-121.

Faria NMX, Fassa AG, Facchini LA. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para a realização de estudos epidemiológicos. Cien Saude Colet 2007; 12(1):25-38.

Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Minas Gerais (Faemg). Mudança e modernização do sistema de cultivo de morangos eleva os preços entre 20% e 40%. [acesso em 17 out 2016]. Disponível em: [http://www.sistemafaemg.org.br/Noticia.aspx?Code=9562&Portal=1&PortalNews=1&ParentCode=139&ParentPath=None&ContentVersion=R\"mafaemg.org.br/Noticia.aspx?Code=9562](http://www.sistemafaemg.org.br/Noticia.aspx?Code=9562&Portal=1&PortalNews=1&ParentCode=139&ParentPath=None&ContentVersion=R\)HYPERLINK

Galli A, De Souza D, Garbellini GS, Coutinho CFB, Mazo LH, Avaca LA, Machado SAS. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. Quim. Nova 2006; 29(1):105-112.

Garcia,EG.; Filho,JPA. Aspectos de Prevenção e Controle de Acidentes no Trabalho com Agrotóxicos. São Paulo: Fundacentro, 2005. Acesso,18 de setembro. 2016.

Gregolis TBL, Pinto WJ, Peres F. [Risk perception associated to pesticide use among family agriculture workers in Rio Branco, Acre, Brazil]. Rev Bras Saúde Ocup [Internet]. 2012[cited 2014 Nov 13];37(125):99-113. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0303-76572012000100013> Portuguese.

Gunnell, D. *et al.*, 2007. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. BMC public health, 7(1), p.357.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Vigilância do câncer relacionado ao trabalho e ambiente.2006.Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ex_ocup_ambient2006.pdf Acesso em: 20 jun. 2016.

Kavruk, M. Development of acetylcholinesterase biosensor for the detection of pesticides. 2010 M.Sc., Department of Biotechnology. The graduate school of natural and applied sciences of Middle East Technical University. Turkey. 84 p.

King AM, Aaron CK. Organophosphate and Carbamate Poisoning. Emergency Medicine Clinics of North America 2015; 33(1):133–151.

Luong JHT, Male KB, Glennon JD., Biosensor technology: Technology push ... *Biotechnology Advances*, 2008. 26(5): 492-500.

Malon RSP, Sadir S, Balakrishnan M, Córcoles EP. Saliva-based biosensors: noninvasive monitoring tool for clinical diagnostics. *BioMed Research International*, 20p.; 2014.

Matudo YK, Lopes JNC, Casanova IC. Praguicidas organoclorados no leite humano: um estudo em um grupo de trabalhadores rurais do município de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Saúde Ocup.* 1990;18(69):27-32.

Mehrotra p. biosensors and their applications – a review. *J. Oral Biol Craniofac Res.* 2016; 6(2): 153–159.

Mesquita Filho M, Pereira RC. Manejo, uso de equipamentos de proteção individual (EPI) e intoxicação por agrotóxicos entre os trabalhadores da lavoura do morango do sul de Minas Gerais. Londrina. *Rev Esp Saúde.* 2011;13(1):23-34.

Minakshi, PSP. Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination. *Sensor and actuators*, v.133, 251-255, 2008.

Nistor C, Emnéus J, Gorton L, & Ciucu A. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 1999. 387(3), 309-326.

O'farrell B. Evolution in Lateral Flow-Based Immunoassay Systems. In: Wong RC, Tse HY(eds.). *Lateral Flow Immunoassay*. New York: Humana Press 2009:1-2.

Organização Mundial da Saúde/ Organização Pan-Americana da Saúde (OMS/OPAS). *Saúde nas Américas: panorama regional e perfis de países*, 2012. (Publicação Científica e Técnica, 636). . [acesso em 21 set 2016]. Disponível em: www1.paho.org/saludenlasamericas/docs/sa-2012-resumo.pdf.

Oshita D, Jardim, ICSF. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. *Scientia Chromatographica* 2012;.4(1):52-76.

Oshita D, Jardim, ICSF. comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. *Quim. Nova*, Vol. 38(10) 2015, 1273-1281.

Pereira WR, Souza RJ, Yuri JE, Ferreira S. Produtividade de cultivares de morangueiro, submetidas a diferentes épocas de plantio. *Vitória da Conquista July/Sept. Hortic. Bras.* 2013;31(3):500-503.

Rebelo FM, Caldas ED, Heliodoro VO, Rebelo RM. Intoxicação por agrotóxicos no Distrito Federal, Brasil, de 2004 a 2007 - análise da notificação ao Centro de Informação e Assistência Toxicológica. *Ciênc. saúde coletiva*. 2011; 16(8): 3493-502

Rigotto, RM. [organizadora]. Agrotóxicos, trabalho e saúde: vulnerabilidade e resistência no contexto da modernização agrícola no baixo Jaguaribe/CE. Co-edição com a Expressão Popular. Fortaleza: Edições UFC, 2011.

Reisser Jr C, Antunes LEC. Panorama de cultivos do morango no Brasil. Informe técnico Campo e Negócios Hortifrutí. Dez 2014. ISSN 2176-1191.

Santana VS, Mourai MCP, Nogueira FF.. *Rev Saúde Pública* 2013;47(3):598-606.

Silva MP. Determinação de pesticidas organofosforados através do método enzimático. (2011). Tese de doutorado. Campinas, SP, 2011.

Siqueira SL, Kruse MHL. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. *Rev. esc. enferm.* 2008, vol.42 (3): 573-579.

Teixeira CNO. Desenvolvimento de sensores colorimétricos para despiste de antibióticos. (2014) Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. Mestrado em Engenharia Química ramo Tecnologias de Proteção Ambiental. 63p.

Terra, THBA. Indústria de Agrotóxico no Brasil. 2008. Dissertação [Mestrado em Desenvolvimento Econômico]. Setor de Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do Paraná, Paraná 2008.

Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics* 16 (2001) 121–131.

Verge PJP, Boobis AR. Reavaliação e segurança. *ciência, waschiton*, 2013;341(6147):717-718.

Walker JM, Gingold EB. 1993. *Molecular Biology and Biotechnology*. 3rd ed. Cambridge. The Royal Society of Chemistry, 428p.

Zangh S., Wright G., Yang Y. Materiais e técnicas para design e construção de biossensores eletroquímicos. *Biossensores & Bioelectronics*, v. 15, p. 273-282, 2000.

8 ANEXOS

ANEXO I

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR COLORIMÉTRICO.

Pesquisador: simone conceição maciel

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60502016.3.0000.5102

Instituição Proponente: FUNDACAO DE ENSINO SUPERIOR DO VALE DO SAPUCAI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.771.145

Apresentação do Projeto:

Os defensivos agrícolas são substâncias ou misturas de substâncias químicas utilizadas para prevenir, destruir, repelir ou inibir a ocorrência ou efeito de organismos vivos capazes de prejudicar as lavouras agrícolas. Estes são divididos em herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, agentes biológicos, defensivos à base de semioquímicos e produtos domissanitários e são um importante insumo para a agricultura, onerando os custos de produção.

O estudo caracteriza-se por ser um estudo primário, observacional, analítico, prospectivo e longitudinal, realizado no laboratório de Microbiologia do campus Fátima da Universidade do Vale do Sapucaí (Univás). Em um segundo momento, uma vez que tenha dado certo os teste em laboratório o experimento de aplicação do kit será realizado em campo. Agricultores em número igual ou superior a 200 serão abordados para participarem do teste de aplicação do kit de diagnóstico rápido. No caso seja constatada a contaminação do agricultor por meio do Kit, será coletada uma amostra de sangue do indivíduo para análise cromatográficas. Caso seja necessário a realização da coleta da amostra de sangue, o paciente será encaminhado para sede da equipe de saúde da família sem ônus para o paciente.

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver e aplicar um kit colorimétrico de diagnóstico rápido para detecção de contaminação

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.550-000

UF: MG **Município:** POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9270

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 1.771.145

por pesticida em agricultores do município de Bom Repouso, no sul de Minas Gerais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo oferece risco mínimo pela possibilidade de causar desconforto aos participantes durante a coleta de material biológico. como benefício, o estudo pode contribuir para a detecção precoce de contaminação por pesticidas entre a população rural.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Profissionais das equipes de saúde da família em suas visitas a essas comunidades terão a possibilidade de realizar esses testes, e se for detectado uma suspeita de intoxicação utilizando o kit, ele poderá solicitar outros exames e encaminhar esse agricultor para especialista e começar um tratamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão presentes.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto atende aos critérios da resolução 466/2012 e pode ser aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

enviar relatório final ao CEP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_800057.pdf	29/09/2016 11:17:38		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	28/09/2016 16:17:52	simone conceição maciel	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_Brochura_Investigador.pdf	26/09/2016 18:51:19	simone conceição maciel	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	26/09/2016 18:48:55	simone conceição maciel	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_Termos_de_Assentimento_Justificativa_de_Ausencia.pdf	26/09/2016 18:41:30	simone conceição maciel	Aceito

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.550-000

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9270

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 1.771.145

Justificativa de Ausência	TCLE_Termos_de_Assentimento_Justificativa de Ausencia.pdf	26/09/2016 18:41:30	simone conceição maciel	Aceito
---------------------------	---	------------------------	----------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

POUSO ALEGRE, 11 de Outubro de 2016

Assinado por:
Rosa Maria do Nascimento
(Coordenador)

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.550-000

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9270

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR COLORIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE PESTICIDAS EM AGRICULTORES.

Nome do Pesquisador Principal ou Orientador(a): Simone Conceição Maciel

Nome do Orientador(a): Prof. Dr. Manoel A. Teixeira

1. **Natureza da pesquisa:** o sr(a) está sendo convidada (o) a participar desta pesquisa que tem como finalidade desenvolver e aplicar um kit colorimétrico de diagnóstico rápido para detecção de contaminação por pesticida em agricultores do sul de Minas Gerais.

2. **Participantes da pesquisa:** 200 agricultores, produtores de morango do município de Bom Repouso, Sul de Minas Gerais.

3. **Envolvimento na pesquisa:** ao participar deste estudo, o participante tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone da pesquisadora do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.

4. **Sobre as entrevistas:** Será realizada reunião com os agricultores para esclarecimento do objetivo do projeto e seu benefício, a pós serão determinada as datas para coleta de material utilizado na pesquisa (urina/sangue).

5. **Riscos e desconforto:** a participação nesta pesquisa não traz complicações legais.

6. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente a pesquisadora e o orientador terão conhecimento dos dados.

7. **Benefícios:** ao participar desta pesquisa os agricultores não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga benefícios importantes, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa desenvolver um kit de diagnóstico rápido de toxicidade no sangue causada por uso de pesticida, oferecendo benefício de diagnóstico a todos os profissionais de saúde e tratamento eficaz a todos agricultores onde pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.

8. **Pagamento:** Os agricultores não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem.

ANEXO 3.

Quadro 1 - Características dos voluntários avaliados no projeto quanto ao sexo, idade, pH, resultado do sensor, colinesterase plasmática e valor de referência

AMOSTRA	SEXO	IDADE	pH-URINA	SENSOR	Resultado SENSOR	COLINESTERASE PLASMÁTICA	VALORES DE REFERÊNCIAS (U/L)
01	F	37	7	positivo	Incolor	4.629,00 U/L	4.700,00/10.400,00
02	M	55	7	positivo	Incolor	5.008,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
03	M	32	7	positivo	Incolor	5.419,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
04	M	53	5	positivo	Incolor	5.719,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
05	M	25	7	positivo	Incolor	6.161,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
06	M	27	7	positivo	Incolor	6.228,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
07	M	26	7	positivo	Incolor	6.556,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
08	F	39	7	positivo	Incolor	7.006,00 U/L	4.700,00/10.400,00
09	M	23	6	positivo	Incolor	7.580,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
10	M	56	7	positivo	Incolor	8.254,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
11	M	43	6	positivo	Incolor	10.098,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
12	F	52	7	negativo	Amarelado	5.375,00 U/L	4.700,00/10.400,00
13	F	48	6	negativo	Amarelado	5.568,00 U/L	4.700,00/10.400,00
14	F	26	7	negativo	Amarelado	5.574,00 U/L	4.700,00/10.400,00
15	M	45	7	negativo	Amarelado	5.873,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
16	F	44	7	negativo	Amarelado	6.024,00 U/L	4.700,00/10.400,00
17	F	40	5	negativo	Amarelado	6.089,00 U/L	4.700,00/10.400,00
18	F	47	6	negativo	Amarelado	6.232,00 U/L	4.700,00/10.400,00
19	M	33	7	negativo	Amarelado	6.421,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
20	M	60	7	negativo	Amarelado	6.500,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
21	M	43	5	negativo	Amarelado	6.692,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
22	M	60	5	negativo	Amarelado	6.950, 00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
23	M	61	6	negativo	Amarelado	6.977,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
24	F	50	7	negativo	Amarelado	7.231,00 U/L	4.700,00/10.400,00
25	M	60	6	negativo	Amarelado	7.298,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
26	M	46	6	negativo	Amarelado	7.383,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
27	M	58	7	negativo	Amarelado	7.419,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
28	M	50	6	negativo	Amarelado	7.524,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
29	M	31	7	negativo	Amarelado	7.551,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
30	F	54	6	negativo	Amarelado	7.626,00 U/L	4.700,00/10.400,00
31	M	54	6	negativo	Amarelado	7.803,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
32	M	37	5	negativo	Amarelado	7.994,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
33	M	22	7	negativo	Amarelado	8.059,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
34	F	56	7	negativo	Amarelado	8.061,00 U/L	4.700,00/10.400,00
35	F	45	5	negativo	Amarelado	8.129,00 U/L	4.700,00/10.400,00
36	F	42	5	negativo	Amarelado	8.087,00 U/L	4.700,00/10.400,00
37	M	23	7	negativo	Amarelado	8.137,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
38	M	41	6	negativo	Amarelado	8.224,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
39	F	46	6	negativo	Amarelado	8.441,00 U/L	4.700,00/10.400,00
40	M	27	7	negativo	Amarelado	8.471,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
41	F	51	5	negativo	Amarelado	8.479,00 U/L	4.700,00/10.400,00
42	M	20	7	negativo	Amarelado	8.494,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
43	M	33	6	negativo	Amarelado	8.600,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
44	M	23	5	negativo	Amarelado	8.811,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
45	F	46	6	negativo	Amarelado	8.882,00 U/L	4.700,00/10.400,00
46	M	45	5	negativo	Amarelado	8.906,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
47	M	48	7	negativo	Amarelado	8.908,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
48	F	49	7	negativo	Amarelado	8.974,00 U/L	4.700,00/10.400,00
49	F	37	5	negativo	Amarelado	8.977,00 U/L	4.700,00/10.400,00
50	M	23	8	negativo	Amarelado	9.049,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
51	M	37	5	negativo	Amarelado	9.051,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
52	F	55	6	negativo	Amarelado	9.170,00 U/L	4.700,00/10.400,00
53	F	35	6	negativo	Amarelado	9.231,00 U/L	4.700,00/10.400,00
54	M	23	8	negativo	Amarelado	9.279,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
55	M	33	7	negativo	Amarelado	9.289,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
56	M	40	6	negativo	Amarelado	9.339,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
57	M	27	5	negativo	Amarelado	9.361,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00

58	M	33	6	negativo	Amarelado	9.485,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
59	M	49	7	negativo	Amarelado	9.526,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
Continuação Quadro 1							
AMOSTRA	SEXO	IDADE	pH-URINA	SENSOR	Resultado SENSOR	COLINESTERASE PLASMÁTICA	VALORES DE REFERÊNCIAS (U/L)
60	F	64	7	negativo	Amarelado	9.563,00 U/L	4.700,00/10.400,00
61	M	47	6	negativo	Amarelado	9.572,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
62	F	54	5	negativo	Amarelado	9.879,00 U/L	4.700,00/10.400,00
63	M	42	6	negativo	Amarelado	10.141,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
64	M	28	7	negativo	Amarelado	10.229,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
65	M	33	5	negativo	Amarelado	10.718,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
66	M	65	7	negativo	Amarelado	10.818,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
67	M	40	6	negativo	Amarelado	10.819,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
68	M	28	7	negativo	Amarelado	10.919,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
69	F	20	6	negativo	Amarelado	10.996,00 U/L	4.700,00/10.400,00
70	M	45	6	negativo	Amarelado	11.218,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
71	M	29	7	negativo	Amarelado	11.369,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
72	M	56	7	negativo	Amarelado	11.456,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
73	M	52	6	negativo	Amarelado	11.516,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
74	M	54	8	negativo	Amarelado	11.842,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00
75	M	64	7	negativo	Amarelado	12.010,00 U/L	5.900,00/ 12.200,00

Fonte: Simone Conceição Maciel

Anexo 4

Dados estatísticos

Resultado SENSOR	COLINESTERASE PLASMÁTICA			VALORES DE REFERÊNCIAS (U/L)
Amarelado	10.996,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	5.574,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	9.231,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	8.977,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	6.089,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	8.087,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	6.024,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	8.129,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	8.441,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	8.882,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	6.232,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	5.568,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	8.974,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	7.231,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	8.479,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	5.375,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	7.626,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	9.879,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	9.170,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	8.061,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	9.563,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Incolor	4.629,00 U/L	positivo	2	4.700,00/10.400,00
Incolor	7.006,00 U/L	negativo	1	4.700,00/10.400,00
Amarelado	8.494,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	8.059,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	8.137,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	8.811,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	9.049,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	9.279,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	8.471,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	9.361,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	10.229,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	10.919,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	11.369,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	7.551,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	6.421,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	8.600,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	9.289,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	9.485,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	10.718,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	7.994,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	9.051,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00

Amarelado	9.339,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	10.819,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	8.224,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	10.141,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	6.692,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	5.873,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	8.906,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	11.218,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	7.383,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	9.572,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	8.908,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	9.526,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	7.524,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	11.516,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	7.803,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	11.842,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	11.456,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	7.419,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	6.500,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	6.950,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	7.298,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	6.977,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	12.010,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Amarelado	10.818,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Incolor	7.580,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Incolor	6.161,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Incolor	6.556,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Incolor	6.228,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Incolor	5.419,00 U/L	positivo	2	5.900,00/12.200,00
Incolor	10.098,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00
Incolor	5.719,00 U/L	positivo	2	5.900,00/12.200,00
Incolor	5.008,00 U/L	positivo	2	5.900,00/12.200,00
Incolor	8.254,00 U/L	negativo	1	5.900,00/12.200,00

	Positivo	Negativo
FS	2	21
FC	1	22

	Positivo	Negativo
MS	9	43
MC	3	49

Coloque 1 para negativo e 2 para positivo, realizei 3 testes estatísticos.

S = Sensor

C = Clinico

Correlação: SENSOR; CLINICO

Correlação de Pearson de SENSOR_1 e CLINICO_1 = 0.573
Valor-P = 0.000

Existe a dependência entre Sensor e Clinico devido estar avaliando características do mesmo indivíduo.

Friedman Feminino

Teste de Friedman: Resposta versus Análise blocado por Individuo

S = 0.04 GL = 1 P = 0.835
S = 1.00 GL = 1 P = 0.317 (ajustado para empates)

Análise	N	Mediana Est	Soma dos Postos
C	23	1.0000	34.0
S	23	1.0000	35.0

Mediana global = 1.0000

No feminino tanto o sensor como o clinico medem a mesma coisa.

Friedman Masculino

Teste de Friedman: Resposta versus Análise blocado por individuo

S = 0.69 GL = 1 P = 0.405
S = 6.00 GL = 1 P = 0.014 (ajustado para empates)

AnáliseM	N	Mediana Est	Soma dos Postos
C	52	1.0000	75.0
S	52	1.0000	81.0

Mediana global = 1.0000

No masculino o sensor mede coisa diferente do clinico, isto foi devido aos positivos de 9, 6 deram contrários.