

PADRONIZAÇÃO DO TESTE DO MICRONÚCLEO PARA AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E COLETA DE INFORMAÇÕES QUANTO AO USO ADEQUADO DE AGROTÓXICOS NA AGRICULTURA FAMILIAR DO MUNICÍPIO DE MARIALVA – PR.

Larissa TiemiAkamine Motomura (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Bianca Georg Fusinato, Renata Sano Lino, Simone Aparecida GalerianiMossini (Co-orientadora), Alice Maria de Souza-Kaneshima (Orientadora), e-mail:

amskaneshima@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área:40600009 - Saúde Coletiva - Subárea:40602001 - Saúde Pública

Palavras-chave: agrotóxico, genotoxicidade, micronúcleo.

Resumo:

Neste trabalho foi utilizado um roteiro de entrevista semi estruturado, sendo possível a identificação de alguns agrotóxicos com propriedades genotóxicas que estão sendo utilizados pelos agricultores, tais como glifosato, Vertimec®, Score®, Curzate®, Manzate®, Folpan®, Mustang®, Decis®. Bem como a identificação de que apenas 1 agricultor faz o uso completo de EPI. Diferentes roteiros para a padronização do teste de micronúcleo foram testados, sendo constatada que a agitação vigorosa, enxagues bucais e raspagem de 25 vezes do epitélio bucal de indivíduos tabagistas e não tabagistas foram as melhores condições estabelecidas. As células coletadas foram fixadas nas lâminas e utilizou-se a coloração Feulgen/Fast Green. Com auxílio da microscopia de luz com ampliação de 600X foram analisadas de 1800 a 1900 células bucais com característica dentro da normalidade. Com a padronização da técnica do micronúcleo, esta poderá ser aplicada entre os agricultores da agricultura familiar com o intuito de avaliar a genotoxicidade dos agrotóxicos.

Introdução

No Brasil, existem muitos agricultores familiares que tem livre acesso aos agrotóxicos, mas não há fiscalizações definidas e garantias trabalhistas que assegurem a utilização desses produtos pela agricultura familiar. Nosso país é um dos que mais consomem agrotóxicos no mundo, utilizando para controle de pragas. No entanto, também pode afetar os seres humanos, principalmente os agricultores, por meio de uma exposição crônica. Certas moléculas ativas presentes nos agrotóxicos, podem ter propriedades genotóxicas, com possibilidade de interagir e danificar a estrutura da molécula de DNA, podendo formar micronúcleos e outras mudanças na molécula, por isso é necessário fazer uma avaliação dos riscos e efeitos

causados pelo agrotóxico. O Teste do micronúcleo é muito utilizado em estudos de biomonitoramento humano, pelo fato de apresentarem os efeitos prejudiciais de diferentes compostos do DNA em nível de célula individual, e por isso, torna-se possível avaliar a genotoxicidade dos agrotóxicos (SPADOTTO, 2006). O objetivo deste trabalho foi padronizar o teste do micronúcleo em células do epitélio bucal e coletar informações do tipo de agrotóxico utilizado e frequência de uso, exposição ao agrotóxico e utilização de equipamentos de proteção dos agricultores da agricultura familiar do município de Marialva – PR

Materiais e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá (CAAE 31596620.9.0000.0104), parecer nº4.254.657. Um questionário foi elaborado na forma de um roteiro de entrevista semi estruturado para ser aplicado junto aos agricultores (população exposta a agrotóxicos). Foram coletadas informações pessoais, com a finalidade de identificar o perfil sócio-demográfico e comportamental. Identificação dos hábitos de vida como: tabagismo, uso recreacional ou nocivo de bebida alcoólica e de outras drogas de abuso e principalmente a exposição ocupacional a agrotóxicos e uso adequado de EPI. Para o Teste de micronúcleo foram coletadas amostras do epitélio jugal direito e esquerdo utilizando-se uma escova citológica. As amostras coletadas foram depositadas e transportadas em tubos cônico do tipo Falcon de 15mL contendo 5 mL da solução tampão Tris-HCl pH 7,0 (0,01 M Tris-HCl, 0,1M EDTA tetrassódico, 0,02 M cloreto de sódio e enviadas sob refrigeração para o laboratório de Patologia Geral onde foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm por três vezes, desprezando-se o sobrenadante e completando o volume para 5mL com o tampão Tris-HCl. Cerca de 40µl da solução contendo as amostras foi transferida para lâminas, secas ao ar livre por 24 horas ou mais, e posteriormente, fixadas em metanol 80%. A metodologia escolhida para a coloração foi a de Feulgen-Fast Green. As células foram avaliadas utilizando microscopia ótica de campo claro com uma ampliação de 600X para a identificação dos micronúcleos, onde para cada indivíduo foram contadas aproximadamente 2000 células do epitélio oral.

Resultados e Discussão

De um total de 11 agricultores contatados 5 responderam o questionário por meio de ligação telefônica. Este procedimento foi realizado para respeitar as normas de distanciamento social e também para não causar desconforto entre os agricultores que estavam receosos em responder pessoalmente as perguntas do questionário em decorrência da COVID-19.

Entre os agricultores entrevistados, verificou-se uma média de idade de 51 anos. Verificou-se também que 2 agricultores são ex-tabagistas (40%) e 3 nunca fumaram (60%). Sobre consumo de álcool, apenas 1 nunca ingeriu

bebida alcoólica (20%), 4 já ingeriram (80%), mas somente 1 agricultor (20%) ainda consome bebida alcoólica. O tabagismo é a principal causa de câncer no mundo (WUNSCH FILHO et al, 2013), sendo possível observar a presença de micronúcleos em células da mucosa bucal. Esta informação tem grande valor em termos de saúde pública, pois a exposição associada entre tabagismo e agrotóxicos aumenta a chance do desenvolvimento de uma neoplasia. O consumo de álcool, também é outra causa conhecida e associada ao desenvolvimento do câncer, ficando atrás apenas do tabagismo e de alguns agentes infecciosos (WUNSCH FILHO et al., 2013). Em relação a caracterização do contato com o agrotóxico, todos agricultores (100%) fazem a manipulação e aplicação dos agrotóxicos e 1 deles (20%) já se intoxicou com agrotóxicos, tendo como sintomas problemas gastrointestinais, mas não procurou atendimento médico. Em relação a caracterização do contato com o agrotóxico, o primeiro agricultor diz ter mais contato com Decani® (Clorotalonil), RoundupWG® (glifosato). O segundo agricultor tem um maior contato com o Score® (Difenoconazol), porém ainda utiliza Curzate® (Mancozebe e Cimoxanil), Manzate® (Mancozebe), Folpan® (Folpete), Decis® (Deltametrina), Talstar® (Bifentrina) e Estima® (Mancozebe e Zoxamida). O terceiro agricultor manuseia Mustang® (Zeta-cipermetrina) e Recop® (Oxicloreto de cobre), já o quarto agricultor só faz uso de fipronil e por fim, o quinto agricultor trabalha com a substância piretróide. É possível verificar que alguns desses apresentam propriedades genotóxicas, tais como glifosato, mancozebe, zeta-cipermetrina, deltametrina, bifentrina, clorotalonil, fipronil, oxicloreto de cobre, difenoconazol e abamectina (LIMAN et al., 2021; SRIVASTAVA et al., 2021). Em relação ao uso de EPI, 1 agricultor (20%) não utiliza nenhum equipamento, enquanto que os demais utilizam como EPI luvas, máscara, botas, macacão e viseira (1 pessoa correspondendo a 20%); luvas e máscaras foram utilizados por 2 agricultores (40%) e 1 agricultor (20%) faz uso apenas das luvas para manuseio com os agrotóxicos. O uso de EPI, como dispositivo de uso pessoal para proteger a integridade física do trabalhador é essencial por possibilitar menor exposição dos agricultores com os agrotóxicos. No entanto, entre os agricultores entrevistados, verificou-se que apenas 1 agricultor faz o uso completo de EPI. A utilização incorreta ou a falta de uso de proteção individual são fatores que trazem risco no trabalho do agricultor (MELLO e SILVA, 2013). Muitos agricultores sabem da importância do uso de EPIs, mas uma grande parte não utilizam por relatarem que o equipamento de proteção, causa incômodo ou atrapalham a realização das atividades de trabalho. Para a padronização da técnica do micronúcleo, optou-se por coletar as células bucais de indivíduos tabagistas que também podem apresentar risco para o desenvolvimento de micronúcleos, uma vez que os produtos da combustão do tabaco também tem potencial genotóxico. Durante a padronização do teste do micronúcleo, diferentes roteiros foram elaborados de acordo com o descrito em artigos científicos. Estes roteiros foram testados, visando selecionar aquele mais adequado, levando em consideração a ausência de detritos, a quantidade de células por lâmina e

tempo e eficiência da coloração. Dentre os roteiros testados, percebeu-se que a agitação vigorosa apresentou 8 vezes mais células em relação à agitação cuidadosa. Com 6 enxágues bucais antes da coleta, as lâminas apresentaram menos detritos, ficando mais limpas, e o epitélio jugal raspado 25 vezes apresentou maior número de células por lâmina. Foram analisadas entre 1800 a 1900 células do epitélio oral. Não foram observados micronúcleos nas amostras analisadas.

Conclusão

Conclui-se que foi possível a padronização da técnica do micronúcleo que pode ser aplicada em diferentes populações, inclusive entre os agricultores da agricultura familiar. Fica evidente a necessidade de atividades educativas junto aos agricultores participantes deste projeto, com o intuito de auxiliar na orientação e compreensão de que o uso de EPIs são necessários, bem como o descarte adequado das embalagens, visando minimizar o risco de contaminação do meio ambiente.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pela bolsa e incentivo à pesquisa científica.

Referências

LIMAN, R. et al. Cytotoxic and genotoxic evaluation of copperoxychloride through Allium test and molecular docking studies. *Environ Sci Pollut Res* 28, 44998-45008 (2021).

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. *Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar, EMBRAPA, São Manuel, 2006.* Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/131066/1/2006AA-047.pdf>. Acesso em: 11/08/2021

SRIVASTAVA, A. K. et al. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in culture human lymphocytes. *Life Sciences*, 2021 2; 90: 21-22

MELLO, C. M.; SILVA, L. F. Fatores associados à intoxicação por agrotóxicos: estudo transversal com trabalhadores da cafeicultura no sul de Minas Gerais. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 609-620, dez. 2013. Disponível em http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742013000400007&lng=pt&nrm=iso. acessos em 13 ago. 2021. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742013000400007>

WÜNSCH FILHO, V. Consumo de bebidas alcoólicas e risco de câncer. *Revista USP, [S. l.]*, n. 96, p. 37-46, 2013. DOI: 10.11606/issn.2316-9036.v0i96p37-46. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revusp/article/view/52255>. Acesso em: 13 ago. 2021.