

Título do Projeto: Avaliação de indicadores de saúde e efeitos genotóxicos em população humana e peixes de igarapés sob potencial exposição à pesticidas na região Oeste do Pará.

Código: PICE1372-2024

Título do Plano de Trabalho: Avaliação de genotoxicidade por ensaio cometa em peixes expostos a resíduos de agrotóxicos em igarapés do Planalto Santareno.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues

Resumo do plano de trabalho:

O objetivo deste plano de trabalho é avaliar o perfil de alterações mutagênicas em peixes de pequeno porte nativos de igarapés de terra firme na região do planalto santareno, na região oeste paraense. A área de estudo abrange o entorno de áreas de cultivo da soja nos municípios de Santarém, Belterra e Mojuí dos Campos, expostas ambientalmente a resíduos de agrotóxicos. Os danos mutagênicos em peixes serão avaliados, por meio do Ensaio cometa em eritrócitos. Os dados mutagênicos obtidos serão correlacionados com variáveis ambientais de qualidade da água e contaminação de sedimentos.

Introdução/Justificativa:

O crescente uso de defensivos agrícolas tem sido essencial ao sustento da cadeia produtiva da soja (Carneiro *et al.*, 2015). Sendo o Brasil o maior produtor e exportador de soja no mundo (Embrapa, 2023), a expansão dos territórios utilizados para o plantio dessa *commodity* tem sido cada vez mais intensa ao longo da última década. Com a expansão da cultura da soja na região do oeste do Pará, extensas áreas de florestas nativas foram transformadas em vastos campos de cultivo.

A presença dos cultivos mais próximos às cidades e às comunidades alerta para os possíveis efeitos que os pesticidas utilizados podem causar à saúde humana e ao meio ambiente. Esses compostos são usados para afastar pragas e doenças das plantações, bem como aumentar a produtividade da cultura. No entanto, sabe-se que geram poluição ambiental, como danos aos solos e aos corpos d'água, e demais organismos presentes no ambiente, levando à perda da biodiversidade, podendo também afetar a saúde humana (Abubakar *et al.*, 2020).

Com a exposição aos compostos dos agrotóxicos por um longo período e em baixas concentrações, presentes no ambiente, como na exposição indireta, o organismo pode desenvolver a intoxicação crônica (Neves *et al.*, 2020). Dessa forma, os moradores de áreas próximas à fronteira agrícola estão suscetíveis a sofrer os impactos de tal exposição, visto que são utilizados pesticidas nas plantações e os resíduos são dispersados no meio ambiente, especialmente pela deriva do ar (Schleiffer; Speiser, 2022).

O uso de organismos aquáticos como bioindicadores para avaliação de contaminação ambiental tem sido aplicado com frequência, utilizando-se principalmente o teste de micronúcleos (Schmid 1975; Bolognesi e Hayashi, 2011). O teste de micronúcleo (MN) foi adaptado para peixes por Hoofman e Raat (1982), possui vantagens por sua simplicidade sendo uma das técnicas mais aplicáveis para identificar alterações genômicas. Entretanto, para avaliação de genotoxicidade envolvendo danos ao DNA o Ensaio Cometa tem sido a técnica mais empregada, por ser um método rápido, com baixo custo e confiável (Brianezi *et al.*, 2009).

O Ensaio Cometa (EC), ou Técnica de Eletroforese em Celular em micro gel, do inglês *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE), é um teste que tem a capacidade detectar danos e reparos de DNA em diferentes tipos celulares. O processo do EC inicia-se pela lise de membranas celulares e extração das proteínas nucleares, seguida pela indução da migração eletroforética do DNA liberado em matriz de agarose (gel). Quando vista ao microscópio, a célula lesionada e migrada, adquire a forma semelhante de um cometa, com cabeça, a região nuclear, e cauda, que contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram para fora do núcleo, em direção do polo ânodo. As células que não tiverem danos em seu DNA, migrarão em conjunto, formando um círculo (Brianezi *et al.*, 2009). O teste realizado em pH alcalino, possui uma maior sensibilidade para detecção no material genético, tornando visíveis as quebras de fita simples, duplas e os sítios álcali-lábeis, onde a quantidade de DNA será evidenciada por um rastro ou cauda, onde este indica a quantidade de DNA danificado (Singh *et al.*, 1988).

O presente plano de trabalho visa contribuir com o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3, Saúde e Bem-estar, previsto pela Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU). A partir dos conhecimentos desenvolvidos nesta pesquisa, poderão ser esclarecidas questões sobre os impactos da poluição hídrica sobre a biodiversidade e do risco da exposição humana aos agrotóxicos e seus efeitos adversos ao DNA de indivíduos na região Oeste do Pará. Além disso, busca-se embasar futuras alternativas para as tomadas de decisão políticas e socioambientais, as quais incluam a saúde ambiental e humana de forma integrativa no escopo da abordagem “*one-health*”, para, assim, garantir o uso sustentável dos componentes abióticos presentes no território amazônico e, conseqüentemente, a qualidade de vida.

Potencialmente, este estudo também contribui para descrever e avaliar novos dados, em um cenário de escassez destes tipos de pesquisa na região amazônica, contribuindo aos estudos da área de potencial exposição aos agrotóxicos através da genotoxicidade pelo biomarcador de ensaio cometa.

Objetivos:

1. GERAL: Avaliar o perfil de genotoxicidade em peixes e qualidade ambiental em corpos d'água de igarapés no entorno de áreas de cultivo da soja nos municípios de Santarém, Belterra e Mojuí dos Campos, expostas ambientalmente a resíduos de agrotóxicos.
2. ESPECÍFICOS:
 1. Avaliar o índice de dano no DNA em peixes coletados no entorno das áreas de cultivo de soja;
 2. Avaliar parâmetros a presença de poluentes derivados de agrotóxicos em amostras de água e sedimentos coletados na área de estudo;

Metodologia:

O estudo será realizado em comunidades rurais nas proximidades da Rodovia Santarém-Curuá-Una (PA-370) e BR-163, nos municípios de Santarém, Belterra e Mojuí dos Campos, região Oeste do Pará. Parâmetros físico químicos da água (pH, temperatura, O₂ dissolvido e Condutividade elétrica) serão coletados in situ, utilizando sonda multiparâmetro Lovibond. As amostras ambientais (água e sedimentos) serão coletadas conforme protocolo padronizado (Filizola *et al.* 2006), mantidas sob refrigeração para transporte ao laboratório e preservadas por congelamento a -20°C até o momento da análise. As análises de resíduos poluentes serão processadas em parceria com a Universidade de Brasília (UNB) sob a responsabilidade técnica do Prof. Dr. Carlos José Passos. Os peixes serão coletados com auxílio de redes e peneiras, serão

acondicionados em sacos plásticos e transportados para o Laboratório de Genética e Biodiversidade na UFOPA, campus Tapajós, mantidos na mesma água do sítio de coleta e oxigenados por aeração mecânica. Amostras sanguíneas serão obtidas em até 24h após a coleta.

Baseado no protocolo de Santos (2009) o ensaio cometa será realizado em condições alcalinas (pH>13) ajustando-o com NaOH concentrado. Serão coletados 50 µl de sangue em seringas heparinizadas e adicionados em tubos heparinizados individuais onde se adicionou 75µl de agarose de baixo ponto de fusão dissolvida em água destilada a 37°C.

Em seguida as soluções serão espalhadas sobre uma lâmina coberta com uma camada de 200µl de gel de agarose dissolvida em água destilada a 37°C deixando-a secar a temperatura ambiente overnight. As lâminas então serão imersas em solução de lise gelada (2.5 M NaCl, 100 mM Tris, pH 10.0 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) protegidas da luz por 2 horas.

Posteriormente as lâminas serão postas em cuba horizontal de eletroforese cobertas por tampão específico (Solução A= 300mM NaOH, Solução B = 1 mM EDTA) por 20 minutos, ainda protegidas da luz, a eletroforese será realizada a 25V com uma corrente de 300mA por 15 minutos.

Após a eletroforese as lâminas serão submersas em tampão TRIS (0.4 M Tris pH 7.5) por 5 minutos 3 vezes desprezando o tampão a cada vez, em seguida as lâminas serão lavadas 2 vezes com água destilada e dispostas para secar a temperatura ambiente em overnight. No dia seguinte as lâminas serão postas em solução fixadora (15% de ácido tricloroacético com 5% de sulfato de zinco e 5% de glicerol) por 10 minutos sendo lavada posteriormente 3 vezes com água destilada e postas para secar em estufa à 37°C por uma hora e meia. Por fim as lâminas serão hidratadas com água destilada por 5 minutos, coradas por 30 minutos com coloração de prata (solução A= 5% de carbonato de sódio e solução B= 0.1% de nitrato de amônia com 0.1% de nitrato de prata, 0.25% de ácido tungstosilícico e 0.15% de formaldeído), sendo então lavadas 3 vezes com água destilada, secas a temperatura ambiente analisadas em microscópio óptico no aumento de 200x.

Serão analisadas 100 células para cada indivíduo, classificando-se, visualmente, de acordo com o comprimento da cauda em relação à cabeça do nucleóides, sendo classificados em classes de danos de 0 a 4. O índice de danos ao DNA foi estipulado através do valor de SCORE/ID visual, calculado pelo número de cometas em cada classe multiplicado pelo valor da classe, de acordo com a fórmula abaixo (AZQUETA e COLLINS, 2014):

$$ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$$

Onde n é o número de cometas em cada classe.

ID, corresponde ao índice de dano no DNA

Referencias

ABUBAKAR, Y. et al. **Pesticides, history, and classification. In: Natural remedies for pest, disease and weed control.** Academic Press, 2020. p. 29-42. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8>. Acesso em: 06 de junho de 2024.

AL-SABTI, K., & METCALFE, C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation research**, 343(2-3), 121–135. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0)

AZQUETA, A., COLLINS, A.R. The Comet Assay: High Throughput use of FPG. In: SIERRA, L.M., GAIVÃO, I. **Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach**. New York Humana Press Springer. p.199 – 218, 2014.

BOLOGNESI C.; HAYASHI M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**. Oxford. v. 26 no. 1 pp. 205–213, 2011.

BOMBAIL, V., AW, D., GORDON, E., BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 383-392, 2001.

BRIANEZI, G. S. et al. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. (Orgs.). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Aquat. Sci**, v 47, p. 2123-2136, 1990.

CERNY, M. E. V. et al. **Análise de parâmetros bioquímicos e de dano de DNA em uma população de agricultores do estado de Santa Catarina exposta a pesticidas**. 2021. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Disponível em: <<https://tede.ufsc.br/teses/PCCF0523-D.pdf>>. Acesso em 05 de jun. de 2024.

DAMALAS, C. A.; KOUTROUBAS, S. D. Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention. **Toxics**, v. 4, n. 1, p. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxics4010001>. Acesso em: 06 de junho 2024.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) (Brasília). Brasil lidera e é referência no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para produção de soja. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/81613580/brasil-e-referencia-no-desenvolvimento-de-tecnologias-sustentaveis-para-producao-de-soja>. Acesso em: 06 de junho de 2024.

FERREIRA, M. L.; MALESKI, A. L. A.; BALAN-LIMA, L.; BERNARDO, J. T. G.; HIPOLITO, L. M.; SENI-SILVA, A. C.; LIMA, C. Impact of pesticides on human health in the last six years in Brazil. **International journal of environmental research and public health**, 19(6), 3198, 2022.

FILIZOLA, H.F.; GOMES M.A.F.; SOUZA, M.D. **Manual de Procedimentos de Coleta de Amostras em Áreas Agrícolas para Análise da Qualidade Ambiental: Solo, Água e Sedimentos**. Ed. EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, 2006.

FREITAS, F. A. P. S.; UCHÔA, I. S.; MAGALHÃES, M. A. V. Importância do Teste de Micronúcleos como Instrumento Preventivo em Saúde Geral e Ambiental. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 68530-68542, 2020.

GARCÍA-GARCÍA, C. R.; PARRÓN, T.; REQUENA, M.; ALARCÓN, R.; TSATSAKIS, A.M.; HERNÁNDEZ, A. F. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. **Life Sci**; 145:274-283, 2016.

HOOFTMAN, R. N.; DE RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research Letters**, v. 104, n. 1-3, p. 147-152, 1982.

LÓPEZ, O.; HERNÁNDEZ, A. F.; RODRIGO, L.; GIL, F.; PENA, G.; SERRANO, J. L.; PLA, A. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. **Toxicology letters**, 171(3), 146-153, 2007.

NEVES, P. D. M.; MENDONÇA, M. R.; BELLINI, M.; PÔSSAS, I. B. Intoxicação por agrotóxicos agrícolas no estado de Goiás, Brasil, de 2005-2015: análise dos registros nos sistemas oficiais de informação. **Ciência & Saúde Coletiva**, 25(7), 2743-2754., 2020.

RUSSO, C., ROCCO, L., MORESCALCHI, M. A., STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 57, n. 2, p. 168-174, 2004.

SANTOS, Patrícia Estevam dos. Biomarcadores genotóxicos no monitoramento de estuários com diferentes níveis de contaminação utilizando peixes coletados in situ. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo. 2009.

SCHLEIFFER, M.; SPEISER, B. Presence of pesticides in the environment, transition into organic food, and implications for quality assurance along the European organic food chain—A review. **Environmental Pollution**, 120116, 2022.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.