



EFEITO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGROQUÍMICOS NA FUMICULTURA POR MEIO DE TESTE DE MICRONÚCLEOS

Natália Garcia dos Santos¹
Vívian Francília Silva Kahl²
Prof.^a Dr.^a Juliana da Silva³

Resumo

O fumo destaca-se como um dos principais produtos de exportação brasileira, sendo o Brasil o segundo país maior produtor. A fumicultura tem um ciclo produtivo que dura em torno de 10 meses, e desde a preparação do plantio, até a colheita, são usados vários agroquímicos. Os produtores se expõem diretamente a estes agentes químicos inorgânicos e orgânicos durante a pulverização, além da nicotina presente nas folhas do tabaco, que é absorvida pela pele durante o seu manuseio. O objetivo deste estudo foi detectar possíveis danos ao DNA, em trabalhadores rurais, durante o período de aplicação destes agroquímicos, através do teste de micronúcleos em células de mucosa oral em 400 indivíduos dos municípios de Santa Cruz do Sul e Venâncio Aires (RS), sendo 200 fumicultores (período de aplicação dos agroquímicos), e 200 indivíduos não expostos, da mesma região.

Palavras chave: fumicultura; mucosa; micronúcleos;

INTRODUÇÃO

A produção de fumo é a atividade agrícola com maior destaque no Brasil, destacando-se como o segundo maior país produtor, com uma produção superior a 500 mil toneladas, no último ano (AFUBRA, 2016). A maior parte da produção, cerca de 96%, concentra-se na região sul- Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná – os outros 4% são produzidos na região nordeste, nos estados da Bahia e Alagoas. Acredita-se que a produção de fumo seja a fonte de renda de cerca de 150 mil famílias nos estados citados anteriormente.

Apesar do grande impacto social e econômico gerado pela fumicultura, essa atividade exige uma grande quantidade de agroquímicos desde o plantio até a colheita. Com um ciclo produtivo longo, que dura cerca de 10 meses, dividindo-se basicamente nas fases de produção de mudas e de campo, são usados diversos tipos agrotóxicos, como herbicidas, inseticidas, fungicidas e antibrotantes. A quantidade a ser utilizada destes agroquímicos tem variado de acordo com a decisão de cada produtor, a partir de seus conhecimentos empíricos, não seguindo o modo de uso indicado pelos fabricantes dos mesmos. Muitos pesticidas são classificados como cancerígenos pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, 2015).

Além dos agroquímicos, há também o contato com compostos orgânicos, como a nicotina, que também causa danos à saúde dos trabalhadores. A nicotina, presente na folha de tabaco, é absorvida pela pele dos trabalhadores durante o momento da colheita e sortimento da folha quando estes se expõem diretamente a elas. A absorção aumenta caso a folha estejam úmidas (RIQUINHO & HENNINGTON, 2012). Alguns estudos mostraram que os agricultores estão mais propícios a certos tipos tumores específicos, como em vias aéreas e bexiga (BOLOGNESI, 2003).

¹Aluna de graduação em Ciências Biológicas da ULBRA – Bolsista PIBIC/CNPq – natygarcia_lg@hotmail.com

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

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

Muitos contaminantes presentes no ambiente podem afetar de forma direta os indivíduos e ter consequências imediatas, outros causam mutações gênicas que podem apresentar consequências às futuras gerações. A preocupação sobre o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes xenobiótico sem populações expostas ocupacionalmente ou acidentalmente vem crescendo. O biomonitoramento humano é usado para controlar os possíveis efeitos desses contaminantes à saúde humana, para isso usa-se biomarcadores, que avaliam a interação do sistema biológico com os agentes danosos. Existem diferentes modos para avaliar os efeitos e os riscos da exposição a agentes químicos, físicos e biológicos durante uma rotina de trabalho. Neste estudo foi usado o Teste de Micronúcleo (MN), que é um biomarcador de efeito da mutagenicidade, que detecta pequenos núcleos adicionais, resultantes da quebra cromossômica ou até perda de um cromossomo inteiro que se desprende do núcleo principal, por conta de danos genéticos, a partir de amostras de mucosa oral, com o objetivo de avaliar possíveis danos ao DNA nos fumicultores.

METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho foram feitas coletas de células de mucosa oral em 400 indivíduos de dois municípios, Santa Cruz do Sul e Venâncio Aires, do Estado do Rio Grande do Sul, sendo 200 fumicultores e 200 indivíduos não expostos, da mesma região. A todos os indivíduos foi aplicado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e uma versão em português adaptada do questionário da Comissão para Proteção Contra Mutagênicos e Carcinogênicos Ambientais (CARRANO & NATARAJAN, 1988), da diretriz The Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) (BABOR *ET AL.*, 1992; MENDOZA-SASSI & BÉRIA, 2003), do Lung Cancer Screening (NCCN Guideline for Patients) (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2014) e um questionário nutricional Recordatório de 24h (R24h) (WILLETT & LENART, 1998), com o objetivo de caracterizar cada um deles quanto a estilo de vida, idade, tempo e forma de exposição e hábitos nutricionais. Foram inclusos apenas maiores de 18 anos e que não possuíssem nenhuma patologia crônica prévia (CONEP: CAAE 35639814.5.0000.5349).

As coletas, realizadas durante o período de aplicação dos agroquímicos, foram feitas através de esfregação, com uma escova de dentes infantil com cerdas macias (THOMAS *ET AL.*, 2009), da parte interna das bochechas, dos lados direito e esquerdo, de cada indivíduo. A escova foi colocada em um tubo cônico contendo 10 ml de Saccomano [50% (vol/vol) de etanol e 2% (vol/vol) de glicol polietileno diluídos em água]. As amostras foram centrifugadas por 10 (dez) minutos a 1.500 rpm e as células sedimentadas foram homogeneizadas com tampão específico (TrisHCl, EDTA, NaCl e água miliQ). Depois de contabilizada em hemocitômetro, a suspensão celular foi colocada sobre lâminas microscópicas via citocentrífuga e secas à temperatura ambiente. Em seguida foi feita a coloração das lâminas com reação Feulgen (hidrólise em 37% de HCl, seguida de imersão em reagente de Schiff e usado como contra corante Fast-Green 0,2%, ambos da Sigma-Aldrich). Após todos os procedimentos químicos as lâminas coradas foram avaliadas por microscopia óptica, 2000 células, para analisar diferentes tipos celulares delineados pelo BMCyt: células basais, células contendo micronúcleos (diferenciadas), brotos nucleares, células binucleadas e células com cromatina condensada, cariorréticas, cariolíticas e picnóticas (THOMAS *ET AL.*, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises do teste de micronúcleos em mucosa oral (BMCyt), mostrou que houve um aumento significativo de células com cromatina condensada (CC) e células cariorrética (KR), já nas células picnóticas (PY) e cariolíticas (KL) houve um aumento, porém este foi pequeno (Figura1). Todas estas anormalidades nucleares indicam morte celular para os

indivíduos expostos com relação aos indivíduos controle. Também houve um aumento significativo de células com micronúcleos (MN), broto celular (BUD), broken-egg (BE) e células binucleadas (Figura 2), o que indicam danos ao DNA. De forma mais específica, MN podem ser por origem clastogênica e /ou aneugênica, BUD por amplificação gênica.

Figura 1 - Resultados do Teste de Micronúcleo da mucosa oral (BM Cyt) nos grupos controle e exposto: parâmetros de morte celular; CC: células com cromatina condensada; KR: células cariorréticas; PY: células picnóticas; KL: células cariolíticas. Diferença significativa em relação com o grupo controle (não exposto) *P<0.05; *** P<0.001. Mann-Whitney test; média (\pm desvio padrão).

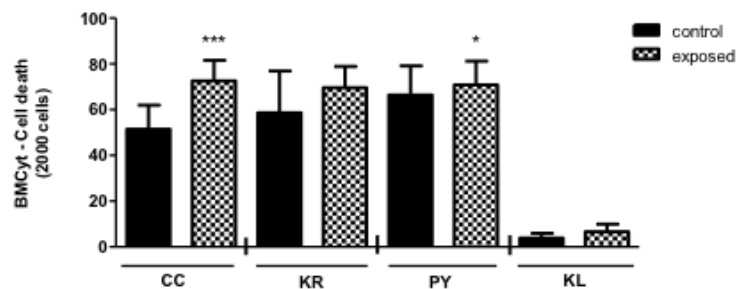
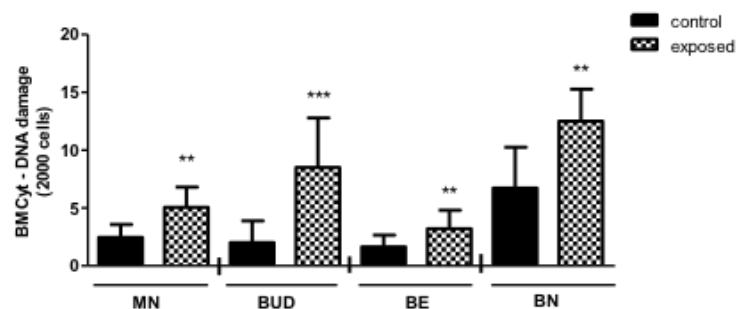


Figura 2 - Resultados do Teste de Micronúcleo da mucosa oral (BM Cyt) nos grupos controle e exposto: células com danos fixos ao DNA; MN: células com um, dois, ou mais micronúcleos; BUD: célula com broto nuclear; BE: célula com *broken-egg*; BN: células binucleadas. Diferença significativa em relação ao grupo controle (não exposto) *P<0.01; *** P<0.001. Mann-Whitney test; média (\pm desvio padrão).



O Teste de Micronúcleo é um método muito utilizado em estudos para a avaliação de danos ao DNA, por ser um ensaio com de relativo baixo custo, simples, de fácil execução e a análise pode ser realizada com diferentes tipos de células, como cultura de linfócitos e células de mucosa oral (MALUF & ERDTMANN, 2003; VILLELA *ET AL.*, 2003; THOMAS *ET AL.*, 2009).

O mau uso de agroquímicos pode levar a níveis significativos de exposição entre os profissionais expostos. O ambiente de trabalho, o não uso dos equipamentos de proteção individuais, o período e as condições de exposição já foram descritos na literatura como fatores que podem afetar os níveis de danos citogenéticos (BOLOGNESI, 2003). Neste estudo foi possível observar, valores significativamente mais elevados para o grupo de indivíduos expostos a agroquímicos, os fumicultores, com relação ao grupo controle, isso demonstra o efeito mutagênico e citotóxico devido à exposição a uma mistura complexa de agentes.

CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou a presença do efeito mutagênico e citotóxico em células de mucosa oral de fumicultores expostos a agroquímicos. Fica evidente que a exposição frequente e sem proteção aos agroquímicos e as misturas dos agroquímicos usados no plantio

do fumo, tem capacidade de promover mutações, que foram verificadas através do teste de MN, aumentando significativamente o número de células com danos ao DNA nos indivíduos expostos. Portanto, o biomonitoramento e a avaliação de risco dos fumicultores expostos se fazem necessário para encontrar soluções que proporcionem a proteção adequada quanto ao uso de agroquímicos durante o plantio do fumo. É importante que se possa evitar e/ou minimizar os riscos à saúde a longo prazo, os quais podem levar ao desenvolvimento de câncer e outras doenças degenerativas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a CNPq pela oportunidade de atuar como bolsista de iniciação científica que é de extrema importância para minha carreira profissional e meu desenvolvimento pessoal. Além do financiamento do CNPq, FAPERGS e ULBRA.

Referências

AFUBRA (Associação dos Fumicultores do Brasil). 2017. Fumicultor Sul-Brasileiro. Disponível em: <http://www.afubra.com.br/index.php/conteudo/show/id/76> [Acesso em: 18.05.17].

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, v. 543, p. 251-272, 2003.

BOLOGNESI, C., CREUS, A., OSTROSKY-WEGMAN, P., MARCOS, R. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*, v. 26, p. 19-26, 2011.

COLLOTTA, M., BERTAZZI, P.A., BOLLATTI, V. Epigenetics and pesticides. *Toxicology*, v. 307, p. 35-41, 2013

DA SILVA, F.R., DA SILVA, J., ALLGAYER, M.C., SIMON, C.F., DIAS, J.F., DOS SANTOS, C.E., SALVADOR, M., BRANCO, C., SCHNEIDER, N.B., KAHL, V., ROHR, P., KVITKO, K. Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: biomarkers of exposure, of early biological effects and of susceptibility. *Journal of Hazardous Materials*, v. 225-226, p. 81-90, 2012a.

DA SILVA, J., HEUSER, V.D., ANDRADE, V.M., **Biomonitoramento Ambiental**. In: HENRIQUES, J.A.P., ERDTMANN, B., SILVA, J. (orgs.) *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

DA SILVA, J., MORAES, C.R., HEUSER, V.D., ANDRADE, V.M., DA SILVA, F.R., KVITKO, K., EMMEL, V., ROHR, P., BORDIN, D.L., ANDREAZZA, A.C., SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.P., ERDTMANN, B. Evaluation of genetic damage in Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis*, v. 23, p. 415-422, 2008

DA SILVA, J.M., NOVATO-SILVA, E., FARIA, H.P., PINHEIRO, T.M.M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para o trabalhador rural. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 10, p. 891-903, 2005.

MALUF, S.W., ERDTMANN, B. **Biomonitorização do Dano Genético em Humanos**. In: HENRIQUES, J.A.P., ERDTMANN, B., SILVA, J. (orgs.) *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance 2003.

THOMAS, P., HOLLAND, N., BOLOGNESI, C., KIRSCH-VOLDERS, M., BONASSI, S., ZEIGER, E., KNASMUELLER, S., FENECH, M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, v. 4, p. 825-837, 2009.