

Artigo Original

Resistência bacteriana relacionada ao uso de agrotóxicos no município de Santa Maria de Jetibá – ES

Bacterial resistance related to the use of pesticides in the municipality of Santa Maria de Jetibá – ES

Aysha Lucia Holz¹, Bianca Giacomini Rebonato¹, Fernanda Mendes Colombeki¹, Joaquim Francisco Marcelino Alves¹, Kelly Zucolotto Totola¹, Thais Lemos Kaiser², Silvia Ramira Lopes Caldara¹

¹Escola Superior São Francisco de Assis

²Laboratório Madre Regina Prottman

Autor correspondente: silviaramira@gmail.com

RESUMO A utilização de insumos agrícolas é uma prática comum desde a idade média, e tem a finalidade de combater fungos e insetos. No período da Segunda Guerra Mundial, o Brasil iniciou o desenvolvimento da agropecuária, implementando sementes transgênicas e a utilização de agrotóxicos. O país ganhou destaque mundial no ano de 2008, por se tornar o país com maior consumo de agrotóxicos e possuir uma legalidade ampla e excessiva de tais produtos. O objetivo do trabalho foi investigar se há prevalência de cepas do gênero *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos nos produtores rurais que fazem utilização de insumos agrícolas, e se há diferença entre antibióticos dentro e fora do prazo de validade. Os treze voluntários foram divididos em dois grupos, inorgânico (7) e orgânicos (6). Referente ao primeiro grupo, 43% diz não fazer uso de EPI, enquanto 57% faz uso parcial dos equipamentos, como bota ou luva. Em sua totalidade, disseram fazer uso da bomba costal na aplicação dos insumos agrícolas, e, de acordo com os voluntários, os pesticidas mais utilizados são: Roundup® e Glifosato®. Ao avaliar o crescimento das colônias, observou-se que algumas apresentaram o aspecto diferente do esperado, com características que não se assemelhavam a colônias de *Staphylococcus*. Com essas colônias foram feitas as lâminas para coloração de Gram e todas resultaram em bacilos gram-positivos. Embora os danos da utilização de agrotóxicos nas lavouras seja de conhecimento dos agricultores, todos os que cultivam de forma inorgânica não fazem a utilização correta dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e houveram diferenças entre a eficácia de alguns antibióticos que deverá ganhar mais representatividade aumentando o número de amostra.

PALAVRAS-CHAVE: agrotóxico, resistência bacteriana, antibióticos.

INTRODUÇÃO

A utilização de compostos químicos é uma prática comum há muito tempo, com cerca de 80 anos (BARBOZA et al., 2018), desde a idade média, com a

finalidade de combater insetos e fungos (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). No início do século XX, compostos orgânicos sintéticos passaram a ser utilizados em grande escala (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

No período da Segunda Guerra Mundial, na

década de 40, o Brasil iniciou o desenvolvimento da agropecuária, implementando sementes transgênicas e a utilização de agrotóxicos (LAZZARI; SOUZA, 2017). Outro grande fator que contribuiu para o fortalecimento da utilização de agrotóxicos no Brasil foi o Plano Nacional de Desenvolvimento (PEREIRA et al., 2017; YAMASHITA; SANTOS, 2009). O país ganhou destaque mundial no ano de 2008, por se tornar o país com maior consumo de agrotóxicos e possuir uma legalidade ampla e excessiva de tais produtos (BARBOZA et al., 2018).

Diferente de outras linhas de pesquisa, que estudaram a conexão do uso de insumos agrícolas com bactérias de solo ou alimentos, este estudo é o primeiro na busca da relação existente entre o desenvolvimento de genes de resistência em bactérias da microbiota humana e a utilização de agrotóxicos, comparando a população de trabalhadores que tem exposição e contato direto com os insumos agrícolas com a população que é livre de qualquer tipo deste produto.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção da população

Foi realizado um levantamento de informações sobre locais, datas e horários das Feiras Livres na região de Santa Teresa e Santa Maria de Jetibá. Nas feiras foi possível fazer o primeiro contato com os produtores orgânicos e inorgânicos. Além das feiras, os produtores foram encontrados em suas propriedades particulares, no interior de Santa Teresa e na Astral, uma associação de produtores orgânicos. O total de participantes foi de 13 voluntários e dessa forma obtiveram-se dois grupos:

Grupo 1 (G1 - Caso): 7 Indivíduos que tenham contato direto com os agrotóxicos

Grupo 2 (G2 - Controle): 6 Indivíduos que não tenham nenhum contato com agrotóxicos.

Os voluntários eram escolhidos de forma aleatória e questionados sobre o interesse na participação do projeto, que era exposto a eles de forma clara e objetiva. Aqueles que aceitaram participar da pesquisa receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cada participante respondeu um questionário, com perguntas específicas para o grupo de orgânicos e inorgânicos. Os critérios de inclusão para os agricultores inorgânicos foi que todos deveriam aplicar diretamente o insumo agrícola na propriedade. E quanto aos produtores orgânicos, deveriam ser certificados da produção sem agrotóxicos.

Coleta das amostras

O material biológico utilizado nas análises foi coletado na região das narinas, com auxílio do swab, para pesquisa do gênero *Staphylococcus aureus*. Após a coleta, o material foi inoculado em caldo BHI dentro de tubos Falcon, levado ao laboratório da Faculdade Superior São Francisco de Assis – ESFA e armazenado em estufa bacteriológica para crescimento, a 37° por 24h.

Processamento das amostras

As amostras foram retiradas da estufa e semeadas em placas de Petri com ágar Manitol Salgado, através do método de esgotamento com alça bacteriológica. Os meios foram incubados em estufa bacteriológica a 37° e observados após 24h. Após o crescimento, foi feita a identificação de quais amostras mudaram a cor do meio para amarelo e quais permaneceram com a mesma coloração.

Identificação das colônias encontradas

As bactérias que não alteraram a cor do meio

foram classificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa e foram descartadas por não se encaixarem na espécie desejada. Através da observação das colônias foram separadas aquelas placas que apresentaram aspecto mucoide e cremoso. Estas seguiram para a coloração de Gram para identificação. As bactérias que mudaram a cor do meio para amarelo, parcialmente ou totalmente, seguiram para a prova da coagulase, para confirmação da espécie *S. aureus* e para o teste de difusão de discos.

Investigação de resistência bacteriana

A partir da separação das placas após resultado da fermentação no manitol e prova da coagulase, as cepas foram submetidas ao teste de difusão de disco para avaliação do perfil de resistência a diferentes drogas. Para realização do teste as cepas repicadas foram suspensas em salina estéril (0,9%) até turvação correspondente a escala 0,5 Mac Farland, e em seguida semeadas nas placas de com auxílio de um swab estéril pela técnica de semeadura em confluência. Após 10min, os discos de antimicrobianos foram colocados sobre a superfície do meio, com auxílio de pinça e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica, a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação, foi realizada a leitura dos halos de inibição em mm de acordo com o documento CLSI (2018). A tabela 1 mostra as drogas que foram testadas. Foram utilizados discos de antimicrobianos dentro e fora do prazo de validade e dispensados sobre as

placas com uma ordem pré-estabelecida para controle.

Correlação entre grupos

Após a investigação de quais cepas apresentam resistência aos antibióticos testados, foi realizada a comparação entre os grupos G1 e G2, a fim de verificar em qual dos grupos houve prevalência de resistência. Através dos resultados dos halos, e com auxílio do programa PRISMA, foi feita a comparação e análise estatística entre os antimicrobianos vencidos e novos, para verificar a eficácia daqueles que já haviam passado do prazo de validade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados um total de 13 participantes. Destes, 7 são produtores inorgânicos, 6 residem em Lombardia, no interior de Santa Teresa e 1 é residente de Santa Maria de Jetibá. Quanto aos produtores orgânicos, são 6 voluntários e metade reside em Santa Maria de Jetibá e a outra metade reside em Santa Teresa. A média de idade dos voluntários foi de 50 anos, 10 deles são do sexo masculino e 3 do sexo feminino.

Apenas 3 produtores, sendo 2 inorgânicos e 1 orgânico, não tiveram nenhuma escolaridade. Porém, a maioria apresenta escolaridade somente até a 4ª série. Nas tabelas 2 e 3 estão expostas as respostas dos questionários realizado com os agricultores.

No meio contendo ágar Manitol Salgado, as amostras 04, 09, 10, 11 não fermentaram e o meio não alterou a cor. As amostras 03, 06, 07 fermentaram totalmente, tornando-o amarelo. Algumas não fermentaram totalmente e a cor do meio foi alterada em alguns pontos da placa, que foi o caso das amostras 01, 02, 05, 08, 12, 13. Em algumas placas houve crescimento de mais de uma colônia, que foram as placas das amostras 07 e 08. O teste da coagulase foi realizado com aquelas amostras que fermentaram o meio Manitol Salgado, tanto

Tabela 1. Antimicrobianos que serão testados para *Staphylococcus aureus*.

Cefoxitina
Sulfá/trimetropim
Ciprofloxacino
Gentamicina
Eritromicina
Clindamicina

Tabela 2. Respostas do questionário grupo G1 – Produtores Inorgânicos.

	9 Participantes	7 Participantes	8 Participantes	6 Participantes	10 Participantes	11 Participantes	13 Participantes
Tempo usando agrotóxicos	40 anos	12 anos	27 anos	65 anos	21 anos	20 anos	10 anos
Marcas	Roundup Verdadeiro	Roundup	Roundup	Roundup e Glifósato	Roundup e Glifósato	Roundup e Glifósato	Polytrin
Equipamentos de proteção	Não	Não	Máscara e luva	Não	Máscara, camisa e botas	Máscara e botas	Máscara e capa
Leitura de rótulo	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim
Produtos	Cafê	Banana e café	Banana e café	Cafê	Cafê	Cafê	Chuchu, tomate e quiabo
Frequência de aplicação	Roundup 3 vezes no ano, Verdadeiro 1 vez no ano	1 vez no ano	2 a 3 vezes no ano	2 vezes no ano	1 vez por semana quando necessário	1 vez por semana quando necessário	2 vezes na semana
Conduta após colheita	Estufa ou secadora	Lavagem e secadora	Lavagem e secadora	Secadora.	Estufa e secadora	Estufa e secadora	Nenhuma
Forma de aplicação	Bomba	Bomba	Bomba	Bomba	Bomba	Bomba	Bomba
Consumo	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Tabela 3. Respostas do questionário grupo G2 – Produtores Orgânicos.

	1 Participante	2 Participantes	3 Participantes	4 Participantes	5 Participantes	12 Participantes
Produtos	Cacau, banana e aipim	Frutas em geral, temperos verdes, alface, rúcula e repolho	Alface, repolho, pepino, batata, aipim, inhame e cenoura	Cafê, banana, pimenta do reino, açafrão, cacau e amendoim	Alface, temperos verdes, rúcula, cenoura, repolho, limão, rabanete e alho	Tomate, cenoura, alface, abóbora, alho, cebola
Tempo de produção orgânica	13 anos	3 anos	10 anos	2 anos	5 anos	28 anos
Consome os alimentos	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Conduta após colheita	Lavar com água	Lavar com água	Lavar com água	Lavar com água	Lavar com água	Lavar com água
Uso de agrotóxicos	Sim, durante 10 anos	Sim	Sim, há mais de 30 anos	Sim, durante 8 anos	Sim, 30 anos	Sim, durante 30 anos

parcial quanto totalmente. As amostras que positivaram foram 01, 03, 06, 07, 08, 12 e 13. Enquanto as negativas foram a 02, 05 e 14. Logo, todas as amostras negativas foram descartadas por não serem cepas de *Staphylococcus aureus*.

A coloração foi feita com as amostras 02, 05, 07, 08. As amostras 07 e 08 tiveram crescimento de 2 colônias diferentes e por isso foi realizada uma placa de coloração para cada colônia. Todas as colônias apresentaram

coloração roxa, caracterizando bactérias gram-positivas. As amostras 02 e 05 apresentaram morfologia de bacilos. As amostras 07 e 08, na lâmina da colônia denominada “A”, apresentaram morfologia *Staphylococcus*, enquanto as colônias “B” apresentaram morfologia de bacilos.

Diante dos resultados obtidos no antibiograma, com o auxílio de uma plataforma específica (PRISMA). O Gráfico 1 mostra a média dos halos de cada antibiótico testado e comparação desses halos dos antibióticos novos

e velhos.

Na análise estatística, foi observado que as médias dos halos de inibição de crescimento bacteriano foram estatisticamente iguais em algumas comparações, e diferentes em outras, evidenciados pelos asteriscos (quanto maior o número de asteriscos, maior é a diferença). Ainda nessa análise, foi avaliado o Valor P de cada antibiótico, relacionando os velhos com os novos. Quando o Valor P está abaixo de 0,05, significa os dados são estatisticamente diferentes e quando está acima, demonstra que não há diferença estatística significativa. A tabela 4, mostra os Valores P de cada antibiótico testado.

DISCUSSÃO

Produtores inorgânicos fazem uso de agrotóxicos há muitos anos, já que a maioria possui propriedade familiar. Enquanto produtores orgânicos decidiram optar pela mudança, devido a problemas de saúde em grande

parte dos casos.

Os produtores orgânicos não apresentam nenhuma resistência para participar da pesquisa e suas propriedades já são devidamente certificadas, mesmo já tendo utilizado agrotóxicos durante algum tempo na mesma terra de cultivo. A variedade de produtos oferecidos por estes produtores orgânicos é extensa e não se limitam a uma grande área com o mesmo alimento. Os produtores inorgânicos são mais resistentes, não aceitaram participar da pesquisa com tanto afincio, mesmo esclarecendo que o projeto não possui nenhum tipo de vínculo com instituições de vigilância relacionada a fiscalização da propriedade ou quanto a utilização dos produtos.

A maioria dos produtores inorgânicos entrevistado é residente de Santa Teresa, sendo que suas propriedades são tomadas de produtos específicos, produzidos em grande quantidade como a banana. A escolaridade dos produtores influência na leitura dos rótulos dos produtos, pois muitos não sabem ler e utilizam da forma que aprenderam ou do modo que acreditam ser correto.

Outro ponto importante que foi abordado no questionário é sobre os equipamentos de proteção. Nenhum produtor inorgânico utiliza o equipamento completo, o que deixa-o totalmente exposto ao produto, sendo possível haver absorção por diversas vias. Aqueles que utilizam máscaras ou botas, ainda assim estão muito expostos, pois a bomba de aplicação, utilizada por todos, fica em contato direto com o corpo do aplicador. Uma das marcas que mais provoca danos à saúde do produtor é a Roundup e é a principal e mais utilizada por eles.

Os produtores inorgânicos relataram que a principal questão para a decisão de deixar de usar os agrotóxicos, foi porque os aplicadores ou membros da família tiveram algum tipo de reação ao produto, seja alérgica ou outro tipo de malefício. Vale ressaltar que os aplicadores dos insumos agrícolas participantes da

Figura 1. Relação entre as médias dos halos dos antibióticos novos e velhos.

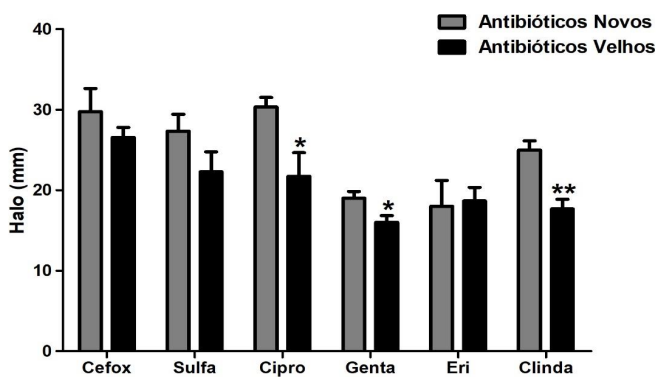


Tabela 4. Valores P dos antibióticos testados.

Antibióticos	Valor P
Ciprofloxacino	0,0271
Gentamicina	0,0327
Clindamicina	0,0012
Eritomicina	0,8583
Sulfa-Trimetropim	0,1571
Cefaloxitina	0,3533

pesquisa são em sua totalidade homens e as mulheres não costumam fazer este tipo de tarefa.

Interessante ressaltar também que um dos voluntários inorgânico não consome os produtos que ele produz. Isso pode se dar pelo fato de que ele reconhece os riscos que os agrotóxicos podem trazer a saúde e prefere não consumir, mas mesmo assim não deixa de utilizar em sua produção. As amostras dos voluntários ficaram armazenadas no caldo BHI, em geladeira, por cerca de 20 dias até a inoculação do Manitol. Ao avaliar o crescimento das colônias, observou-se que algumas apresentaram o aspecto diferente do esperado, com características que não se assemelhavam a colônias de *Staphylococcus*. Com essas colônias foram feitas as lâminas para coloração de Gram e todas resultaram em bacilos gram-positivos. O tempo de armazenamento das amostras em caldo BHI pode ter provocado alterações nas bactérias presentes e favorecido a contaminação externa.

O antibiograma com os discos novos foi realizado em placas de Petri grande, onde foram depositados os 6 discos. Já o teste com os discos fora do prazo de validade foi realizado em placas de Petri pequenas, sendo que cada amostra foi inoculada em duas placas, 1 e 2 e cada placa recebeu 3 discos de antimicrobiano. Essa diferença no tamanho das placas pode ter influenciado nos halos de inibição, por ter impedido o crescimento completo por falta de espaço. Esta característica pode também explicar a diferença apresentada nos halos de muitos antibióticos vencidos em comparação aos novos.

Alguns discos do teste de difusão não se fixaram corretamente ao ágar e se desprenderam, não tendo crescimento do halo de inibição. Outros discos se mantiveram fixos, porém saíram do seu lugar original e isso impediu que o halo crescesse corretamente. Essas intercorrências podem ser explicadas pela contaminação do caldo BHI, pela umidade das placas ou por contaminação durante o procedimento, pois algumas

placas não foram feitas a uma distância próxima da chama do bico de Bunsen. Estes resultados foram apresentados nas tabelas de resultados através dos espaços preenchidos com traços, pois não haviam halos para serem medidos. As amostras número 07 e 12 apresentaram resistência aos antibióticos Cefoxitina e Eritromicina, respectivamente. Porém, devido à contaminação, essa resistência não pode ser comprovada de fato. Assim como a amostra 06 apresentou resistência a Trimetropim e Clindamicina e a 12 a Ciprofloxacino, ambos vencidos.

Apesar de que no aspecto visual observamos a diferença ao comparar o tamanho do halos entre dois grupos (novos e velhos), quando buscamos evidenciar através da matemática, vemos que essa observação não é um parâmetro confiável. Diante disso, ao compararmos diferentes antibióticos com distintas datas de validade, podemos notar que visualmente Cefoxitina, Sulfa-Trimetropim, Ciprofloxacino, Gentamicina e Clindamicina apresentam diferenças estatísticas, ou seja, possuem níveis de atuação diferentes, sendo os novos mais atuantes que os velhos. Quando consideramos os aspectos estatísticos, três antibióticos (Ciprofloxacino, Gentamicina, e Clindamicina) evidenciam diferenças de atuação quando comparado novos e velhos, representados pelos asteriscos. Os demais, apesar de visualmente os novos serem superiores aos velhos, a estatística não evidenciou isto, mas não significa que os dados são irreais. Alguns aspectos podem ter contribuído para isso, como baixo número amostral, fatores referentes a realização dos experimentos e etc. Para esses valores que não foram confirmados pela matemática, poderia futuramente, elevar o número amostral e ter essa confirmação.

Sobre o antibiótico Eritromicina, o disco velho se sobressaiu ao novo e podemos inferir que possa ter ocorrido algum erro no procedimento ou na análise. Esse dado também teria sido de maior confiabilidade se houvesse maior volume amostral. Com o Valor

P de cada antibiótico, foi possível concluir que os antibióticos Ciprofloxacino, Gentamicina e Clindamicina, apresentaram dados estatisticamente diferentes, isso se explica pelo fato de terem evidenciado diferenças de atuação quando comparado novos e velhos. Eritromicina, Sulfa-Trimetropim e Cefaloxitina, apresentaram um resultado que não há diferença estatística significativa, portanto, não demonstraram uma grande diferença de atuação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os danos da utilização de agrotóxicos nas lavouras seja de conhecimento dos agricultores, todos os que cultivam de forma inorgânica não fazem a utilização correta dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI), tornando-se expostos a grande parte do material disseminado e podendo contribuir para essa teoria da resistência bacteriana relacionada ao uso destes insumos. Houveram diferenças relativamente consideráveis em alguns medicamentos relação a qual pode ganhar mais representatividade aumentando o numero de amostra.

Não obstante, a partir das informações coletadas nos questionários, foi possível concluir que há uma grande diferença entre os produtores inorgânicos e orgânicos, tanto na quantidade de produtos cultivados, quanto na postura em relação à entrevista. Isto posto, é necessário que utilizem o EPI apesar do incômodo e que tenham conhecimento do que estes insumos podem causar para a saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAIBANTE, Mara E.F; ZAPPE, Janessa A. A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**. Vol. 34, Nº 1, p. 10-15, Fevereiro, 2012.

BARBOZA, H. T. G. et al., Compostos Organofosforados e seu Papel

na Agricultura. **Revista Virtual Química**. p. 172-193. 2018.

LAZZARI, F. M., SOUZA, A. S. **Revolução Verde: impactos sobre os conhecimentos tradicionais**. Congresso Internacional de Direito e Contemporaneidade: mídias e direitos da sociedade em rede. Universidade Federal de Santa Maria, 2017.

PEREIRA et al. A Relação Entre o Uso de Agrotóxicos e o Aumento do Índice de Câncer no Brasil. **Revista Gestão em Foco**. Edição nº 9. p. 164-170. 2017.

PERES, F. et al., **Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Editora FIOCRUZ. p. 21-41. Rio de Janeiro, 2003.

YAMASHITA, M. G. N., SANTOS, J. E. G. **Rótulos e bulas de agrotóxicos: parâmetros de legibilidade tipográfica**. Cultura Acadêmica. Editora UNESP. p. 279. São Paulo, 2009.