



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS
DOS CORPOS DE ÁGUA TEMPORÁRIOS DE UM PERÍMETRO
IRRIGADO DO SEMIÁRIDO SERGIPANO, POR MEIO DO TESTE
SMART EM *Drosophila melanogaster* (MEIGEN, 1830) E DO TESTE DO
MICRONÚCLEO EM ANFÍBIOS DE *Hypsiboas creptans* (WIED-
NEUWIED, 1824)**

Poliana Santos

Mestrado Acadêmico

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

2014

POLIANA SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS
DOS CORPOS DE ÁGUA TEMPORÁRIOS DE UM PERÍMETRO
IRRIGADO DO SEMIÁRIDO SERGIPANO, POR MEIO DO TESTE
SMART EM *Drosophila melanogaster* (MEIGEN, 1830) E DO TESTE DO
MICRONÚCLEO EM ANFÍBIOS DE *Hypsiboas creptans* (WIED-
NEUWIED, 1824)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ecologia e Conservação da
Universidade Federal de Sergipe, como
requisito parcial para obtenção do título de
mestre em Ecologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silmara de Moraes
Pantaleão

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE - BRASIL

2014

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

- S237a Santos, Poliana
- Avaliação dos efeitos genotóxicos dos corpos de água temporários de um perímetro irrigado do semiárido sergipano, por meio do Teste SMART em *Drosophila melanogaster* (meigen, 1830) e do teste do micronúcleo em anfíbios de *Hypsiboas creptans* (Wiedneuwied, 1824) / Poliana Santos ; orientadora Silmara de Moraes Pantaleão. – São Cristóvão, 2014.
83 f. : il.
- Dissertação (mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.
1. *Amphibia*. 2. Agrotóxicos. 3. Perímetro Irrigado Califórnia. 4. Mutações. 5. Semiárido - Sergipe (SE). I. Pantaleão, Silmara de Moraes, orient. II. Título

CDU: 597.8(813.7)

TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DOS CORPOS DE ÁGUA TEMPORÁRIOS DE UM PERÍMETRO IRRIGADO DO SEMIÁRIDO SERGIPANO, POR MEIO DO TESTE SMART EM *Drosophila melanogaster* E DO TESTE DO MICRONÚCLEO EM ANFÍBIOS DE *Hypsiboas creptans*

por

POLIANA SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Sergipe, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

APROVADA pela banca examinadora composta por



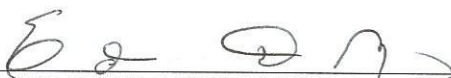
DRª SILMARA DE MORAES PANTALEÃO

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da
Universidade Federal de Sergipe



DR. MÁRIO ANTÔNIO SPANÓ

Universidade Federal de Uberlândia



DR. EDILSON DIVINO DE ARAÚJO

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da
Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão/SE, 28 de julho de 2014

Dedico:

A Deus, que por inúmeras vezes me guiou e me deu forças para continuar. Aos meus irmãos, Aretusa e Lucas, por todo amor e companheirismo. À minha sobrinha Alice, minha princesinha que vai nascer.

Agradecimentos

Saber agradecer é uma atitude de carinho e gratidão por todos aqueles que me ajudaram a concluir a Dissertação.

Sobretudo agradeço a Deus pela sabedoria, por me dar segurança para continuar, por guiar meus passos e sempre renovar minhas forças;

Aos meus familiares de Juiz de Fora, à minha mãe Efigênia (*In memoriam*) e à minha avó Maria de Lourdes Santos (*In memoriam*), por todo amor incondicional. Aos meus irmãos Aretusa e Lucas por todo amor e apoio nas horas mais difíceis. Aos familiares que eu pude escolher, Elza, Vanessa, Leliane e Lidiane por todo o carinho, boa vontade e orações;

Aos meus familiares de Aracaju: Lilian, Felipe, Elliny, em especial a Dona Ângela por todo carinho e apoio nas horas difíceis;

Às amigas da graduação, Selda, Soninha e Cris, por todo incentivo;

Aos amigos do Mestrado, em especial Dani, Laize, Cleverton, Brisa e Rafael pela amizade, pelos momentos de descontração e por me apoiarem nos momentos mais difíceis;

Às “meninas do Gecon”, Thalyta e Adelle, por toda ajuda, companheirismo, amizade, dedicação e momentos de descontração. Sem vocês eu não conseguiria concluir o Mestrado;

Aos amigos do Biomol: Thomaz, Rosane e Giulia pela amizade e ajuda nas horas difíceis;

À Minha orientadora Profa. Dra. Silmara de Moraes Pantaleão pela orientação, paciência e companheirismo nos momentos mais difíceis;

À Profa. Dra. Angélica Bezerra, esse “doce de pessoa”, por toda a ajuda e incentivo sem os quais eu não conseguiria concluir este trabalho;

Ao Prof. Dr. Mario Spanó, por enviar as moscas quando eu precisei;

Ao Prof. Dr. Edilson Divino, por me ajudar com as análises estatísticas;

À Profa. Dra. Andrea Novelli, por se preocupar e me ajudar sempre que precisei;

Ao Prof. Dr. Ricardo Scher, por toda a colaboração;

Ao Prof. Dr. Renato Gomes Faria, pela ajuda com a FAPITEC;

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Ecologia pelos conhecimentos transmitidos;

Aos MSC Marais Bezerra, Izabel Regina, Breno Moura, Adilson Silva, Daniel Santana, Anthony Ferreira e Douglas Dias por todos os auxílios;

À Juliana Cordeiro, que foi um anjo pra mim do início ao fim do Mestrado, em qualquer situação sempre solícita e muito competente;

Às técnicas Débora e Denise, por toda ajuda e boa vontade em ajudar;

Aos estagiários do laboratório de cordados, Maiane e Dário, pela colaboração;

Às amigas Deise, Gisléia, Neusa e Isabela, pelos momentos de incentivo e apoio;

Às secretárias da Biologia, Vivi e Evani, pela disposição em ajudar;

Aos motoristas da UFS, Paulo e João pela colaboração em campo;

Ao amigo e mateiro, James Cardoso, pela ajuda durante as coletas.

“Eu não fracassei 700 vezes. Não fracassei nenhuma vez. Provei com sucesso que essas 700 maneiras não funcionam. Quando tiver eliminado as maneiras que não funcionam, encontrarei aquela que funciona”

Thomas Edison.

"Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz."

Clarice Lispector.

RESUMO

Na tentativa de resolver o problema das secas, que causam a perda da produtividade agrícola na zona semiárida brasileira, gerando fome, desemprego e êxodo rural, o Governo Federal tem implantado diversos perímetros irrigados públicos. No Estado de Sergipe, destaca-se o Perímetro Irrigado Califórnia, que foi planejado para ser o modelo de exploração racional de solo e água no semiárido nordestino. As principais culturas exploradas neste Perímetro, são acerola, banana, goiaba, manga, graviola, abóbora, aipim, amendoim, feijão de corda, milho, quiabo e tomate, com uma média de produção anual de 12.682, 34 toneladas. Visando atender essa demanda agrícola, agrotóxicos e fertilizantes são usados em excesso e sem qualquer acompanhamento técnico. Este Perímetro localiza-se no município de Canindé de São Francisco, no entorno da unidade de Conservação Monumento Natural Grota do Angico. O uso excessivo de agrotóxicos nesta região pode contaminar o meio ambiente, causar sérios danos à saúde humana, colocar em risco de extinção as espécies selvagens do local e aquelas que habitam a unidade de conservação, podendo causar a perda da biodiversidade e, como último destino, podem alcançar os corpos de água próximos às plantações. Baseando-se nestes dados, o objetivo geral do presente estudo foi investigar a presença de agrotóxicos com efeitos mutagênicos em corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia por meio de 2 testes: Teste SMART de asa em *D. melanogaster*, onde larvas foram tratadas com amostras de água de 6 diferentes pontos e o Teste do Micronúcleo, aplicado em eritrócitos de girinos da espécie *Hypsiboas creptans*, coletados em 3 corpos de água, entre 2013 e 2014. O Teste do micronúcleo mostrou frequência significativamente maior de micronúcleos nos girinos coletados em um dos corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia (CD2) que da área de referência (Monumento Natural Grota do Angico). No Teste SMART observou-se aumento na frequência de manchas mutantes em células da asa de *D. melanogaster* somente para um dos corpos de água (CD5). Os dados aqui apresentados são pioneiros na avaliação de efeito mutagênico de agrotóxicos em áreas de irrigação do semiárido sergipano e nos permitem concluir que há genotoxinas de diferentes fontes presentes no ambiente do Perímetro Irrigado Califórnia, com impacto sobre a água e a biota residente, trazendo enorme risco para os agricultores e suas famílias que convivem nesse ambiente.

Palavras chave: agrotóxicos, Perímetro Irrigado Califórnia, mutações.

ABSTRACT

In an attempt to solve the drought problem which causes the loss of agricultural productivity in the Brazilian semiarid zone, leading to starvation, unemployment and rural exodus, the Federal Government has deployed several public irrigated perimeters. In the State of Sergipe, we highlight the Irrigated California Area, which was intended to be the model of rational exploitation of soil and water in the northeast semi-arid. The main crops grown in this perimeter are acerola, banana, guava, mango, soursop, pumpkin, cassava, peanut, cowpea, maize, okra and tomato, with an average annual production of 12,682, 34 tons. Aiming to fulfill this agricultural demand, the use of pesticides and fertilizers is given in excess and without any technical support. This Perimeter is located in the surroundings of the Monumento Natural Grota do Angico a conservation unit. The excessive use of pesticides in this region can contaminate the environment, cause serious harm to human health, putting endangered the local wild species and those that inhabit the conservation area, can cause the loss of biodiversity and as a last destination can reach the water bodies near the plantations. Based on these data, we aimed in the present study to investigate the presence of pesticides with mutagenic effects in temporary water bodies in the Irrigated California Area by 2 tests: the SMART in the wings of *D. melanogaster*, in which the larvae were treated with water samples from 6 different points and the Micronucleus test, applied in erythrocytes of *Hypsiboas creptans* tadpoles collected in 3 water bodies between 2013 and 2014. The micronucleus test showed significantly higher frequency of micronuclei in tadpoles collected in one of the temporary water bodies in the Irrigated California Area (CD2) than the ones in the reference area (MNGA). In SMART Test we observed an increase in the frequency of mutant spot cells in the wings of *D. melanogaster* only in one of the water bodies (CD5), the one with no pesticides detected. The data presented here are pioneers in the evaluation of pesticides mutagenic effect in the semiarid irrigation areas of Sergipe and allow us to conclude that there are different sources of genotoxins presented in the Irrigated California Area, impacting the water and the resident biota, bringing huge risk for farmers and their families who live in that environment.

Key-words: pesticides, Perímetro Irrigado Califórnia, mutations.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Pulverização de agrotóxico no Perímetro Irrigado Califórnia.....	17
Figura 2. Formação de micronúcleos.....	26
Figura 3. Células com micronúcleos.....	26
Figura 4. Macho e fêmea de <i>D. melanogaster</i>	27
Figura 5. Manifestação fenotípica da mancha simples grande observada na asa de <i>D. melanogaster</i>	28
Figura 6. Manifestação fenotípica da mancha gêmea observada na asa de <i>D. melanogaster</i>	28
Figura 7. Anfíbio da espécie <i>Hypsiboas creptans</i>	30

CAPÍTULO I

Figura 1. Corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia. Fonte: Arquivo pessoal.....	41
Figura 2. Anfíbio adulto da espécie <i>H. creptans</i>	43
Figura 3. Localização do Perímetro Irrigado Califórnia em Sergipe.....	44
Figura 4. Localização da Unidade de Conservação Monumento Natural Grota do Angico...	45
Figura 5. Pontos de Coleta do Perímetro Irrigado Califórnia e da Unidade de Conservação Estadual Monumento Natural Grota do Angico.....	45
Figura 6. Girino de <i>Hypsiboas creptans</i>	46

CAPÍTULO II

Figura 1. Localização do Perímetro Irrigado Califórnia em Canindé de São Francisco, Sergipe. Fonte: AMORIM et al., 2010.....	63
Figura 2. Pontos de coleta de água no Perímetro Irrigado Califórnia.....	64
Figura 3. Frascos de vidro contendo meio de cultura para <i>D. Melanogaster</i>	65

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos de acordo com a Dose Média Letal (DL50)	19
---	----

CAPÍTULO I

Tabela 1. Análise de Variância do percentual de micronúcleos (MN) calculado em eritrócitos de girinos de <i>Hypsiboas creptans</i> do Perímetro Irrigado Califórnia e do MNGA.....	48
Tabela 2. Caracterização físico - química das amostras de água dos corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia e do MNGA.....	49
Tabela 3. Frequência de Eritrócitos micronucleados em girinos de <i>H. creptans</i>	49

CAPÍTULO II

Tabela 1. Frequência de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de <i>Drosophila melanogaster</i> , obtidas na progênie do cruzamento padrão (ST), depois do tratamento crônico das Larvas com amostras de água coletadas em 3 corpos de água temporários (CD1, CD2, CD5) do Perímetro Irrigado Califórnia, nos meses de Agosto (2013) e Abril de 2014.....	75
Tabela 2. Frequência de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de <i>Drosophila melanogaster</i> , obtidas na progênie do cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), depois do tratamento crônico das Larvas com amostras de água coletadas em 4 corpos de água temporários (CD1, CD2, CD5 e CD6) do Perímetro Irrigado Califórnia, nos meses de Agosto (2013) e Abril de 2014.....	76
Tabela 3. Caracterização físico – química das amostras de água de 6 corpos de água temporários (CD1, CD2, CD3, CD4, CD5 E CD6), do Perímetro Irrigado Califórnia – SE.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA	Agência Nacional das águas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BH	Heterozigoto Balanceado
COHIDRO	Companhia de Desenvolvimento de Recursos Hídricos e Irrigação de Sergipe
CD	Corpos de água temporários
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
EPA	United States Environmental Protection Agency
Ha	hectares
HB	Cruzamento de Alta Bioativação
IBAMA	Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
IICA	Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura
ITP	Instituto de Tecnologia de Pesquisa
ITEP	Instituto de Tecnologia de Pernambuco
l/s	Litros por segundo
mg/kg	Miligrama por quilograma
MH	Heterozigoto marcado
MN	micronúcleo
MNGA	Unidade de Conservação Estadual Monumento Natural Grota do Angico
PIC	Perímetro Irrigado Califórnia
PPA	Potencial de Periculosidade Ambiental
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SMART	Somatic Mutation and Recombination
ST	Cruzamento Padrão
TMN	Teste do Micronúcleo
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	9
<u>ABSTRACT</u>	10
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	11
<u>LISTA DE TABELAS</u>	12
<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	13
<u>1 REFERENCIAL TEÓRICO</u>	15
<u>1.1 Agricultura Irrigada</u>	15
<u>1.2 Agrotóxicos</u>	18
<u>1.3 Biomonitoramento, Biomarcadores e Bioindicadores</u>	23
<u>1.3.1 Teste do Micronúcleo (TMN)</u>	25
<u>1.3.2 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática</u>	27
<u>1.4 Anfíbios</u>	29
<u>2. OBJETIVOS</u>	31
<u>2.1 Objetivo geral</u>	31
<u>2.2 Objetivos específicos</u>	31
<u>REFERÊNCIAS</u>	32
<u>Capítulo I</u>	39
<u>Capítulo II</u>	58
<u>DISCUSSÃO GERAL</u>	78
<u>REFERÊNCIAS</u>	81

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Agricultura Irrigada

A agricultura irrigada é um instrumento efetivo de auxílio na produção de alimentos para atender a demanda crescente da população mundial, uma vez que esta tem grande potencial produtivo, valor econômico e muita capacidade de expansão, o que propicia a obtenção de produtos de melhor qualidade e em grande quantidade. Além da irrigação permitir que a água seja aplicada em períodos controlados, ela também favorece o plantio, que pode ser planejado para a época mais adequada para a condução de determinada cultura (ANA, 2004). Em regiões desérticas, áridas e semiáridas, onde a precipitação anual muitas vezes é inferior a 250 mm, a irrigação é obrigatória para o cultivo de qualquer produto agrícola (TESTEZLAF, 2011). No mundo, aproximadamente 18% das áreas agrícolas são irrigadas, sendo responsável por 44% da produção mundial de alimentos (PIRES *et al.*, 2008).

No Brasil, o primeiro projeto de irrigação surgiu em 1881 no Rio Grande do Sul; entretanto, o uso da irrigação no país tornou-se frequente somente nos últimos 30 anos, a princípio no Sul do país com a cultura do arroz irrigado por inundação e, posteriormente em São Paulo, com a cultura do café irrigado por aspersão e, por último, na Região Nordeste, onde a técnica de irrigação é aplicada em diversas culturas. Atualmente vários projetos públicos foram iniciados em vários Estados do semiárido brasileiro, beneficiando a Região Nordeste com alguns avanços tecnológicos propiciados por modelos hidrológicos (IICA, 2008).

Na tentativa de resolver o problema das secas, que causam a perda da produtividade agrícola na zona semiárida brasileira, gerando fome, desemprego e êxodo rural, o Governo Federal tem implantado diversos perímetros irrigados públicos (CORREIA *et al.*, 2014). Nas últimas décadas foram investidos mais de dois milhões de dólares em obras ligadas diretamente a irrigação. A partir dessa etapa o investimento privado foi estimulado e mais 400.000 ha adicionais de áreas irrigadas foram desenvolvidas resultando no aumento da produtividade agrícola, que atingiu o lucro de 2 bilhões de dólares em 2002, incluindo 170 milhões de dólares com a exportação de frutas frescas, gerando 1,3 milhões de empregos e contribuindo para a redução da pobreza e da migração rural para as capitais (BANCO MUNDIAL, 2004).

No Estado de Sergipe, os perímetros irrigados começaram a ser implantados na década de 1980, com destaque para o Perímetro Irrigado Califórnia (PIC), localizado entre os

municípios de Canindé de São Francisco e Poço Redondo. Esse Perímetro foi criado pelo governo do estado para ser modelo de exploração racional dos recursos de solo e água no semiárido nordestino, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos habitantes através do aproveitamento do potencial agrícola proporcionado pelo clima e solo, juntamente com a água que passou a ser disponibilizada para a irrigação, gerando assim empregos permanentes em uma região muito afetada pela seca (GOMES *et al.*, 2009).

De acordo com a COHIDRO (2014), o PIC é constituído por duas antigas fazendas, Cuiabá e Califórnia, que foram desapropriadas pelo governo do Estado de Sergipe em 1984. A construção do Perímetro foi iniciada em Julho de 1985, e concluída em Março de 1987. O mesmo possui uma área total de 3.980 ha, mantendo o método de agricultura irrigada e também a de sequeiro, que possibilita a resistência à seca. Essa área total foi dividida em 333 lotes sendo 243 irrigantes e 61 de sequeiro, beneficiando 252 pequenos produtores, técnicos e empresários. Nos lotes irrigáveis é utilizada a tecnologia de irrigação por aspersão. O sistema de irrigação é alimentado com água captada diretamente do Rio São Francisco, através da estação de bombeamento denominada EB-01, que eleva as vazões de irrigação a uma altura de 170 metros, com capacidade de 1540 l/s.

Apesar de todos os benefícios, a expansão da agricultura irrigada tem provocado muitos impactos ao meio ambiente, principalmente aos ecossistemas aquáticos, devido a intensa utilização dos recursos naturais. No Brasil, o excesso de água aplicada a área irrigada, quando não é evapotranspirada pelas culturas, retorna aos rios e córregos por meio do escoamento superficial ou vai para os depósitos subterrâneos, através da percolação profunda, podendo arrastar consigo o substrato, resíduos de agrotóxicos, fertilizantes, além de outras substâncias tóxicas (ROCHA, 2011). Aliado a isso tem o problema do desmatamento, da erosão, do assoreamento de rios e o uso indiscriminado de fertilizantes e agrotóxicos que tem causado sérios danos à saúde humana e ambiental (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2008).

Quando usados de forma correta e criteriosa, os agrotóxicos podem ser de grande utilidade para a agricultura. Entretanto, quando empregados indevidamente, podem acarretar diversos problemas. Durante a aplicação nas plantações, o excesso dos agrotóxicos gera resíduos que podem atingir diretamente os corpos de água, através da água proveniente da irrigação e da chuva, ou indiretamente através da percolação no solo, podendo contaminar rios e lençóis freáticos (ARIAS *et al.*, 2007).

O mau uso de agrotóxicos faz parte do cenário mundial, o que acontece como consequência da falta de fiscalização, orientação e monitoramento quanto ao uso de

agroquímicos (PINHEIRO, 2004). No PIC não é diferente, o mau uso de agrotóxicos é uma problemática. Culturas como as do tomate e quiabo recebem aplicações excessivas destes produtos químicos sem que os trabalhadores se protejam conscientemente durante a aplicação, colocando a saúde em risco (GOMES *et al.*, 2009). O uso intensivo de agrotóxicos no local, pela maioria dos agricultores, é reflexo da falta de incentivo à adoção de outras formas alternativas de combate as pragas, como por exemplo o controle biológico. Por falta de opção, eles se veem obrigados a usar estes produtos químicos em suas plantações, pois ao contrário, terão dificuldades em produzir e vender a sua colheita (PINHEIRO, 2004).



Figura 1. Pulverização de agrotóxico no Perímetro Irrigado Califórnia. Fonte: Poliana Santos

Deixar de utilizar os agroquímicos nas plantações pode não ser uma ação realista a curto prazo, pois as alternativas oferecidas carecem de uma maior organização, apoio técnico e viabilidade comercial. Até que tais objetivos sejam alcançados, os agricultores devem receber orientações sobre o uso racional e adequado destes produtos. Políticas que minimizem o impacto dos agrotóxicos na saúde humana e ambiental devem ser adotadas pois a precariedade do trabalho rural, a sua estrutura agrária e a falta de regulamentação são as maiores dificuldades para as medidas de proteção dos trabalhadores (ARAÚJO *et al.*, 2000).

1.2 Agrotóxicos

De acordo com a Lei nº 7.802 de 11 de Julho de 1989, “agrotóxicos e afins são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias empregadas como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.”

Os agrotóxicos podem ser classificados de diversas maneiras. De acordo com Larini (1999), quanto ao modo de ação do ingrediente ativo no organismo alvo ou quanto a natureza da praga combatida, são classificados em:

- Inseticidas: possuem ação de combate a insetos, larvas e formigas. Pertencem a quatro grupos principais: Organofosforados, Carbamatos, Organoclorados, Piretróides.
- Fungicidas: combatem os fungos. Os principais grupos químicos são: Captan, Etileno-bis-ditiocarbamatos, Trifenil estânico e Hexaclorobenzeno.
- Herbicidas: Combatem ervas daninhas. Os mais usados são: Paraquat, Glifosato, derivados do ácido fenoxiacético, Pentaclorofenol, Dinitrofenóis.
- Outros grupos importantes: rodenticidas ou raticidas: utilizados no combate a roedores. Acaricidas: combatem diversas espécies de ácaros. Nematicidas: combatem os nematoides. Fumigantes: combatem insetos e também bactérias e Moluscicidas: tem ação de combate a moluscos.

A classificação toxicológica dos agrotóxicos é expressa de acordo com o resultado dos testes e estudos feitos em laboratório, em termos do valor da Dose Letal (DL_{50}), que corresponde à dose necessária da substância para matar 50% da população testada nas condições experimentais (EMBRAPA, 2003). Dependendo da concentração de determinados produtos químicos no corpo do indivíduo e partindo do princípio de sua capacidade em causar morte ou outros efeitos sobre os organismos vivos, a Dose Letal normalmente é expressa em mg/kg (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). A concentração letal de uma substância química na atmosfera, capaz de matar 50% da população testada após exposição mínima, de 1 hora, é denominada de concentração letal inalatória. Para os produtos da Classe I, uma pequena quantidade pode ser o suficiente para causar a morte (MARINHO, 2010).

Quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA), as classificações dos agrotóxicos são estabelecidas pelo Ministério do Meio Ambiente que tem a função de realizar a Avaliação Ambiental dos agrotóxicos, de seus componentes e afins (Artigo 7º do Decreto nº 4.074/2002). A competência do registro, a análise e controle dessas substâncias químicas foram delegadas ao IBAMA, conforme especifica o Decreto nº 6.099/07, em seu artigo 1º, inciso IX.

O sistema de classificação quanto ao PPA compreende determinados parâmetros como o transporte, persistência, bioconcentração e ecotoxicidade dos agrotóxicos a diversos organismos. A classificação varia de I a IV (IBAMA, 2014):

Classe I – Produto ALTAMENTE PERIGOSO ao meio ambiente;

Classe II – Produto MUITO PERIGOSO ao meio ambiente;

Classe III – Produto PERIGOSO ao meio ambiente;

Classe IV – Produto POUCO PERIGOSO ao meio ambiente.

A toxicidade de um agrotóxico pode variar de acordo com o modo de administração, e os rótulos dos mesmos são identificados por meio de faixas coloridas, como na tabela abaixo.

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos de acordo com a DL 50.

Classe Toxicológica	Descrição	Faixa Indicativa de Cor
I	Extremamente tóxicos ($DL_{50} < 50$ mg/kg de peso vivo)	Vermelho vivo
II	Muito tóxicos ($DL_{50} - 50$ a 500 mg/kg de peso vivo)	Amarelo intenso
III	Moderadamente tóxicos ($DL_{50} - 500$ a 5000 mg/kg de peso vivo)	Azul Intenso
IV	Pouco tóxicos ($DL_{50} > 5000$ mg/kg de peso vivo)	Verde intenso

Fonte: Peres; Moreira, 2003.

Após a 2ª guerra mundial o aumento da produção de agrotóxicos cresceu de forma alarmante devido ao fato de que as indústrias químicas que até então fabricavam venenos usados em armas químicas, encontraram na agricultura um novo mercado consumidor para os seus produtos. Dessa forma, foi incentivado o uso intensivo dessas substâncias químicas para

o controle de pragas e doenças das lavouras. Na maioria dos países, diversas políticas foram implementadas para expandir e assegurar o mercado consumidor de agrotóxicos (LONDRES, 2011).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011), o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos. Políticas adotadas pelo governo, como o Sistema Nacional de crédito rural, que só dava crédito agrícola se o agricultor comprasse insumos químicos, juntamente com a Lei 7.802/89, sobre o registro de inúmeras substâncias tóxicas (PELAEZ et al., 2009), facilitaram a disseminação de agrotóxicos no país, onde falta um efetivo sistema de monitoramento destes produtos químicos, quer do efeito no meio ambiente, quer na saúde dos trabalhadores rurais.

Recentemente, no Brasil, houve uma crescente inovação tecnológica e diferentes tipos de sementes foram geneticamente modificadas visando a diminuição do uso de agrotóxicos na agricultura. Entretanto, o consumo destes insumos químicos continuou crescendo e, do ano de 2006 até 2012, o aumento foi de 72%, passando de 480 toneladas consumidas em 2006 para mais de 826 toneladas consumidas em 2012. Não bastando, entre os meses de janeiro e Agosto de 2013, foram apreendidas mais de 23 toneladas de defensivos agrícolas ilegais encontrados em todas as regiões do país (SINDAG, 2013). Faltam informações sobre os agrotóxicos, orientações técnicas e educação para os trabalhadores e produtores rurais com relação à saúde, agricultura, trabalho e meio ambiente (SILVA et al., 2011).

O risco da população exposta aos agrotóxicos é preocupante. Os resíduos de agrotóxicos podem alcançar os moradores do entorno das áreas agrícolas, os trabalhadores rurais, os operários das fábricas produtoras de agrotóxicos, moradores do entorno das fábricas, vendedores das lojas que comercializam estes produtos, as pessoas que pulverizam os agrotóxicos e, sobretudo, as crianças, que devido às suas características fisiológicas são particularmente vulneráveis à exposição de qualquer substância tóxica presente no ambiente pelo simples fato de que elas consomem mais água, mais alimentos e respiram maior quantidade de ar por unidade de peso corporal que os adultos (SILVA; FRUCHTENGARTEN, 2005).

A grande maioria dos agrotóxicos são persistentes no meio ambiente, entram nas cadeias ecológicas e nos ciclos biogeoquímicos, podem atravessar continentes provocando diversos efeitos tóxicos que afetam desde as bactérias até os seres humanos (GRISOLIA, 2005). A extinção e a intoxicação de espécies não alvo pelos agrotóxicos é uma das principais consequências indesejadas (YAMÉOGO et al., 2001; HAUGUI et al., 2013;

JIANG et al., 2013), inclusive por que acaba matando as espécies que são predadores naturais das pragas da agricultura (CUTLER et al., 2006).

A pulverização de agrotóxicos em regiões circunvizinhas das Unidades de Conservação Nacionais tem provocado altos índices de acidentes toxicológicos, levando animais silvestres à mortalidade. Portanto, as áreas agrícolas do entorno dessas Unidades de Conservação merecem uma atenção especial dos órgãos ambientais para estabelecer mecanismos de monitoramento ambiental, bem como o estabelecimento de leis específicas para a proteção de animais em risco de extinção. Regiões de grande biodiversidade e regiões que abrigam ecossistemas de espécies raras, como a Caatinga, ou espécies em Risco de extinção devem ter um tratamento legal diferenciado em prol do desenvolvimento de ações específicas para regulamentar o uso de agrotóxicos, que geralmente têm ação biocida de amplo espectro (GRISOLIA, 2005).

Os agrotóxicos são moléculas sintetizadas para afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, microorganismos, animais e plantas que se quer controlar ou eliminar. No entanto, determinados processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos e, assim, o efeito pode então atingir não só o organismo que se espera controlar, como também outros seres do ambiente. A introdução de agrotóxicos no ambiente agrícola exige o monitoramento do risco ambiental destes produtos, uma vez que eles podem causar perturbações, grandes impactos ambientais, exercer uma pressão de seleção nos organismos e alterar a dinâmica bioquímica natural, tendo como consequência, mudanças na função do ecossistema (SPADOTTO, 2004).

Fatores como as elevadas taxas de subnotificação de casos de contaminação, as dificuldades metodológicas relacionadas com o monitoramento da exposição ocupacional e a falta de políticas socioeconômicas na avaliação de impactos, dificultam o trabalho de avaliação dos riscos trazidos pelos agrotóxicos (PERES *et al.*, 2005).

A poluição ambiental provocada por agrotóxicos é muito difícil de ser avaliada uma vez que os eventos de contaminação obedecem a uma dinâmica difusa e variável. Nem sempre os métodos de “screening” químicos captam a contaminação, pois esses registram apenas o exato momento em que as amostras ambientais foram coletadas e não acompanham a variação temporal e espacial da contaminação (BAPTISTA *et al.*, 2003).

Um programa de monitoramento ambiental pode ser uma ferramenta importante para a caracterização e gerenciamento dos riscos decorrentes do uso demasiado de agrotóxicos nas plantações. Vários métodos vêm sendo desenvolvidos para o estudo e previsão do destino e comportamento dos agrotóxicos no ambiente. Tais métodos vão desde o uso de parâmetros

pré-estabelecidos até modelos matemáticos complexos. Leva-se em conta as propriedades físico-químicas e o comportamento ambiental como solubilidade em água, pressão de vapor, coeficientes de distribuição entre fases e compartimentos, tempo de meia-vida de degradação ou dissipação dos agrotóxicos. O uso desses parâmetros pode orientar tanto a amostragem em campo como as análises laboratoriais das amostras coletadas (SPADOTTO, 2004). Estes métodos são muito eficientes. Entretanto, são complexos e caros, o que dificulta o trabalho de muitos pesquisadores.

Já foram feitos muitos estudos sobre os efeitos dos ingredientes ativos dos herbicidas, fungicidas e inseticidas. Seus mecanismos agrônômicos estão bem determinados, como também seus principais efeitos tóxicos indesejáveis. No entanto, em se tratando de misturas de vários ingredientes ativos, seus efeitos ecotoxicológicos, de mutagenicidade e de carcinogenicidade não podem ser previstos, devido às inúmeras interações que podem ocorrer entre as substâncias. Determinados ingredientes ativos misturados podem interagir, resultando em efeitos de aditividade, sinergismo, potenciação e antagonismo imprevisíveis. Houveram casos em que os testes de mutagenicidade com produtos técnicos apresentaram resultados fracamente positivos, porém, os testes com as formulações comerciais de determinados agrotóxicos foram indutores de aberrações cromossômicas, trocas de cromátides irmãs, micronúcleos e mutações gênicas (GRISOLIA, 2005).

De todos os malefícios causados por agentes químicos poluentes, os efeitos mutagênicos merecem uma atenção especial, uma vez que os poluentes químicos podem atingir o material genético dos organismos e causar mutações. Os efeitos destas mutações nas populações naturais só serão evidentes muito tempo após a exposição dos organismos as substâncias químicas poluentes, quando o equilíbrio dos organismos nos ecossistemas for afetado (DEPLEGDE, 1998).

Para Wurgler & Kramers (1992), as mutações nas células somáticas de populações naturais pode levar ao surgimento de doenças neoplásicas ou outras doenças degenerativas, que levarão alguns indivíduos à morte, o que pode não representar um grande risco para a manutenção destas populações. Entretanto, de acordo com Deplegde (1998), a indução de mutações em células germinativas pode trazer consequências gravíssimas para os ecossistemas, uma vez que pode afetar o potencial reprodutivo dos organismos. Frequências elevadas de mutações em células germinativas podem levar a perda de gametas, malformações e morte do embrião. Com o passar do tempo as populações podem se extinguir.

1.3 Biomonitoramento, Biomarcadores e Bioindicadores

O Biomonitoramento é uma técnica que vem sendo usada na avaliação dos impactos ambientais. Esta técnica parte do princípio de que determinados organismos quando expostos a substâncias químicas contaminantes, apresentam sintomas que podem refletir essa exposição. Estes sintomas podem ser determinadas alterações biológicas que a substância química provocou no organismo, presença da própria substância química no organismo, ou ainda o produto que resultou da degradação da substância no organismo em estudo. O Biomonitoramento é uma técnica vantajosa por ser relativamente barata e viável, se comparada a outros métodos de avaliação de impactos ambientais (ZHOU *et al.*, 2008). É um método de extrema importância, uma vez que, para avaliar os impactos dos contaminantes químicos na qualidade ambiental, é necessário que sejam mensurados os efeitos que estas substâncias causam nos organismos vivos, que vivem no ambiente que será monitorado (WELLS *et al.*, 2001). Existem três condições que indicam a necessidade de um biomonitoramento: quando há indícios de espécies nativas em ameaças de extinção, quando existem riscos à saúde humana devido ao consumo de organismos potencialmente contaminados, ou quando há o interesse de avaliar a saúde de determinado ambiente (SILVA *et al.*, 2003).

Na abordagem integrada do Biomonitoramento ambiental os bioindicadores e biomarcadores podem ser usados para avaliar os ecossistemas, auxiliar no processo de remediação, respaldar os modelos de exposição e, ainda, avaliar o processo de restauração e gerenciamento ambiental (HACON, 2003).

Bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, abundância e condições são indicativos biológicos de uma determinada condição ambiental. São medidas que incluem todos os níveis de organização ecológica, desde uma única espécie até as populações de um ecossistema. De uma maneira geral, são seres vivos de natureza diversa, vegetais ou animais, utilizados na avaliação da qualidade ambiental. As espécies bioindicadoras podem ser utilizadas de uma forma passiva, quando se deseja avaliar os seres que habitam a área de estudo, ou de uma forma ativa. Neste caso, faz-se a exposição das espécies previamente indicadas como bioindicadores no ambiente que será monitorado. Tal exposição possibilitará, a partir de sua resposta, a avaliação da qualidade ambiental local (WALKER *et al.*, 2001).

Os biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e do tipo da exposição a certas substâncias. Podem ter como objetivo avaliar a

exposição (quantidade absorvida ou dose interna), avaliar os efeitos das substâncias químicas e avaliar a suscetibilidade individual. Além disso, podem ser utilizados independentemente da fonte de exposição, seja através da dieta, do meio ambiente geral ou ocupacional. A utilização dos biomarcadores também pode ter como finalidade elucidar as relações causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco à saúde; para fins de diagnóstico clínico; e para fins de monitorização biológica, realizada de maneira sistemática e periódica (WHO, 1993; WALKER *et al.*, 2001).

Existem muitas definições para os biomarcadores. Leonzio; Fossi (1993), ampliaram a definição proposta pela *National Academy of Sciences*, definindo biomarcadores ecotoxicológicos como variações bioquímicas, celulares comportamentais ou fisiológicas que possam ser medidas em fluidos corporais, em amostras de tecidos, em fluidos orgânicos, de organismos ou populações, que possam relatar exposição ou efeito de um ou mais poluentes químicos e também radiações. Para Decaprio (1997), os biomarcadores são indicadores biológicos que evidenciam o efeito resultante da exposição a um estressor, que pode ser interpretado como evento adaptativo não patogênico ou como séria alteração de evento funcional, dependente do mecanismo de ação do estressor e da toxicocinética do mesmo. Ao passo que, para Fernandes (2005), os biomarcadores traduzem uma resposta biológica, desde os níveis molecular, celular, fisiológico, e até comportamental. Esta resposta biológica pode estar relacionada com a exposição do organismo aos efeitos tóxicos de produtos químicos liberados no ambiente.

O conceito de biomarcadores não é consensual. No entanto, em se tratando dos agentes químicos, o termo biomarcador pode ser definido como toda resposta biológica correspondente a uma exposição, efeito ou suscetibilidade dos indivíduos aos agentes químicos e estressores ambientais. A análise de tecidos, fluidos corpóreos, metabólitos, enzimas, além de outros parâmetros, tem sido usada para documentar a interação da substância química com o sistema biológico. Essas medidas podem apresentar uma associação entre a dose interna do contaminante e a exposição a um ou mais contaminantes químicos e as respostas das mesmas medidas podem ser funcionais, fisiológicas, bioquímicas a nível celular ou de interação molecular (WALKER *et al.*, 2001; HACON 2003).

Determinadas alterações na integridade do DNA são uma das primeiras manifestações dos organismos após exposição a produtos químicos mutagênicos. Estudos de campo, utilizando biomarcadores para avaliação dos impactos têm sido realizados devido as vantagens que o uso destes biomarcadores podem trazer (FRENZILLI *et al.*, 2009).

De acordo com Hacon (2003), os Biomarcadores podem ser classificados em:

- Biomarcadores de Exposição ou de dose resposta: indicam a exposição de um organismo a uma ou mais substâncias químicas. Entretanto, não fornecem informações sobre o grau de efeito adverso que essa exposição pode causar. O biomarcador de exposição reflete a distribuição do agente químico ou seus produtos de biotransformação no organismo.
- Biomarcadores de efeito: demonstram efeitos adversos no organismo através dos parâmetros bioquímicos, fisiológicos, comportamental ou outras alterações que podem ser reconhecidas e associadas a doenças causadas no indivíduo.
- Biomarcadores de Suscetibilidade: são indicadores da habilidade adquirida dos organismos em responder aos desafios da exposição à determinada substância xenobiótica. Fatores como a idade, dieta, e estado de saúde podem influenciar a suscetibilidade de um indivíduo exposto a um ou mais agentes químicos. Os biomarcadores de suscetibilidade podem refletir os fatores adquiridos ou os genéticos, que podem influenciar na resposta de exposição.

1.3.1 Teste do Micronúcleo (TMN)

O TMN é um biomarcador de efeito, e devido as vantagens oferecidas por este teste como baixo custo, alta capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos) e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal), tem sido muito recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental (FENECH, 2000).

Micronúcleos são formados por fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal durante a divisão celular. A formação dos micronúcleos pode ocorrer de forma espontânea ou induzida por variações ambientais e/ou pela presença de agentes contaminantes no ambiente (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Os micronúcleos aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais (RIBEIRO, 2003).

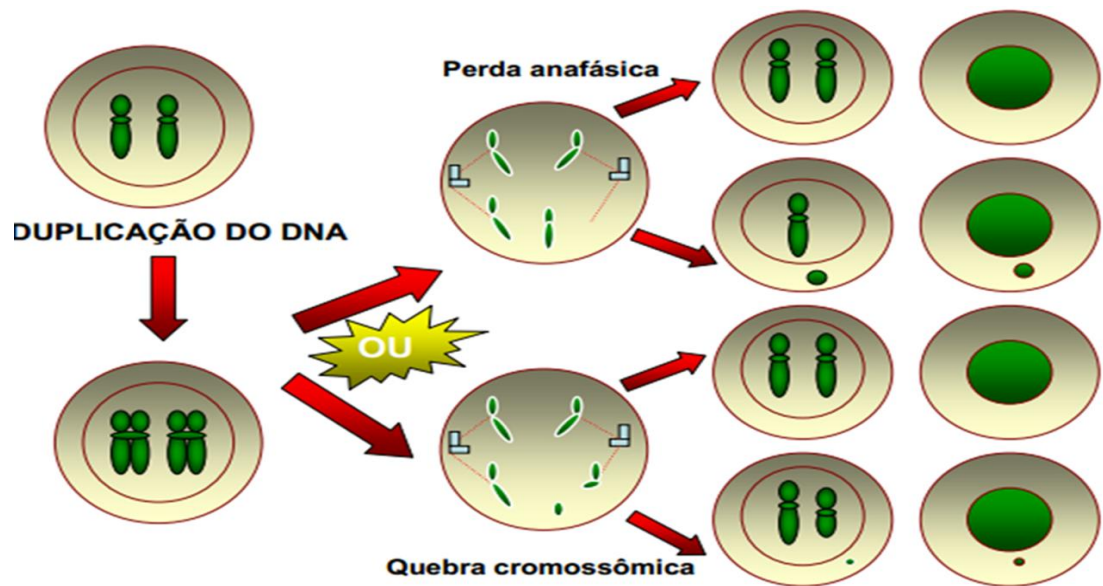


Figura 2. Formação de micronúcleos. Fonte: Osório Martins.

O TMN foi proposto pela primeira vez por Schmid (1976) em eritrócitos da medula óssea de camundongos. Posteriormente outros autores vieram adaptando o protocolo e o teste passou a ser feito em outros grupos como peixes (BUCKER *et al.*, 2012; BRINKMANN *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2014; TAKAI *et al.*, 2014), Moluscos (BOLOGNESI, 2011), humanos (COSTA *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2011; SPEIT, 2013; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2014; NERSESYAN *et al.*, 2014) Anfíbios (MOUCHET *et al.*, 2011; BOSCH, 2013; BOURDIOL *et al.*, 2013; LAJMANOVICH *et al.*, 2014; SINGHA, 2014).

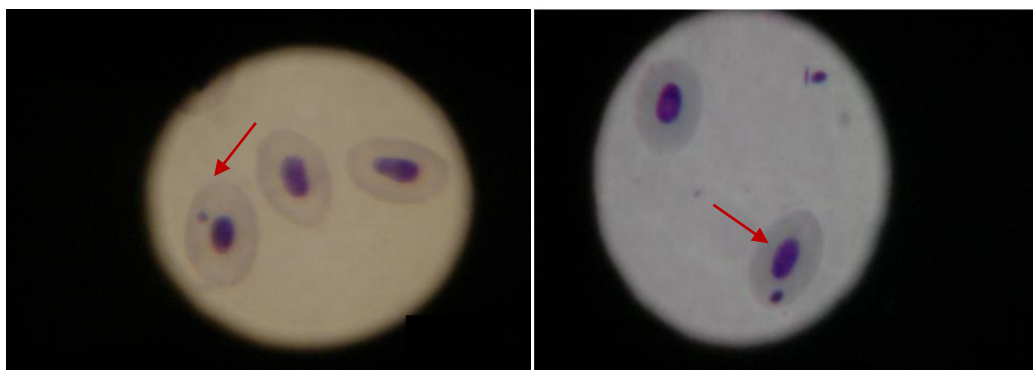


Figura 3: células com micronúcleos. Fonte: Silmara Pantaleão.

1.3.2 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática

O Teste para detecção de mutação e recombinação somática (“Somatic Mutation And Recombination Test” - SMART), que utiliza linhagens de *Drosophila melanogaster* como organismo teste, foi desenvolvido por Graf e colaboradores no ano de 1984. É um teste bem conceituado por ser relativamente barato, rápido e ainda oferecer resultados confiáveis (GRAF *et al.*, 1984).

A *D. melanogaster*, popularmente conhecida como mosca da fruta, é um organismo eucarioto muito usado na genética por apresentar vantagens como: ciclo de vida e período de geração bem curtos, o cultivo em laboratório é fácil e de baixo custo, o cruzamento é simples, a progênie é grande, os machos e as fêmeas são facilmente distinguíveis, possuem um pequeno número de cromossomos e linhagens muito bem caracterizadas geneticamente, o que confere rapidez ao teste; além disso, a *D. melanogaster* possui o sistema enzimático P450 semelhante ao dos mamíferos, o que lhe permite a metabolização de agentes xenobióticos (GRAF *et al.*, 1984).

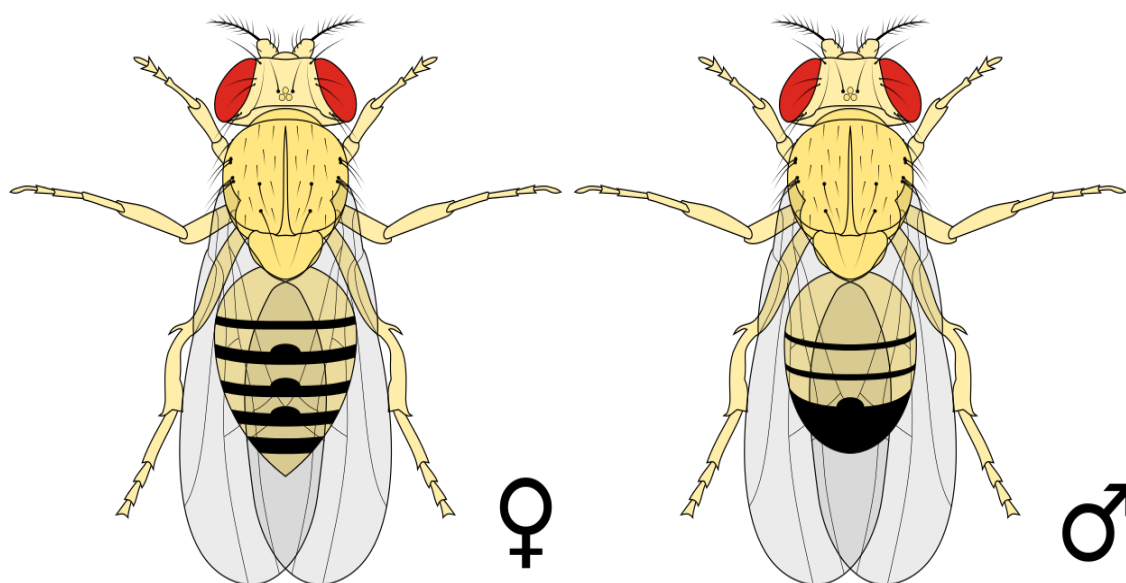


Figura 4. Fêmea (a esquerda) e macho (a direita) de *D. melanogaster*. Fonte: Wikimedia Commons.

O Teste SMART fundamenta-se na premissa de que durante o desenvolvimento embrionário, as células dos discos imaginais das asas proliferam-se mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante o processo de metamorfose, em estruturas que vão dar origem as asas das moscas adultas. Estas células durante o teste são expostas aos agentes genotóxicos. O tratamento é feito com as larvas e a avaliação é feita com as moscas adultas (VALADARES *et al.*, 2010). O teste detecta a perda da heterozigose, que pode ocorrer de forma espontânea ou ser induzida por agentes físicos e químicos, nas células primordiais dos discos imaginais de asas, durante o estágio larval (VALADARES, 2007).

De acordo com Graf *et al.*, (1984), se ocorrer uma alteração genética nas células que estão se dividindo por mitose, será formado um clone de células mutantes, que poderá ser detectado através de uma mancha mutante que aparecerá, como característica fenotípica, na superfície das asas dos adultos. Tais células mutantes expressam fenotipicamente os genes marcadores *flr3* ou *mwh*, que são os responsáveis pelas alterações na forma dos pelos das asas das moscas adultas. As manchas mutantes podem ser simples ou gêmeas, como resultado de mutação, recombinação somática ou deleção ocorridas no cromossomo número 3.

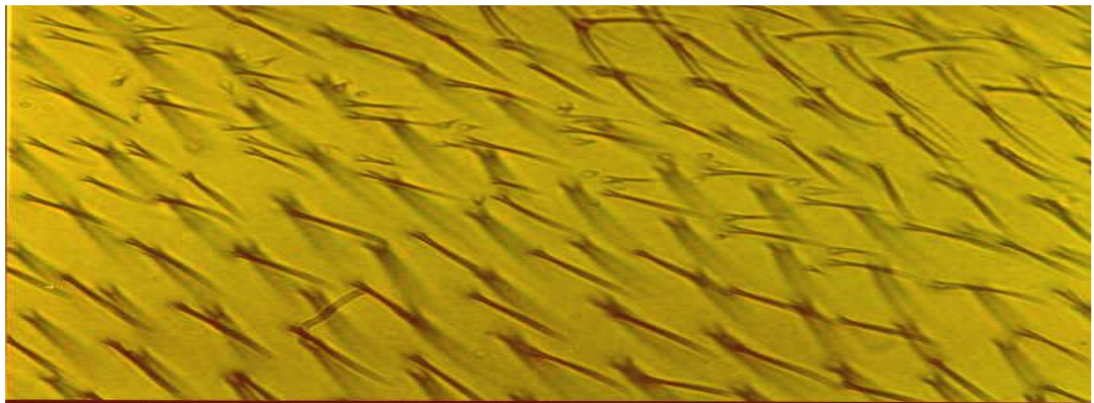


Figura 5. Manifestação fenotípica da mancha simples grande observada na asa de *D. melanogaster*.

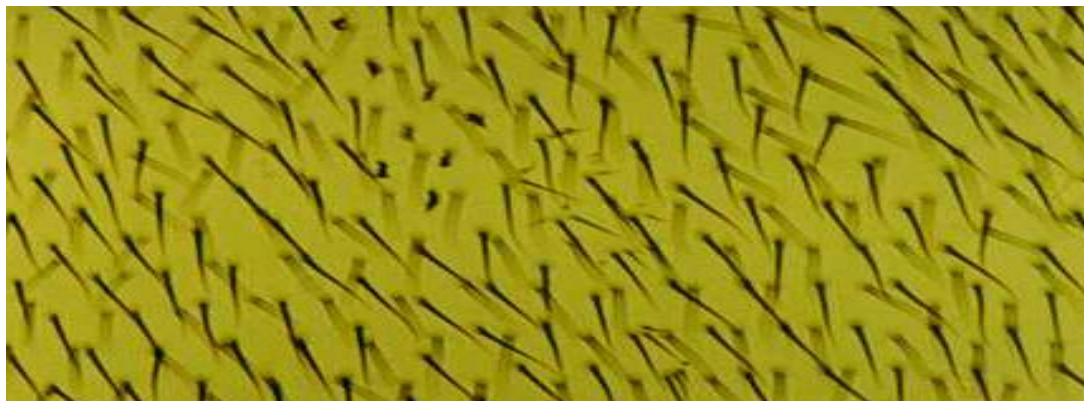


Figura 6. Manifestação fenotípica da mancha gêmea observada na asa de *D. melanogaster*.

Segundo Andrade; Lehmann (2003), para o Teste SMART são usadas 3 linhagens de *D. melanogaster*:

- *Multiple wing hairs*: linhagem portadora dos marcadores genéticos recessivos *mwh* no cromossomo 3 (*mwh*, 3-0,3). Em homozigose expressa até 3 pelos por célula.
- ORR-flare-3: esta linhagem possui os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R(R), que são resistentes ao DDT, contendo genes

responsáveis por alto nível construtivo de enzimas de metabolização do tipo citocromo P(CYP)6A2.

- *Flare-3*: que possui no cromossomo de nº 3 um gene mutante marcador recessivo em homozigose (*flr*³, 3-38,8).

São realizados dois diferentes tipos de cruzamentos: o Cruzamento padrão (ST), em que fêmeas virgens da linhagem *flr*³ são cruzadas com machos da linhagem *mwh/mwh* e Cruzamento de Alta bioativação (HB), em que fêmeas virgens *ORR; flr*³ são cruzadas com machos *mwh/mwh*.

1.4 Anfíbios

Cientistas documentaram que no mundo inteiro houve um declínio das populações de anfíbios. A fragmentação de habitats é a principal causa deste declínio. Porém, pesquisas apontaram que outros fatores como a radiação ultravioleta (HATCH; BLAUSTEIN, 2000), presença de níquel no ambiente (GONÇALVES et al., 2010), doenças infecciosas causadas pelo fungo quitrídeo (YOUNG et al., 2004), também causaram o aumento da mortalidade dos anuros.

Foi observado que o declínio das populações de anfíbios foi maior em habitats próximos a terras agrícolas (DAVIDSON et al., 2001), este fato foi associado com a presença de agrotóxicos no ambiente (BOONE; BRIDGES, 1999; BOONE; SEMLITSCH, 2001; DAVIDSON et al., 2001; RELYEA, 2005).

Os anfíbios podem ser excelentes bioindicadores da qualidade de inúmeros ambientes devido à combinação de várias características morfológicas e fisiológicas do grupo: ciclo de vida com estágios aquáticos e terrestres, capacidade de dispersão limitada com padrões de distribuição geográfica e área de vida restritos, possuem tegumento fino, úmido, permeável e sem os anexos como escamas, unhas, penas, pelos e garras; seus ovos e embriões são desprotegidos, o que os tornam extremamente vulneráveis a qualquer tipo de poluição ambiental (WELSS, 2007). Estes organismos apresentam um alto grau de filopatria. Geralmente a área de vida de um anfíbio além de ser restrita é passível de delimitação. Adicionado a isso, são animais fáceis de encontrar e coletar. Tais características facilitam a obtenção de dados sobre a diversidade, como por exemplo a riqueza de espécies em uma área delimitada e a densidade populacional (TOLEDO, 2009).

De acordo com Grisolia (2005), os estudos com anfíbios podem demonstrar claramente a fragilidade dos ecossistemas às contaminações por agrotóxicos. Os girinos de espécies diversas têm apresentado muita sensibilidade na detecção de contaminantes químicos em recursos hídricos.

Hypsiboas creptans (Wied-Neuwied, 1824), é uma espécie de anfíbio da família Hylidae, podendo ser encontrada em florestas tropicais úmidas, ambientes semiáridos, pastagens. Tem registros desta espécie no Brasil, Colômbia; Guiana Francesa; Panamá; Suriname, Venezuela, Trindade e Tobago. É uma espécie arbórea de hábitos noturnos, indivíduos dessa espécie podem ser encontrados em folhas de árvores, arbustos e outras vegetações próximas a corpos de água. Geralmente reproduz em poças temporárias no início da estação chuvosa (RED LIST, 2010). É possível encontrar esta espécie em habitats severamente degradados, assim, *H. creptans* pode ser usada como um Organismo indicador da qualidade ambiental.



Figura 7. Anfíbio da espécie *Hypsiboas creptans*. Fonte: TrekNature.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral investigar a possível presença de agrotóxicos com potenciais efeitos genotóxicos nos corpos de água temporários do Perímetro irrigado Califórnia (SE), por meio do Teste SMART em células de asas de *D. melanogaster* e do Teste do micronúcleo em girinos de *H. creptans*.

2.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar os efeitos mutagênicos de amostras de água de diferentes corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia por meio do Teste SMART em células de asa de *D.melanogaster*.
- ii. Correlacionar a frequência de micronúcleos observadas nos girinos de *H.creptans* do Perímetro Irrigado Califórnia com os girinos, da mesma espécie, de um açude temporário da Unidade de Conservação Estadual Monumento Natural Grota do Angico, área de referência.

REFERÊNCIAS

- AGENCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Agricultura Irrigada e o Uso Racional da Água. 2004. Disponível em:
<file:///E:/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20%20Aben%C3%A7oe%20senhor%20esta%20pa
sta!!!/AgriculturaIrrigada,%20ANA %202004.pdf > Acesso em 10 Fev. de 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)- Relatório de atividades 2011. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>> Acesso em: 18/10/2012.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v.343, n.2, p. 121-135, 1995.
- ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. **Teste para detecção fr mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster***. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental. Canoas: Ulbra, 2003. p.281-307.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p.61-72, 2007.
- ARAÚJO, A. C. P.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. S. Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3; São Paulo: Jun. 2000.
- BAPTISTA, D.F.; BUSS, D.F.; EGLER, M. **Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas aquáticos contaminados por agrotóxicos**. In: PERES, F., and MOREIRA, J.C., orgs. É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. Parte I, cap 8, p. 157-175.
- BANCO MUNDIAL. Agua Brasil 5: Impactos e Externalidades Sociais da Irrigação no Semi-árido Brasileiro. Brasília, 2004. Disponível em:
<<http://www.pontal.org/docs/benefits3.pdf> > Acesso em: 22/02/2014.
- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v.26, n.1, p. 205-213, 2011.
- BOONE, M. D.; BRIDGES, C. M. The effect of tem-perature on the potency of carbaryl for survival of tadpoles of the green frog (*Rana clamitans*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.18, p.1482–1484, 1999.
- BOONE, M. D.; SEMLITSCH, R.D. Interactions of an insecticide with larval density and predation in experimental amphibian communities. **Conservation Biology**, v. 15, p. 228–238, 2001.

BOSCH, B.; MAÑAS, F.; GORLA, N.; AIASSA, D. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v.3, n.6, p.154-163, 2011.

BOURDIOL, F., MOUCHET, F., PERRAULT, A., FOURQUAUX, I., DATAS, L., GANCET, C.; BOUTONNET, J.C.; PINELLI, E.; GAUTHIER, L.; FLAHAUT, E. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. **Carbon**, v.54, p.175-191, 2013.

BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J. A Química dos agrotóxicos. **Química Nova nas Escolas**. v. 34, n 1, p.10-15, Fev. 2012.

BRASIL. **Decreto nº 98816**, de 11 de janeiro de 1990. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a Classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Legislação federal de agrotóxicos e afins. Brasília: Ministério da Agricultura, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal, p.15-53, 1998.

BRINKMANN, M., BLENKLE, H., SALOWSKY, H., BLUHM, K., SCHIWY, S., TIEHM, A., HOLLERT, H. Genotoxicity of Heterocyclic PAHs in the Micronucleus Assay with the Fish Liver Cell Line RTL-W1. **PloS one**, v, 9, n.1, p. e85692, 2014.

BUCKER, A.; CARVALHO, M.; CONCEIÇÃO, M.; ALVES-GOMES, J. Micronucleus test and comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to benzene. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 1, 2012.

COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO DE RECURSOS HIDRICOS E IRRIGAÇÃO DE SERGIPE (COHIDRO) Perímetro Irrigado Califórnia. Disponível em: <<http://www.cohidro.se.gov.br/modules/tinyd0/index.php?id=20>> Acesso em: 19/05/2014.

CORREIA, R.C.; ARAÚJO, J.L.P.; CAVALCANTI, E.B. **A fruticultura como vetor de desenvolvimento: o caso dos municípios de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA)**. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/8957/1/OPB427.pdf>> Acesso em: 05/05/2014.

COSTA, S.; PINA, C.; COELHO, P.; COSTA, C.; SILVA, S.; PORTO, B.; ; LAFFON, B.; TEIXEIRA, J. P. Occupational exposure to formaldehyde: genotoxic risk evaluation by comet assay and micronucleus test using human peripheral lymphocytes. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part A, v.74, n.15-16, p.1040-1051, 2011.

CUTLER, G.C.; SCOTT-DUPREE, C.D.; TOLMAN, J.H.; HARRIS, C.R. Toxicity of the insect growth regulator novaluron to the non-target predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). **Biological Control**, v. 38, p. 196–204, 2006.

DAVIDSON, C.; SHAFFER, H. B.; JENNINGS, M. R. Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat, and pesticides hypotheses. **Ecological Applications**, v.11, p.464–479, 2001.

DECAPRIO, A. P. Biomarkers: coming of age for environmental health and risk assessment. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 7, p. 1837-1848, 1997.

DEPLEDGE, M. H. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 1, p. 109-122, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema de Produção de Banana para o estado do Pará**. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaJuazeiro/agrotoxicos.htm>. Acesso em: 03/08/2013.

FENECH, M.; CHENG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1, p. 65-75, 2003.

FERNANDES, A.F. The use of Biomarkers in aquatic toxicology studies. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v. 12, n. 001, p. 67-86, 2005.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 80-92, 2009.

GARCIA, A.C.F.S.; MARCON, A.E.; FERREIRA, D.M.; SANTOS, E.A.B.; AMARAL, V.S.; MEDEIROS, S.R.B. Micronucleus study of the quality mutagenicity of surface water from a semi-arid region. **Journal of Environmental Monitoring**, v.13, p. 3329-3335, 2011.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental mutagenesis**, v. 6, n. 2, p. 153-188, 1984.

GONÇALVES, M.K.; OLIVEIRA, H.H.P.; SOUSA, C.C.N.; CARVALHO, W.F.; NOMURA, F.; MACIEL, N.M.; CRUZ, A.D.; SILVA, D.M. Análises mutagênicas de anuros em áreas de mineração de níquel. **Estudos**, v.37, n. 9, p. 737-747, Goiânia, 2010.

GOMES, C.C.S.; NETO, A.O.A. BARROS, A.C.; LIMA, C.C.V.; CUNHA, L.O. Perfil da produção agrícola no Perímetro Irrigado Califórnia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, Mossoró**, v.4, n.1, p.33-40, Jan/Mar. 2009.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos – mutações, reprodução e câncer**. Brasília: Universidade de Brasília, 2005.

HACH, A.C.; BLAUSTEIN, A.R. Combined Effects of UV-B, Nitrate, and Low pH Reduce the Survival and Activity Level of Larval Cascades Frogs (*Rana cascadae*). **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, p.494-499, 2000.

HACON, S.S. 2003. Avaliação e gestão do risco ecotoxicológico à saúde humana. p. 245- 322 In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. Editora Rima e InterTox, São Carlos. 322 P.

HAOUGUI, A.; MAMADOU, A.; KADR, A. Effects of the Binary-Insecticide, Capt 88 (Cypermethrin + Acetamiprid), on the Non-Target Fauna in Horticultural Crops of Niger. **Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants**, v. 5, n. 2, p. 100-109, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS RENOVÁVEIS. **Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) de Agrotóxicos e Afins - Sistema de Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/avaliacao-do-potencial-de-periculosidade-ambiental-ppa/pagina-4>> Acesso em: 01 de Abr. de 2014.

INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA. **A irrigação no Brasil, situação e diretrizes**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.integracao.gov.br/pt/c/document_library/get_file?uuid=4acec1ad-1463-40fd-8a71-e05f6a29d55c&groupId=10157> Acesso em: 20/02/2014.

JIANG, Y.; SWALE, D.; CARLIER, P.R.; HARTSEL, J.A.; MA, M.; EKSTROM, F.; BLOOMQUIST, J.R. Evaluation of novel carbamate insecticides for neurotoxicity to non-target species. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 106, n. 3, p. 156–161, Jul. 2013.

KIRSCH-VOLDERS, M., BONASSI, S., KNASMUELLER, S., HOLLAND, N., BOLOGNESI, C., FENECH, M. F. Commentary: Critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for *in vivo* biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals - A HUMN project perspective. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 759, p. 49-58, 2014.

LAJMANOVICH, R. C., CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C., ATTADAMO, A. M., JUNGES, C. M., PELTZER, P. M., BASSÓ, A., LORENZATTI, E. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 769, p. 7-12, 2014.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Editora Manole, 1999. 230p.

LEONZIO, C.; FOSSI, M.C. 1993. Nondestructive biomarkers strategy; perspectives and applications. Pp 297-312. In: FOSSI, M.C.; LEONZIO, C. Nondestructive biomarkers in vertebrates. **Lewis public**, London. 368 p.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil um guia para ação em defesa da vida. Articulação nacional de Agroecologia**.

Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/67016370/AGROTOXICOS-NO-BRASIL-UM-GUIA-PARA-ACAO-EM-DEFESA-DA-VIDA>> Acesso em: 30/05/2013.

MARINHO, A.M.C.P. **Contextos e contornos da modernização agrícola em municípios do Baixo Jaguaribe-CE: o espelho do (des)envolvimento e seus reflexos na saúde, trabalho e ambiente**. 2010. 224f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

MELO, K. M.; GRISOLIA, C.K.; PIECZARKA, J.C.; SOUZA, L.R.; SOUZA FILHO, J.; NAGAMACHI, C.Y. Fish in micronucleus test demonstrates aneugenic action of rotenone in a common freshwater fish species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Mutagenesis**, V.29, n.3, p.215-219, 2014.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. A Irrigação no Brasil situação e diretrizes. 2008. Disponível em: http://www.integracao.gov.br/pt/c/document_library/get_file?uuid=4acec1ad-1463-40fd-8a71-e05f6a29d55c&groupId=10157 Acesso em: 05 de Fev. 2014.

MOUCHET, F.; LANDOIS, P.; DATSYUK, V.; PUECH, P.; PINELLI, E.; FLAHAUT, E.; GAUTHIER, L. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. **Environmental toxicology**, v.26, n.2, 136-145, 2011.

NERSESYAN, A., KUNDI, M., FENECH, M., BOLOGNESI, C., MISIK, M., WULTSCH, G., HARTMANN, M., KNASMUELLER, S. Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): A review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, p. 1-15, 2014.

PINHEIRO, A.S. **Utilização de agrotóxicos no Perímetro Irrigado Califórnia e suas influências na saúde do Trabalhador Rural**. 2004. 158f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, 2004.

PIRES, R.C.M.; ARRUDA, F.B.; SAKAI, E.; CALHEIROS, R.O.; BRUNINI, O. Agricultura Irrigada. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, São Paulo, 2008. Disponível em: http://www.dge.apta.sp.gov.br/publicacoes/T&IA/T&IAv1n1/Revista_Apta_Artigo_Agricultura.pdf > Acesso em: 10/05/2014.

PELAEZ, V.; TERRA, F.H.B.; SILVA, L.R. 2009. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. Artigo apresentado no **XIV Encontro Nacional de Economia Política** / Sociedade Brasileira de Economia Política - São Paulo/SP, de 09/06/2009 a 12/06/2009. 22 p.

RED LIST. *Hypsiboas creptans*. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/55457/0> Acesso em: 08/06/2014.

RELYEA, R. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. **Ecological Applications**, v.15, p.1118–1124, 2005.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. IN: RIBEIRO, L.R.; SALVADOR, D.M.F.; MARQUES, E.K. *Mutagenese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003, p173 – 200.

ROCHA, A.A. **Monitoramento de agrotóxicos em áreas irrigadas por pivô central na microbacia do Tijunheiro, município de Morrinhos, Goiás.** 2011. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de energia nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA (SINDAG). **Venda de defensivos segue em alta no Brasil.** 2013. Disponível em: < http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2337 > Acesso em: 10/12/2013.

SINGHA, U.; PANDEY, N.; BORO, F.; GIRI, S.; GIRI, A.; BISWAS, S. Sodium arsenite induced changes in survival, growth, metamorphosis and genotoxicity in the Indian cricket frog (*Rana limnocharis*). **Chemosphere**, v.112, p.333-339, 2014.

SPADOTTO, C. A., GOMES, M. A. F., LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. D. (2004). **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações.** Embrapa Meio Ambiente. Documentos.

SILVA, C.A.M.; FRUTCHTENGARTEN, L. **Riscos químicos ambientais a saúde das crianças.** Jornal de Pediatria, v. 81, n. 5, 2005.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental, p.167-178. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, L.M.F.; ARAÚJO, G.T.; SILVA, A.D.V.; JUNIOR, M.V.; CARVALHO, C.M. **Levantamento dos agrotóxicos utilizados na horticultura no município de Ubajara –CE.** Revista Brasileira de Agricultura Irrigada. v.5, nº. 4, P.280 - 285, 2011.

TAKAI, A., KAGAWA, N., NAKAGAWA, M., WATABE, Y., FUJIKAWA, K. Frequency and size of micronuclei induced in gill cells of medaka fish (*Oryzias latipes*) after whole-body exposure to clastogenic chemicals. **Drug and chemical toxicology**, v.0, p.1-6, 2014.

TESTEZLAF, R. Irrigação: Métodos, Sistemas e Aplicações. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2011. Disponível em: <http://www.feagri.unicamp.br/irrigacao/livro/livro_testezlaf_versao1.pdf > Acesso em: 11/05/2014.

TOLEDO, L. F. Anfíbios como Bioindicadores. In: NEUMANN-LEITÃO, S. & EL-DIER, S. (Orgs.) **Bioindicadores da Qualidade Ambiental.** Recife: Instituto Brasileiro Pró-Cidadania. Pp. 196-208, 2009.

VALADARES, B.L.B. **Avaliação dos Derivados Sintéticos da testosterona pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*.** Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2007.

VALADARES, B.L.B.; SILVA, L.M.; OLIVEIRA, J.S.; MOREIRA, A.L.C. Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*: uma importante ferramenta na Avaliação da Genotoxicidade ambiental e na Avaliação de agentes mutagênicos e antimutagênicos naturais e sintéticos. In: Reis, I.F.; Reis, J.B.A.; Barbiéri, R.S. **Tópicos em Ciências Naturais e da Saúde.** UNEC. Caratinga, 2010.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 135–150, 2008.

YAMÉOGO, L.; TRAORÉ, K.; BACK, C.; HOUGARD, J.M.; CALAMARI, D. Risk assessment of etofenprox (vectron) on non-target aquatic fauna compared with other pesticides used as *Simulium* larvicide in a tropical environment. **Chemistry for Protection of the Environment**, v. 42, n. 8, p. 965-974, Marc. 2001.

YOUNG, B.E.; S.N. STUART, J.S. CHANSON, N.A. COX BOUCHER, T.M. Disappearing jewels: The status of NewWorld amphibians. **NatureServe**, Arlington, EUA. 2004

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of toxicology**. Taylor & Francis, 2001. 309 p.

WELLS, P.G.; DEPLDGE, M.H.; BUTLER, J.N.; MANOCK, J.J.; KNAP, A.H. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants – exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, n. 10, p. 799-804, 2001.

WELLS, K.D. **The ecology and behavior of amphibians**. Chicago: The University of Chicago Press, 2007, 1400 p.

World Health Organization – International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva; 1993.

WURGLER, F. E.; KRAMERS, P. G. N. Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). **Mutagenesis**, v. 7, n. 5, p. 321-327, 1992.

Capítulo I

**Avaliação do potencial mutagênico de resíduos de agrotóxicos no Perímetro Irrigado
Califórnia, por meio do Teste do Micronúcleo em eritrócitos de girinos de *Hypsiboas
creptans***

RESUMO

O uso descontrolado de agrotóxicos tem resultado na presença de seus resíduos em diferentes compartimentos ambientais. Estudos detectaram a presença destes resíduos em águas superficiais e subterrâneas, contaminando as fontes de água potável. Uma vez presentes nas águas, os agrotóxicos podem causar efeitos adversos na flora e na fauna, além de causar danos à saúde humana e ambiental. Lagoas situadas dentro ou ao redor de áreas agrícolas podem receber nutrientes e agrotóxicos a partir de terras agrícolas da região, transportados pela água da chuva ou da própria irrigação. Na zona semiárida brasileira devido aos baixos índices de precipitação pluviométrica, irregularidade das chuvas e altas taxas de evaporação, a maioria dos corpos de água são temporários. Além de servir de recurso para a população humana local, estes corpos de água abrigam uma diversidade muito grande de espécies que são totalmente dependentes deles para a reprodução e perpetuação. Em nosso estudo, o Teste do micronúcleo foi aplicado em eritrócitos de girinos da espécie *Hypsiboas creptans* para avaliar o possível potencial genotóxico da água de três corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia (CD1, CD2 E CD3), através da comparação com girinos de uma área de referência, Unidade de Conservação Monumento Natural Grota do Angico. Amostras de água foram coletadas em todos os corpos de água, onde foram coletados os girinos, e levadas para o Instituto de tecnologia de Pernambuco para a análise de resíduos de agrotóxicos. Foram detectados resíduos dos agrotóxicos Malathion e Chlorpyrifos no CD2, e Methomyl, Malathion e Hexythiazox no CD3. O Teste do micronúcleo comprovou que os girinos coletados no CD2 apresentaram uma quantidade de eritrócitos micronucleados significativamente maior que os girinos da área de referência. Entre os girinos coletados nos Corpos de água do Perímetro Irrigado Califórnia (CD1, CD2 e CD3), não houve diferenças estatísticas significativas.

Palavras - chave: corpos de água temporários, agrotóxicos, girinos.

1 INTRODUÇÃO

O uso descontrolado de agrotóxicos tem resultado na presença de seus resíduos em diferentes compartimentos ambientais. Estudos detectaram a presença destes resíduos em águas superficiais e subterrâneas, contaminando as fontes de água potável (TURGUT, 2003; LAMERS *et al.*, 2011; PLAKAS *et al.*, 2012; STEHLE *et al.*, 2013). Uma vez presentes nas águas, os agrotóxicos podem causar efeitos adversos na flora e na fauna, além de causar danos à saúde humana e ambiental (CEREJEIRA *et al.*, 2003).

Apesar de todos os danos causados, os agrotóxicos continuam a ser usados excessivamente nas áreas agrícolas de diversos países do mundo (WILSON; TISDELL, 2001; EDDLESTON *et al.*, 2012). O fato de serem pulverizados em áreas muito extensas dificulta o tratamento e a prevenção da contaminação. Por isso a agricultura é considerada a principal fonte de poluição difusa (GARCÍA-GALÁN *et al.*, 2010). Lagoas situadas dentro ou ao redor de áreas agrícolas podem receber nutrientes e agrotóxicos a partir de terras agrícolas da região, transportados pela água da chuva ou da própria irrigação (PELTZER *et al.*, 2008).

Na zona semiárida brasileira devido aos baixos índices de precipitação pluviométrica, irregularidade das chuvas e altas taxas de evaporação, a maioria dos corpos de água são temporários (ABÍLIO *et al.*, 2007). Além de servir de recurso para a população humana, esses corpos de água são pequenos ecossistemas que abrigam uma elevada biodiversidade de espécies como plantas aquáticas (TABOSA *et al.*, 2012), zoobentos (SOUZA; ABÍLIO, 2006), zooplâncton (MEDEIROS *et al.*, 2011), crustáceos (DINIZ *et al.*, 2013), insetos aquáticos (ABÍLIO *et al.*, 2005), anfíbios (ARZABE *et al.*, 1999; CALDAS *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2014), além de outros organismos.



Figura 1. Corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia. Fonte: Arquivo pessoal

Estudos sobre os ecossistemas límnicos são de grande importância para a elaboração de ações de preservação da biodiversidade aquática e integridade ecológica dos corpos hídricos. A preservação dos corpos de água pode garantir a sustentabilidade dos recursos naturais (ABÍLIO *et al.*, 2007). As práticas de biomonitoramento podem ajudar na conservação desses ecossistemas aquáticos uma vez que os organismos da comunidade refletem a qualidade ecológica geral, permitindo a avaliação integrada dos efeitos que as diversas fontes de poluição podem causar. Além de ser relativamente barato, o uso de bioindicadores é mais eficiente do que as medidas instantâneas de parâmetros físicos e químicos, como a temperatura, pH, oxigênio dissolvido, teores totais, nutrientes dissolvidos e outros, que são normalmente medidos no campo e utilizados para avaliar a qualidade das águas (CALLISTO *et al.*, 2005).

As consequências da exposição da biota a agentes mutagênicos é um problema gravíssimo devido ao potencial que esses agentes tem de causar danos as células dos organismos expostos a eles (SHUGART; THEODORAKIS, 1994), muitos compostos mutagênicos podem ligar-se a molécula de DNA e desencadear uma série de eventos biológicos, tais como imunotoxicidade, citotoxicidade, inibição do crescimento, mutações, problemas reprodutivos e câncer. Desde 1980, muitos pesquisadores têm avaliado o potencial mutagênico e genotóxico das águas superficiais usando uma variedade de bioensaios e métodos analíticos (OHE *et al.*, 2004).

Em organismos eucariotos as mutações cromossômicas podem levar a formação de micronúcleos (FERNANDES, 1993). Assim, o Teste do micronúcleo (TMN) é um dos testes mais usados para a detecção de agentes mutagênicos, e devido as vantagens oferecidas por ele como baixo custo, alta capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos) e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal), tem sido muito recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental (FENECH, 2003).

Os anfíbios podem ser excelentes bioindicadores da qualidade de inúmeros ambientes devido à combinação de várias características morfológicas e fisiológicas do grupo como ciclo de vida com estágios aquáticos e terrestres, capacidade de dispersão limitada com padrões de distribuição geográfica e área de vida restritos, possuem tegumento fino, úmido, permeável e sem os anexos como escamas, unhas, penas, pelos e garras; seus ovos e embriões são desprotegidos, o que os tornam extremamente vulneráveis a qualquer tipo de poluição ambiental (WELSS, 2007).

Cientistas documentaram que no mundo inteiro houve um declínio das populações de anfíbios. A fragmentação de habitats é a principal causa deste declínio, porém, pesquisas

apontaram que outros fatores como a radiação ultravioleta (HATCH; BLAUSTEIN, 2000), presença de níquel no ambiente (GONÇALVES *et al.*, 2010), doenças infecciosas causadas pelo fungo quitrídeo (YOUNG *et al.*, 2004), também causaram o aumento da mortalidade destes animais. Recentemente foi observado que o declínio das populações de anfíbios foi maior em habitats próximos a terras agrícolas (DAVIDSON *et al.*, 2001), este fato foi associado com a presença de agrotóxicos no ambiente (BOONE; BRIDGES, 1999; BOONE; SEMLITSCH, 2001; DAVIDSON *et al.*, 2001; RELYEA, 2005). No Brasil existem poucas informações sobre os efeitos genotóxicos e mutagênicos dos agrotóxicos em anfíbios (DA SILVA *et al.*, 2013; CAMPANA *et al.*, 2003; KOPE *et al.*, 2007). Entre os poucos trabalhos existentes, a maioria foi feita em laboratório, o que muitas vezes não condiz com a realidade encontrada no habitat natural desses organismos.

É esperado que organismos bioindicadores expostos a ambientes contaminados desenvolvam alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais. Devido a isso, é importante conhecer os níveis basais dessas alterações a serem observadas nos organismos que vivem em regiões que apresentam um histórico de contaminação e comparar com organismos da mesma espécie que vivem em uma região de referência. Assim, o objetivo do presente trabalho foi correlacionar a Frequência de MN observadas nos girinos de *Hypsiboas creptans*, que vivem no meio das plantações do Perímetro Irrigado Califórnia (PIC), onde são pulverizados agrotóxicos frequentemente, com os girinos, da mesma espécie, encontrados na unidade de Conservação Monumento Natural Grota do Angico (MNGA), utilizada aqui como sítio de referência, uma vez que não há influência direta de agrotóxicos em seus limites.



Figura 2. Anfíbio adulto da espécie *H. creptans*. Fonte: Calpho

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição da área de estudo

2.1.1 Perímetro Irrigado Califórnia

Girinos de *Hypsiboas creptans* foram coletados em 3 diferentes corpos de água temporários (CD1, CD2, CD3), no meio das plantações de quiabo ($09^{\circ}42'37,3''$ S/ $37^{\circ}42'51,9''$ W), ($09^{\circ}42'36,8''$ S/ $37^{\circ}43'02,1''$ W) e ($09^{\circ}41'58,9''$ S/ $37^{\circ}43'00,7''$ W) do PIC, localizado no município de Canindé de São Francisco, no extremo noroeste de Sergipe, alto sertão sergipano. De acordo com Gomes et al (2009), este Perímetro está dividido em 333 lotes, apresenta uma área total de 3.980 hectares possuindo as duas formas de exploração agrícolas que são recomendadas para a região semiárida: a agricultura irrigada e a de sequeiro (resistente à seca). O sistema de irrigação é alimentado com água captada diretamente do Rio São Francisco, através da estação de bombeamento central, que eleva as vazões de irrigação a uma altura de 170 metros, com capacidade de $1.540 \text{ m}^3/\text{s}$. Nos 2.620 ha das terras não irrigáveis, existem implantados lotes de sequeiro e área utilizada para reservas florestais. São exploradas as culturas da goiaba, cenoura, acerola, banana, feijão de corda, abóbora, milho, mandioca, tomate, com destaque para o quiabo, que é a cultura mais explorada e a que mais consome agrotóxicos.

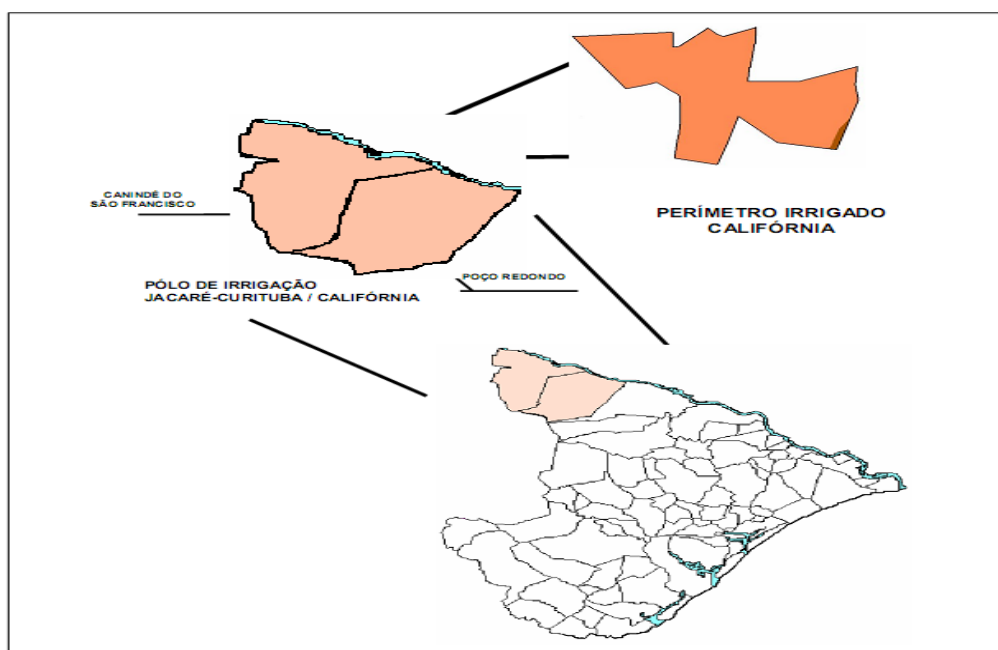


Figura 3. Localização do Perímetro Irrigado Califórnia em Sergipe. Fonte: Pinheiro, 2004.

2.1.2 Unidade de Conservação Monumento Natural Grota do Angico (MNGA)

Girinos da espécie *Hypsiboas creptans* foram coletados num açude temporário (09°41'12,8" S/ 37°43'00.6"), localizado Na MNGA, região usada como sítio de referência, localizada no domínio morfoclimático da Caatinga, entre os municípios de Poço Redondo e Canindé de São Francisco, alto sertão sergipano, às margens do Rio São Francisco.

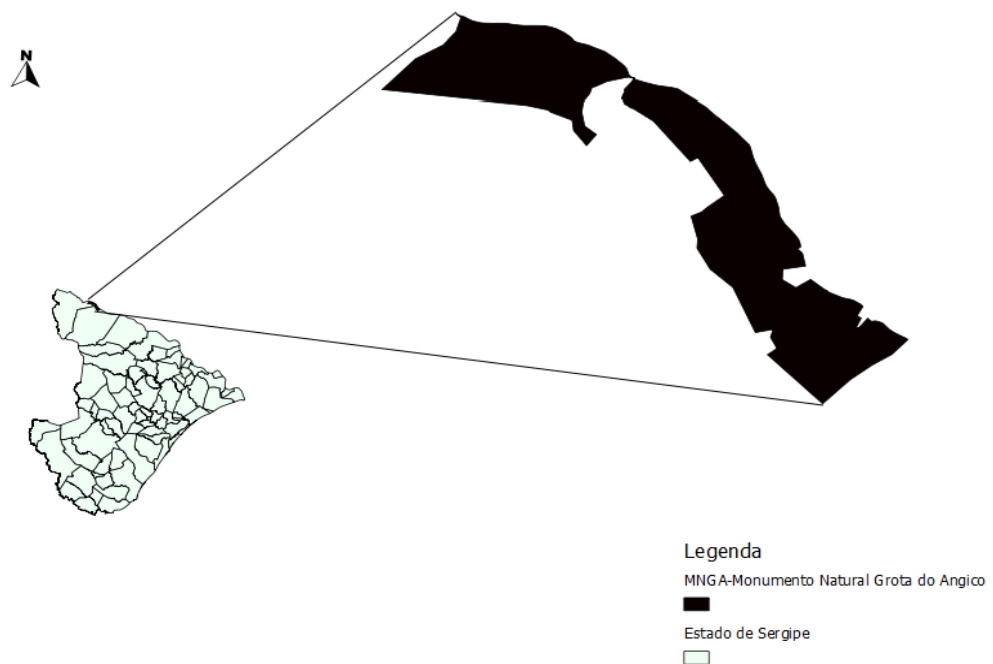


Figura 4. Localização da Unidade de Conservação Monumento Natural Grota do Angico. Fonte: Breno Moura.

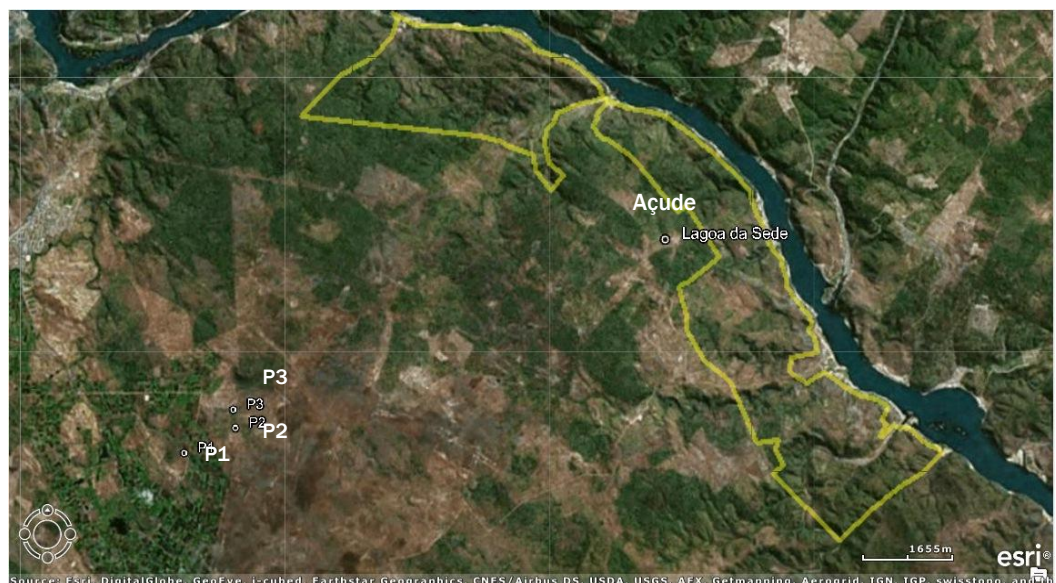


Figura 4. Pontos de Coleta do Perímetro Irrigado Califórnia e MNGA.

2.2 Análise de resíduos de agrotóxicos

Resíduos de agrotóxicos (Lista de agrotóxicos analisados em anexo), foram analisados em todas as amostras de água coletadas no PIC, através do método Multirésíduo LC-MS/MS e/ou CG-MS/MS. Para estas análises, 2 L de água foram obtidos de cada corpo de água, armazenados em vidro âmbar e levado em um prazo máximo de 24 horas após a coleta para o laboratório. Algumas amostras foram analisadas no Laboratório de estudos ambientais (LEA), do Instituto de Tecnologia e Pesquisa de Sergipe (ITP) e outras no Laboratório de análises de Resíduos de agrotóxicos do Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP).

2.3 Girinos em estudo

Girinos de *Hypsiboas creptans* foram escolhidos para este estudo por ser a espécie dominante nos corpos de água temporários do PIC. Esta espécie pertence a família Hylidae, com ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada em florestas tropicais úmidas, ambientes semiáridos e pastagens.

Para este trabalho foram coletados um total de 60 girinos: 15 girinos no CD1 em Agosto de 2013, 15 girinos no CD2 em Março de 2014 e 15 girinos no CD3 em Abril de 2014. Em Novembro de 2014, foram coletados 15 girinos no açude temporário do MNGA. Devido à escassez de chuvas no semiárido, entre os meses de Novembro de 2012 a Maio de 2014, foram os únicos meses nos quais foram encontrados os girinos. Todos eram premetamorfos (estágio 31-34) (GOSNER, 1960), com comprimento médio de $5,0 \pm 0,6$ cm e peso médio de $1,19 \pm 0,10$ g. Foram coletados 15 girinos em cada corpo de água do PIC e 15 no açude do MNGA.

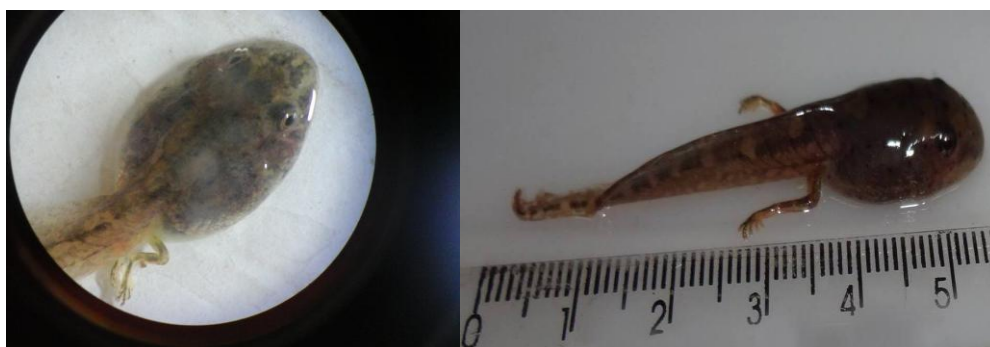


Figura 6. Girino de *H. creptans*. Fonte: Arquivo pessoal.

2.4 Teste do Micronúcleo (TMN)

2.4.1 Coleta de sangue e tratamento

Os girinos foram anestesiados por aproximadamente 2 min com solução de Lidocaína (Pearson), imediatamente amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca, utilizando seringas descartáveis de insulina. Para cada animal foram feitos dois esfregaços de sangue em lâminas limpas e identificadas. Após a secagem as lâminas foram fixadas e coradas com o conjunto de corantes para coloração diferencial rápida em Hematologia (New Prov). Após a secagem, as lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio óptico de luz, marca Olympus®, em objetiva de 100x. Foram analisadas 1000 células por animal.

2. 5 Análise Estatística

Os dados foram analisados adotando-se a análise de variância ANOVA *one-way* para medidas paramétricas, seguidas do pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os testes foram realizados com o programa *BioEstat* – versão 5.3. Para todos os grupos consideraram-se estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

A frequência de micronúcleos encontrada nos eritrócitos de cada corpo de água temporário do PIC, foi comparada com a frequência de micronúcleos encontrada nos eritrócitos dos girinos do sítio de referência (MNGA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Já foi comprovado que os anfíbios podem ser excelentes bioindicadores da qualidade de ambientes aquáticos e terrestres, impactados por agrotóxicos (BLAUSTEIN; JOHNSON, 2003; BLAUSTEIN; KATS 2003). Devido à sensibilidade extrema, girinos de diversas espécies tem sido amplamente utilizados como bioindicadores da presença de contaminantes químicos na água (BURGUER *et al.*, 2014).

No contexto, o TMN é o mais usado para a avaliação do potencial genotóxico de agrotóxicos em girinos (CAMPANA *et al.*, 2003; LAJMANOVICH *et al.*, 2005; LANCTÔT *et al.*, 2013; ARCAUTE *et al.*, 2014; PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2014). Muitos estudos já foram feitos, entretanto, na maioria deles foram avaliados o efeito do produto comercial em girinos *ex situ*. Estudos sobre o impacto dos agrotóxicos em girinos *in situ* são de grande importância, uma vez que a concentração, transporte, transformação e disposição final de um

contaminante no ambiente dependem das propriedades do ambiente e das características do contaminante. A toxicidade e ecotoxicidade dos produtos de degradação dos agrotóxicos podem diferir enormemente da molécula-mãe, inclusive alguns produtos de degradação podem ser mais tóxicos que o ingrediente-ativo original (SPADOTTO, 2004).

Dada a importância da irrigação para a população do semiárido, da importância ecológica dos corpos de água temporários da região para a população humana e para a biota que habita neles, no presente estudo foi avaliado o potencial mutagênico da água de 3 diferentes corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia por meio do TMN em girinos de *Hypsiboas creptans*, através da comparação da frequência de MN dos girinos desses corpos de água com outros espécimes de uma área de referência (MNGA).

Os resultados aqui apresentados apontaram diferenças significativas entre as frequências de MN dos anfíbios dos corpos de água temporários do PIC e do açude do MNGA ($p < 0,05$) (Tab.1). Pelo teste de Tukey, foi possível observar que os girinos do corpo de água temporário 2 (CD2) apresentaram um aumento significativo na frequência de MN, quando comparados ao grupo de girinos do corpo de água da área de referência (MNGA); entre os girinos dos corpos de água do PIC não houve diferenças significativas entre o número de eritrócitos micronucleados.

Tabela 1. Análise de Variância do percentual de micronúcleos (MN) calculado em eritrócitos de girinos de *Hypsiboas creptans* do Perímetro Irrigado Califórnia e do MNGA.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	3	27.482	9.161	3.6906	0.0173
Resíduo	52	129.071	2.482		
Total	55	156.553			

GL = graus de liberdade, SQ = soma de quadrados, QM = quadrado médio,

No Brasil, a contaminação dos recursos hídricos por agrotóxicos pode ser potencializada, uma vez que esse país tornou-se o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (GAMA *et al.*, 2013). O risco de contaminação dos corpos de água de perto ou de dentro das plantações é muito alto, por que a água da chuva ou da própria irrigação pode facilitar a entrada de agrotóxicos nesses recursos hídricos. O uso de misturas de agrotóxicos é uma prática relativamente comum na agricultura (SILVA *et al.*, 2013). Assim, nos casos de avaliação, quando se faz varredura dos agrotóxicos na água, geralmente são detectados mais de dois produtos (FILIZOLA *et al.*, 2002; RIBEIRO; DORES, 2013; POSSAVATZ *et al.*, 2014).

Por meio dos resultados das análises químicas realizadas com as amostras dos recursos hídricos em estudo (Tab. 2), podemos sugerir que os resíduos de agrotóxicos encontrados nelas, em sinergismo ou isolados, possam ser os responsáveis pelos efeitos mutagênicos observados nos girinos. No corpo de água 2 (CD2), foram detectados os agrotóxicos Malathion e Chlorpyrifos; no corpo de água 3 (CD3), foram detectados o Methomyl, Malathion e Hexythiazox. No corpo de água 1(CD1) assim como no MNGA, não foram detectados agrotóxicos, o Limite de detecção foi menor que 0,03 (LQ <0,03).

Tabela 2. Caracterização físico - química das amostras de água dos corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia e do MNGA

Local de coleta e período	Temperatura °C	pH	Oxigênio dissolvido mg/L	Concentração de agrotóxicos (µg/L)			
				Methomyl	Malathion	Chlorpyrifos	Hexythiazox
CD1							
Agosto (2013)	24,9	7,9	8,04	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
CD 2							
Março (2013)	23, 8	6,7	8, 01	<0,03	0,9	0,85	<0.03
CD 3							
Abril (2014)	25, 3	6,8	7,98	1,09	0,08	< 0,03	0,20
MNGA							
Novembro (2013)	27, 6	7,8	8,83	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03

CD1 = corpo de água temporário 1, CD2 = corpo de água temporário 2, CD3 = corpo de água temporário 3, MNGA = açude temporário do Monumento Natural Grota do Angico

Na tabela 3, pode-se observar que apesar da Análise de variância (Tab 2) detectar a diferença significativa somente entre o CD2 e o MNGA, no corpo de água 3, onde foi detectada a presença de três agrotóxicos diferentes, o número de eritrócitos micronucleados foi o dobro do número encontrado nos eritrócitos dos girinos que habitavam a área de referência (MNGA).

Tabela 3. Frequência de Eritrócitos micronucleados em girinos de *H. creptans*.

Local	N de indivíduos	n de células analisadas	Total de MN
Corpo de água 1	15	15000	9
Corpo de água 2	15	15000	33
Corpo de água 3	15	15000	14
Área de referência (MNGA)	15	15000	6

De acordo com a *World Health Organization* (WHO), o Malathion é um inseticida organoclorado que atua na inibição da atividade da acetilcolinesterase. Vários estudos demonstraram o potencial genotóxico desse agrotóxico em algumas espécies, inclusive em humanos.

Camundongos machos, expostos dermicamente ao Malathion, sofreram aberrações cromossômicas nas células da medula óssea e nas células germinativas (SALVADORI *et al.*, 1988). GIRI *et al.*, (2013), através da exposição de camundongos ao Malathion, pela via intraperitoneal e via oral, observaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos nos eritrócitos destes organismos. Linfócitos humanos, *in vitro*, expostos ao Malathion, tiveram um aumento significativo de deleções cromossômicas (PLUTH *et al.*, 1996). BLASIAK *et al.*, (1999), expuseram linfócitos periféricos do sangue humano, *in vitro*, a diferentes concentrações do Malathion e observaram um aumento significativo de quebras do DNA dos genes supressores de tumores, indicando que este agrotóxico pode provocar câncer. O Teste do micronúcleo em peixes da espécie *Channa punctatus*, expostos a diferentes concentrações do Malathion, comprovou que o mesmo pode provocar um aumento significativo na frequência de micronúcleos (KUMAR *et al.*, 2010; PARVEN; JOSSE *et al.*, 2014).

O Hexythiazox é um acaricida da classificação toxicológica III, muito tóxico para espécies de água doce. Tem potencial de bioacumulação moderada, mas pode causar impactos nas espécies do topo da cadeia alimentar, principalmente as que se alimentam de peixes, uma vez que foi comprovado que ele pode se acumular nas vísceras e músculos desses organismos (EPA, 2007).

O Chlorpyrifos é um inseticida organofosforado da classificação toxicológica I, extremamente tóxico. De acordo com *United States Environmental Protection Agency* (EPA - 2002), em humanos ele pode causar a inibição da enzima colinesterase e, em caso de exposição prolongada, pode levar a morte. O Clorpyrifos já demonstrou seu potencial genotóxico em algumas espécies. Através do ensaio cometa e do Teste do Micronúcleo em girinos da espécie *Bufo gargarizans* e em peixes da espécie *Channa punctatus*, foi comprovado que este inseticida provocou o aumento das lesões cromossômicas nos eritrócitos dos girinos (YIN *et al.*, 2009) e dos peixes (ALI *et al.*, 2008). Em fêmeas de camundongos gestantes, foram administradas doses únicas de Clorpyrifos por via intraperitoneal, após o terceiro dia de gestação, os blastocistos foram coletados para o Teste do Micronúcleo. Foi observado um aumento significativo na frequência de micronúcleos (TIAN; YAMAUCHI, 2003).

O Methomyl é o inseticida mais usado nas áreas agrícolas do mundo, tendo classificação toxicológica I. De acordo com o EPA (1998), este inseticida pode causar riscos aos organismos aquáticos sempre que for utilizado, e se as aplicações forem repetidas, os organismos podem sofrer riscos crônicos. Alguns estudos comprovaram o potencial genotóxico do Methomyl em mamíferos. Em Camundongos tratados com injeções intraperitoneais da formulação comercial do Methomyl (Lannate 25), foi detectado um aumento na frequência de micronúcleos em células da medula óssea (BOLOGNESI *et al.*, 1994). Em ratos albinos machos, tratados por um período de 30 dias com o Methomyl, por via oral, foram detectados efeitos mutagênicos (EL-BENDARY *et al.*, 2014). Em culturas de linfócitos humanos, tratados com a formulação comercial do Methomyl (Lannate), trocas de cromátides irmãs foram significativamente aumentadas (BONATTI *et al.*, 1994).

Nosso estudo foi o primeiro trabalho realizado no Estado de Sergipe sobre avaliação do impacto mutagênico de agrotóxicos presentes em corpos de água temporários do Semiárido sergipano. Dados sobre o potencial genotóxico dessas águas é de extrema importância, uma vez que as alterações provocadas no DNA dos organismos que habitam esses ecossistemas ou da população humana exposta, ao longo do tempo podem causar morte celular e/ou câncer, prejudicando e comprometendo a diversidade das espécies (SPADOTO *et al.*, 2004). Além disso, a deposição continuada desses agrotóxicos no solo perpetua a presença desses no ambiente, fazendo com que eles entrem no ciclo geoquímico das áreas impactadas, e, por último, entrem em contato com a biota residente e com as populações humanas que vivem em seu entorno (DA SILVA *et al.*, 2013).

Outros estudos em campo, no Perímetro Irrigado Califórnia, devem ser feitos e integrados aos bioensaios em laboratório, pois o efeito que um agrotóxico causa sozinho ou em sinergia com outro, pode depender da concentração do químico encontrada no ambiente ou do tempo de exposição desse organismo no ambiente contaminado (DA SILVA *et al.*, 2013).

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, F.J.P.; FONSECA-GESSNER, A.A.; WATANABE, T.; LEITE, R.L. *Chironomus gr. Decorus* (Diptera: Chironomidae) e outro insetos aquáticos de um açude temporário do semi-árido paraibano, Brasil. **Entomologia Y vectores**, v.12, n.2, p. 233-242, 2005.
- ABÍLIO, F.J.P.; RUFO, T.L.M.; SOUZA, A.H.F.F.; FLORENTINO, H.S.; OLIVEIRA JUNIOR, E.T.; MEIRELES, B.N.; SANTANA, A.C.D. Macroinvertebrados Bentônicos como bioindicadores de qualidade Ambiental de corpos aquáticos da Caatinga. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.3, p.397-409, 2007.
- ANDRADE, E.V.E.; PALHAS, I.J.L.; MOURA, G.J.B. Diurnal habitat segregation by tadpoles in two temporary ponds in an Atlantic Rainforest remnant, Northeastern Brazil. **Hydrobiologia**, v. 723, p.181–194, 2014.
- ALI, D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Chemosphere**, v. 71, n.10, p. 1823-1831, 2008.
- ARCAUTE, R.C., PÉREZ-IGLESIAS, J. M., NIKOLOFF, N., NATALE, G. S., SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. **Ecological Indicators**, v.45, p.632-639, 2014.
- ARZABE, C. Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 851-864, 1999.
- BŁASIAK, J.; JAŁOSZYNSKI, P.; TRZECIAK, A.; SZYFTER, K. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 445, n. 2, p. 275-283, 1999.
- BLAUSTEIN, A.R.; JOHNSON, P.T.J. The complexity of deformed amphibians. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.1, n. 2, p. 87–94, 2003.
- BLAUSTEIN, A.R.; KATS, L.B. (2003) Amphibians in a very bad light. **Bioscience** v.53, n. 11, p. 1028–1029, 2003.
- BOONE, M. D.; BRIDGES, C. M. The effect of temperature on the potency of carbaryl for survival of tadpoles of the green frog (*Rana clamitans*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.18, p.1482–1484, 1999.
- BOONE, M. D.; SEMLITSCH, R.D. Interactions of an insecticide with larval density and predation in experimental amphibian communities. **Conservation Biology**, v. 15, p. 228–238, 2001.
- BOLOGNESI, C.; PELUSO, M.; DEGAN, P.; RABBONI, R.; MUNNIA, A.; ABBONDANDOLO, A. Genotoxic effects of the carbamate insecticide, methomyl. II. In vivo

studies with pure compound and the technical formulation, “Lannate 25”. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 24, n. 3, p. 235-242, 1994.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v.26, n.1, p. 205-213, 2011.

BONATTI, S.; BOLOGNESI, C.; DEGAN, P.; ABBONDANDOLO, A. Genotoxic effects of the carbamate insecticide methomyl. I. In vitro studies with pure compound and the technical formulation “Lannate 25”. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 23, n. 4, p. 306-311, 1994.

BURGUER, J.; FEINBERG, J.; JEITNER, C.; GOCHFELD, M.; DONIO, M.; PITTFIELD, T. Selenium: Mercury Molar Ratios in Bullfrog and Leopard Frog Tadpoles from the Northeastern United States. **EcoHealth**, V.5, N. 5 A, p. 1-10, 2014.

CALDAS, F.L.S.; DE-CARVALHO, C.B.; SANTANA, D.O.; SANTOS, R.A.; SILVA, B.D.; FARIA, R.G. Amphibia, Anura, Leiuperidae, *Physalaemus cicada* Bokermann, 1966: First records for the state of Sergipe. **Check List**, v. 6, n. 3, p. 427-428, 2010.

CALLISTO, M.; GONÇALVES JUNIOR, J.F.; MORENO, P. Invertebrados aquáticos como bioindicadores. *Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais*, v. 1, p. 1-12, 2005.

CAMPANA, M. A., PANZERI, A. M., MORENO, V. J., DULOUT, F. N. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Genetics and molecular biology**, v. 26, n. 1, p. 99-103, 2003.

CEREJEIRA, M.J.; VIANA, P.; BATISTA, S.; PEREIRA, T.; SILVA, E.; VALÉRIO, M.J.; SILVA, A.; FERREIRA, M.; SILVA-FERNANDES, A.M. Pesticides in Portuguese surface and ground Waters. **Water Research**, v. 37, p.1055–1063, 2007.

DAVIDSON, C.; SHAFFER, H. B.; JENNINGS, M. R. Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat, and pesticides hypotheses. **Ecological Applications**, v.11, p.464–479, 2001.

DINIZ, L.P.; ELMOOR-LOUREIRO, L.M.A.; ALMEIDA, V.L.S.; MELO JÚNIO, M. Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) of a temporary shallow pond in the Caatinga of Pernambuco, Brazil. **Nauplius**, v. 21, n.1, p. 65-78, 2013.

EDDLESTON, M.; STREET, J.M.; SELF, I.; THOMPSON, A.; KING, T.; WILLIAMS, N.; NAREDO, G.; DISSANAYAKE, K.; YU, L.M.; WOREK, F.; JOHN, H.; SMITH, S.; THIERMANN, H.; HARRIS, J.B.; CLUTTON, R.E. A role for solvents in the toxicity of agricultural organophosphorus pesticides. **Toxicology**, v. 294, p. 94-103, 2012.

EL-BENDARY, H. M. Biochemical effects of methomyl on experimental animals. **Applied Science Reports**, v. 1, n. 2, p. 74-78, 2014.

Environmental Protection agency (EPA), 1998. Methomyl. Disponível em:
< <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/REDs/0028red.pdf> > Acesso em 26/06/2014.

Environmental Protection agency (EPA), 2002. Chlorpyrifos Facts. Disponível em:

< http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/chlorpyrifos_fs.htm> Acesso: 04/07/2014.

Environmental Protection agency (EPA), 2007. Hexythiazox, Summary Document: Registration Review. Disponível em:

< http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/hexythiazox/hexythiazox_summary.pdf > Acesso em: 04/07/2014.

FENECH, M.; CHENG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1, p. 65-75, 2003.

FERNANDEZ, M.; HARIDON, J.L; GAUTHIER, L.; ZOLL-MOREUX, C. Amphibian micronucleus test (s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 292, n. 1, p. 83-99, 1993.

FILIZOLA, H. F., FERRACINI, V. L., SANS, L. M. A., GOMES, M. A. F., & FERREIRA, C. J. A. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaíra. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 37, n. 5, p. 659-667, 2002.

GAMA, A.F.; OLIVEIRA, A.H.; CAVALCANTE, R.M. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. **Química Nova**, v.36, n.3, p.462-467, 2013.

GARCÍA-GALÁN, M.J.; GARRIDOC, T.; FRAILEC, J.; GINEBREDAA, A.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓA, D. Simultaneous occurrence of nitrates and sulfonamide antibiotics in two ground water bodies of Catalonia (Spain). **Journal of Hydrology**, v. 383, p. 93–101, 2010.

GIRI, A.; GIRI, S.; SHARMA, G. D. Malathion and fenvalerate induce micronuclei in mouse bone marrow cells. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 52, n. 8, p. 607-613, 2011.

GOMES, C.C.S.; NETO, A.O.A. BARROS, A.C.; LIMA, C.C.V.; CUNHA, L.O. Perfil da produção agrícola no Perímetro Irrigado Califórnia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v.4, n.1, p.33-40, Jan/Mar. 2009.

GONÇALVES, M.K.; OLIVEIRA, H.H.P.; SOUSA, C.C.N.; CARVALHO, W.F.; NOMURA, F.; MACIEL, N.M.; CRUZ, A.D.; SILVA, D.M. Análises mutagênicas de anuros em áreas de mineração de níquel. **Estudos**, v.37, 9: 737-747, Goiânia, 2010.

GOSNER, K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v.16, p. 183-190, 1960.

HACH, A.C.; BLAUSTEIN, A.R. Combined Effects of UV-B, Nitrate, and Low pH Reduce the Survival and Activity Level of Larval Cascades Frogs (*Rana cascadae*). **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, p.494-499, 2000.

KOPE, K.; FILHO, N.R.A.; ALVES, M.I.R.; BASTOS, R.P. Publicações sobre efeitos de pesticidas em anfíbios no Período de 1980 a 2007. **Multiciência**, v.8, p. 173-186, 2007.

KUMAR, R.; NAGPURE, N. S.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S. K.; LAKRA, W. S. Investigation of the genotoxicity of malathion to freshwater teleost fish *Channa punctatus* (Bloch) using the micronucleus test and comet assay. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 58, n. 1, p. 123-130, 2010.

LAMERS, M.; ANYUSHEVA, M.; LA, N.; NGUYEN, V.V.; STRECK, T. Pesticide Pollution in Surface and Groundwater by Paddy Rice Cultivation: A Case Study from Northern Vietnam. **Clean-Soil Air Water**, v.39, n. 4, p.356-361, 2011.

LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA, M.; PELTZER, P. M.; STRINGHINI, G. A.; ATTADAMO, A. M. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 587, n.1, p. 67-72, 2005.

LANCTOT, C., ROBERTSON, C., NAVARRO-MARTIN, L., EDGE, C., MELVIN, S. D., HOULAHAN, J., & TRUDEAU, V. L. Effects of the glyphosate-based herbicide Roundup WeatherMaxon® metamorphosis of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) in natural wetlands. **Aquatic Toxicology**, v. 140, p. 48-57, 2013.

MEDEIROS, E.S.F.; NOIA, N.P.; ANTUNES, L.C.; MELO, T.X. Zooplankton composition in aquatic systems of semi-arid Brazil: spatial variation and implications of water management. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v.6, n.4, p. 290-302, 2011.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v. 567, p. 109–149, 2004.

PARVEEN, N.; SHADAB, G. G. H. A. Evaluation of micronuclei and haematological profiles as genotoxic assays in *Channa punctatus* exposed to malathion. **International Journal of Science Nature**, v. 2, n. 3, p. 625-631, 2011.

PELTZER, P.M.; LAJMANOVICH, R.C.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; CABAGNA, M.C.; ATTADAMO, A.M.; BASSO, A. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safet**, v.70, p. 185-197, 2008.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M, ARCAUTE, C.R.; NIKOLOFF, N.; DURY, L.; SOLONESKI, S.; NATALE, G.S.; LARRAMENDY, M.L. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 104, p. 120-126, 2014.

POSSAVATZ, J.; ZEILHOFER, P.; PINTO, A. A.; TIVES, A. L.; DE CARVALHO DORES, E. F. G. Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Revista Ambiente e água**, v.9, n.1, p. 83-96, 2014.

PLAKAS, K.V.; KARABELAS, A. J. Removal of pesticides from water by NF and RO membranes—a review. **Desalination**, v. 287, p. 255-265, 2012.

PLUTH, J. M.; NICKLAS, J. A.; O'NEILL, J. P.; ALBERTINI, R. J. (1996). Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro Malathion exposure. **Cancer research**, v. 56, n.10, p. 2393-2399, 1996.

RELYEA, R. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. **Ecological Applications**, v.15, p.1118–1124, 2005.

RIBEIRO, A. C. A.; DE CARVALHO DORES, E. F. G.; AMORIM, R. S. S.; LOURENCETTI, C. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: Validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. **Química Nova**, v.36, n. 2, p. 284-290, 2013.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; PEREIRA, C. A. B.; BECAK, W. Cytogenetic effects of malathion insecticide on somatic and germ cells of mice. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 204, n. 2, p. 283-28, 1998.

SPADOTTO, C. A., GOMES, M. A. F., LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. D. (2004). Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente. Documentos

DA SILVA, M. R.; DE CAMPOS, A. C. E.; BOHM, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n.2, p. 46-58, 2013.

SOUZA, A.H.F.F.; ABÍLIO, F.J.P. Zoobentos de duas lagoas intermitentes da caatinga paraibana e as influências do ciclo hidrológico. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.1, p. 146-164, 2006.

STEHLE, S.; KNABEL, A.; SCHULZ, R. Probabilistic risk assessment of insecticide concentrations in agricultural surface waters: a critical appraisal. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 6295-6310, 2013.

SHUGART, L.; THEODORAKIS, C. Environmental genotoxicity: probing the underlying mechanisms. **Environmental health perspectives**, v. 102, n.12, p. 13, 1994.

TABOSA, A.B.; MATIAS, L.Q.; MARTINS, F.R. Live fast and die young: The aquatic macrophyte dynamics in a temporary pool in the Brazilian semiarid region. **Aquatic Botany**, v. 102, p.71-78, 2012.

TIAN, Y.; YAMAUCHI, T. Micronucleus formation in 3-day mouse embryos associated with maternal exposure to chlorpyrifos during the early preimplantation period. **Reproductive Toxicology**, v. 17, n. 4, 401-405, 2003.

TURGUT, C. The contamination with organochlorine pesticides and heavy metals in surface water in Küçük Menderes River in Turkey, 2000–2002. **Environment International**, v. 29, p. 29–32, 2003.

WELLS, K.D. **The ecology and behavior of amphibians**. Chicago: The University of Chicago Press, 2007, 1400 p.

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecological Economics**, v. 39, p. 449 – 46, 2001.

World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking-water quality: Malathion, 2003. Disponível em:
<http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/malathionsum.pdf > Acesso em: 30/06/2014.

YIN, X.; ZHU, G.; LI, X. B.; LIU, S. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by comet assay and micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 680, n. 1, p. 2-6., 2009.

YOUNG, B.E.; S.N. STUART, J.S. CHANSON, N.A. COX BOUCHER, T.M. Disappearing jewels: The status of NewWorld amphibians. **NatureServe**, Arlington, EUA. 2004.

Capítulo II

Avaliação mutagênica de resíduos de agrotóxicos presentes em corpos de água temporários de uma área de agricultura irrigada, no semiárido sergipano, em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

RESUMO

Para aumentar a produção de alimentos, as áreas agriculturáveis estão crescendo e, conseqüentemente, diversos tipos de agrotóxicos tem sido usados em excesso nestas áreas. Grande parte dos agrotóxicos são persistentes no ambiente, dependendo da característica físico-química e da forma como são pulverizados, através do escoamento superficial e/ou da percolação no solo, podem alcançar e contaminar os recursos hídricos próximos as plantações. A contaminação das águas é muito preocupante, principalmente no semiárido nordestino, que convive com o problema da escassez de água em decorrência dos longos períodos de estiagem. O Perímetro Irrigado Califórnia, localizado no estado de Sergipe, foi criado pelo Governo Federal com o objetivo de minimizar a problemática da seca no semiárido sergipano. A irrigação possibilitou o aumento da disponibilidade de terra agriculturável e gerou mais empregos. Entretanto, nesse Perímetro já foi comprovado que culturas como a do tomate e do quiabo recebem aplicações excessivas de agrotóxicos sem que os agricultores se protejam conscientemente deles, adquirindo com o tempo problemas de saúde. A água oriunda da própria irrigação facilita a entrada dos resíduos de agrotóxicos nos corpos de água temporários presentes no meio das plantações, contaminando assim esses pequenos ecossistemas. Diante da importância Socioeconômica do Perímetro Irrigado Califórnia e da importância Ecológica dos corpos de água temporários, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possível presença de agrotóxicos com potenciais efeitos mutagênicos nas amostras de água de diferentes corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia, por meio do Teste SMART em células de asas de *D. melanogaster*. Para atingir o objetivo proposto, amostras de água de 6 diferentes corpos de água temporários (CD1, CD2, CD3, CD4, CD5 E CD6), entre as plantações de quiabo, foram coletas e levadas para o laboratório de Genética e Conservação do Recursos Naturais da UFS, onde foi realizado o Teste SMART, em células de asas de *D. melanogaster*. Observou-se aumento na frequência de manchas mutantes em células da asa de *D. melanogaster* somente para um dos corpos de água (CD5), onde não havia agrotóxicos detectados, o que nos permite concluir que há genotoxinas de diferentes fontes presentes no ambiente deste Perímetro, gerando impactos sobre a água e a biota residente, trazendo enorme risco para os agricultores e suas famílias que convivem nesse ambiente.

Palavras-chave: agrotóxicos, *Drosophila melanogaster*, corpos de água temporários.

1 INTRODUÇÃO

O uso excessivo de agrotóxicos é o resultado da baixa eficácia da aplicação destes produtos e do aumento da resistência a eles, o que pode estar relacionado ao uso indevido desses produtos químicos, como o uso em longo prazo do mesmo produto (LI *et al.*, 2014). Na tentativa de combater a resistência das pragas aos agrotóxicos, além de aumentar o número de pulverizações, os agricultores misturam vários agrotóxicos em elevadas concentrações. Por essa razão, atualmente a agricultura é considerada uma das principais fontes de contaminação, podendo causar sérios danos ao ambiente, à vida humana e selvagem (WILSON *et al.*, 2001).

Grande parte dos agrotóxicos é persistente no ambiente, dependendo da característica físico-química do produto e da forma como são pulverizados. Através do escoamento superficial e/ou da percolação no solo; podem alcançar e contaminar os corpos de água próximos às plantações, rios, lençóis freáticos e mares (SANTOS; SILVA, 2007; VON DER OHE *et al.*, 2007; BELENGUER *et al.*, 2013).

Geralmente os agrotóxicos são constituídos por uma grande variedade de compostos químicos e biológicos com características naturais biocidas, desenvolvidos exclusivamente para matar, exterminar ou regular o crescimento de seres vivos (LEITE; TORRES, 2008). Assim, além da contaminação ambiental, como determinados processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos, os agrotóxicos acabam causando efeitos nocivos em espécies não alvo, (SOUZA *et al.*, 2012; SANCHEZ-BARBUDO *et al.*, 2012; HERNANDEZ, 2013), sobretudo em humanos. Existem relatos de que a exposição a agrotóxicos, seja através do ambiente ou da alimentação, ao longo do tempo pode causar morte fetal (BELL *et al.*, 2001), suicídio dos trabalhadores rurais por auto envenenamento (GUNNEL; EDDLESTON, 2003; PIRES *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2012), câncer (ALAVANJA *et al.*, 2004; KOUTROS *et al.*, 2012; VAKONAKI *et al.*, 2013), doenças crônicas (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013), mutações (WANG; ZHAO, 2012; COLLOTA *et al.*, 2013; VAKONAKI *et al.*, 2013), além de outros efeitos indesejáveis.

De acordo com a ANVISA (2012), o Brasil atualmente é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Enquanto nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. Considerando que os recursos hídricos são os principais destinos desses compostos, a principal preocupação é a contaminação das águas,

principalmente no semiárido nordestino, que convive com o problema da escassez de água em decorrência dos longos períodos de estiagem (GAMA *et al.*, 2013).

O problema da seca dificulta a agricultura de sequeiro (que não é irrigada, dependente das chuvas) impossibilitando a sobrevivência dos pequenos agricultores. Assim, projetos de irrigação vêm sendo implantados em muitas regiões do semiárido. Geralmente esses perímetros são divididos em lotes ou áreas de cultivo distribuídas entre os pequenos agricultores, onde existe um sistema de irrigação apoiado em mananciais de grande capacidade. Apesar de beneficiar as regiões com a irrigação, gerando mais empregos e produzindo mais alimentos, nesses projetos não há uma preocupação maior com o uso racional dos recursos hídricos (SOUZA *et al.*, 2010). O conhecimento a respeito da qualidade dos recursos hídricos é de fundamental importância nas regiões agrícolas, uma vez que nestas regiões é lançada uma grande diversidade de agrotóxicos (ANDRADE *et al.*, 2011).

Na região semiárida brasileira, a maior parte dos corpos de água são temporários e além de abrigar uma grande biodiversidade de espécies, muitas vezes eles servem de recurso para a população humana (ABÍLIO *et al.*, 2007). Devido à natureza cíclica dos ambientes temporários, esses corpos de água podem conter uma biota que não é encontrada em nenhum outro tipo de habitat ou que possuem suas maiores populações nestes ambientes (WILLIAMS, 1985). Diante da enorme importância ecológica desses corpos de água, faltam estudos sobre a avaliação dos poluentes nesses ecossistemas.

O Perímetro Irrigado Califórnia (PIC), localizado no estado de Sergipe, entre os municípios de Canindé de São Francisco e Poço Redondo, destaca-se pela sua importância socioeconômica; foi criado pelo Governo Federal com o objetivo de minimizar a problemática da seca no semiárido sergipano. A irrigação possibilitou o aumento da disponibilidade de terra agricultável e o consequente aumento da oferta de alimentos, gerando assim mais empregos. São cultivadas várias culturas, como milho, feijão de corda, goiaba, acerola, e outras. Dentre estas, culturas como o quiabo e tomate recebem aplicações excessivas de agrotóxicos sem que os agricultores se protejam conscientemente deles, adquirindo com o tempo problemas de saúde (GOMES *et al.*, 2009). A água oriunda da própria irrigação facilita a entrada dos resíduos de agrotóxicos nos corpos de água temporários presentes no meio das plantações, contaminando assim esses pequenos ecossistemas.

Análises do potencial efeito de mutagenicidade dos agrotóxicos presentes nos corpos de água podem ajudar na avaliação do risco genético de toda a biota que habita neles e também da população humana exposta.

O Teste SMART (Somatic Mutation and Recombination Test), em *D. melanogaster* (GRAF *et al.*, 1984), já provou ser uma excelente ferramenta para a avaliação do potencial genotóxico de determinadas substâncias como o extrato aquoso de própolis (VALADARES, *et al.*, 2004), agrotóxicos (OSABA *et al.*, 2002; KAYA *et al.*, 2004; FRAGIORGE *et al.*, 2008), além de amostras ambientais de diferentes localidades (PANTALEÃO *et al.*, 2007; PIMENTA *et al.*, 2008; ASKIN; INCEKARA, 2010; JACOCIUNAS *et al.*; 2010).

Diante da importância Socioeconômica do Perímetro Irrigado Califórnia e da importância Ecológica dos corpos de água temporários, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos mutagênicos de amostras de água de diferentes corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia por meio do Teste SMART em células de asa de *D. melanogaster*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área de estudo e locais de coleta das amostras de água.

A área escolhida para o presente estudo foi o PIC (9°44'S /37°51° O) , localizado no município de Canindé de São Francisco, extremo noroeste do Estado de Sergipe, alto sertão sergipano. Possui uma área de 3.980 ha, com 333 lotes, sendo 272 irrigados e 61 de sequeiro, dependentes de chuva para a produção. As culturas predominantes do PIC são milho, feijão de corda, goiaba, quiabo e tomate. Nas áreas irrigadas é utilizada a tecnologia de irrigação por microaspersão cujo sistema é abastecido com água captada diretamente do Rio São Francisco (AMORIM *et al.*, 2010). O PIC a algum tempo vem sofrendo impactos decorrentes da poluição ambiental antropogênica, conferida, principalmente pelo uso excessivo de agrotóxicos nas culturas (GOMES *et al.*, 2009).

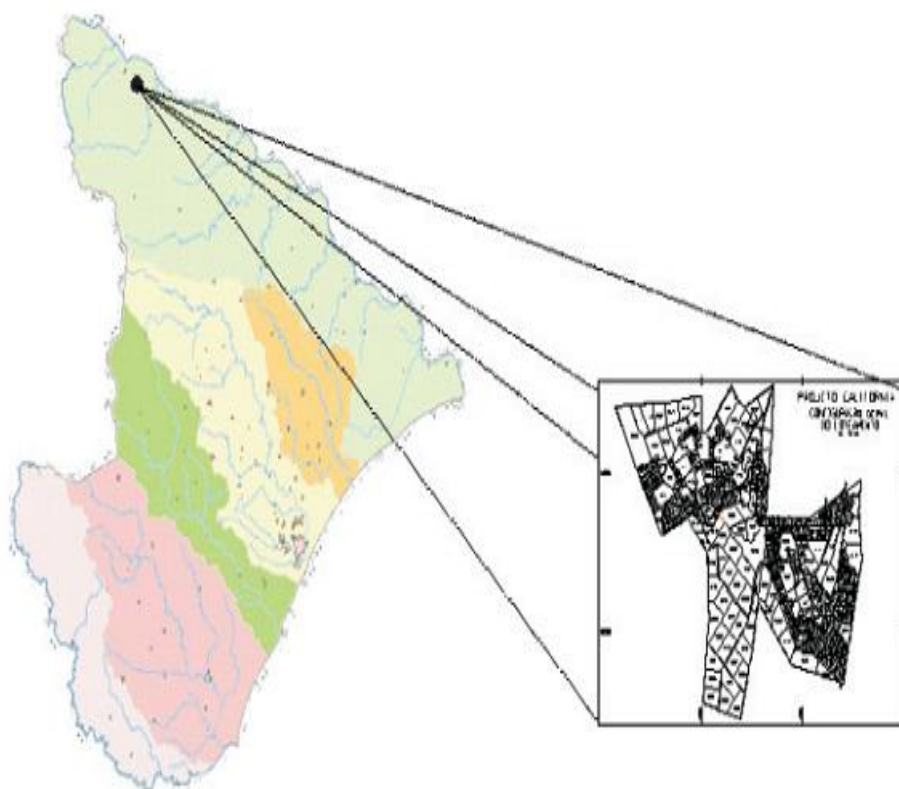


Figura 1. Localização do Perímetro Irrigado Califórnia em Canindé de São Francisco, Sergipe. Fonte: AMORIM et al., 2010.

Foram coletadas amostras de água em 6 diferentes corpos de água temporários naturais que apresentam acúmulo de água proveniente das chuvas, ou da irrigação, podendo secar no período de estiagem (CD1, CD2, CD3, CD4, CD5 E CD6), localizados entre as plantações. As coletas foram realizadas nos meses de Agosto de 2013, Março e Abril de 2014. Foram avaliadas amostras de 2 locais por mês de coleta. As amostras foram levadas para o Laboratório de Genética e Conservação dos Recursos Naturais da Universidade Federal de Sergipe e preservadas numa temperatura de -20°C , segundo a metodologia de VARGAS *et al.*, (1993), até a realização dos experimentos.



Figura 2. Pontos de coleta de água no Perímetro Irrigado Califórnia.

2.2 Análise de resíduos de agrotóxicos

Resíduos de agrotóxicos (Lista de agrotóxicos analisados em anexo), foram analisados em todas as amostras de água coletadas no PIC, através do método Multirésíduo LC-MS/MS e/ou CG-MS/MS. Para estas análises, 2L de água foram obtidos de cada corpo de água, armazenados em vidro âmbar e levado para o laboratório em um prazo máximo de 24 horas após a coleta. Algumas amostras foram analisadas no Laboratório de Estudos Ambientais (LEA), do Instituto de Tecnologia e Pesquisa de Sergipe (ITP) e outras no Laboratório de análises de Resíduos de agrotóxicos do Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP).

2.3 Teste para detecção de mutação e Recombinação Somática (SMART)

2.3.1 Obtenção de Larvas e Tratamento

As linhagens mutantes de *D. Melanogaster*, mwh (*mwh/mwh*), flare-3 (*flr³/In(3LR)TM3*, *rip^p sep l(3)89Aabx^{34e}* e *Bd^S*) e ORR; flare-3 (*ORR/ORR*; *flr³/In(3LR)TM3*, *rip^p sep l(3)89Aabx^{34e}* e *Bd^S*) foram mantidas em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura para *Drosophila* (820 mL de água, 25 g de fermento biológico, 11 g de ágar, 150 g de banana e 1 g de nipagin).



Figura 3. Frascos de vidro contendo meio de cultura para *D. Melanogaster*. Arquivo pessoal.

Para a avaliação da atividade genotóxica das amostras de água coletadas no Perímetro Irrigado Califórnia foram feitos dois diferentes cruzamentos: o cruzamento padrão - ST (fêmeas virgens flare-3 cruzadas com machos mwh), de acordo com o protocolo seguido por Graf *et al* (1989), e o cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica - HB (fêmeas virgens ORR; flare-3 cruzadas com machos mwh) (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

Os ovos foram coletados durante um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento suplementado com sacarose. Após 72 +/- 4 h, larvas de 3º estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina.

Grupos com cerca de 100 larvas foram transferidos para frascos de vidro de 25 mL, contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batatas, Yoki®) hidratados com 5 mL das amostras de água. Nas coletas dos meses de Agosto de 2013 e Março de 2014, os experimentos foram feitos com as amostras na concentração de 100%. Na coleta do mês de Abril de 2014, devido a morte das larvas do tratamento do mês de Março, os experimentos foram feitos com as amostras em 4 diferentes concentrações (100%, 50%, 25% e 12,5%). Para o controle positivo de todo o experimento foi usado Uretano (10 mM), para o controle

negativo e para a diluição das amostras foi usada água ultra pura. O Tratamento crônico durou aproximadamente 48 horas.

Por meio deste procedimento experimental, as células dos discos imaginais que irão originar as asas dos adultos ficam expostas às amostras ambientais por 5 a 6 ciclos mitóticos, correspondendo a 95% de todas as divisões celulares que ocorrem desde o início do desenvolvimento de *D. melanogaster* até o estágio de pupa (FREI *et al.*, 1992).

2.3.2 Preparação das lâminas e análise do material

Moscas adultas emergentes dos cruzamentos ST e HB, portadoras dos genótipos trans-heterozigotos marcados – MH (*mwh +/+flr³*) e heterozigotos balanceados – BH (*mwh +/+TM3, Bd^S*), foram coletadas e conservadas em etanol 70%. É possível distinguir os indivíduos MH dos BH fenotipicamente, uma vez que os indivíduos portadores do marcador *Bd^S* (presente nos descendentes BH), durante o período da metamorfose, adquirem um recorte na borda das asas apresentando, assim, asas com aspecto serrilhado, ao passo que adultos MH possuem asas de aspecto liso (GRAF *et al.*, 1984).

Posteriormente, as asas das moscas MH, foram extraídas com auxílio de pinças entomológicas e estendidas sobre as lâminas, fixadas com solução de faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada) e cobertas com lamínulas. Após a secagem, as lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio óptico de luz, marca Olympus®, com aumento de 400x. Para cada tratamento foram analisadas asas de 30 indivíduos (15 de cada sexo). Foram registrados o número, tipo e tamanho das manchas mutantes.

2.4 Análise Estatística dos dados

Os dados foram avaliados de acordo com o procedimento descrito por Frei; Wügler (1988). As frequências de cada tipo de clones mutantes por indivíduo foram comparadas com as séries do controle negativo usando o teste binomial condicional de Kastenbaum; Bowman (1970), com nível de significância fixado em $\alpha=\beta=0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O despejo de substâncias químicas contaminantes no meio aquático tem o potencial de perturbar a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas naturais (VANZELLA *et al.*, 2007). Dentre as diversas fontes de poluição das águas, os agrotóxicos lançados nos ecossistemas por meio das atividades agrícolas e urbanas, são considerados os contaminantes mais perigosos para o ambiente, uma vez que são tóxicos, persistentes, capazes de bioacumular e ainda participar de diversos processos físicos, químicos e biológicos (KOUZAYHA *et al.*, 2012). Geralmente, 0,1 % da quantidade total de agrotóxicos pulverizados atinge o organismo alvo enquanto o restante, 99,9%, tem potencial para se mover para outros compartimentos ambientais, como os ecossistemas aquáticos superficiais e subterrâneos (LANCHOTT *et al.*, 2000).

Neste trabalho foi avaliado o potencial genotóxico de 6 diferentes corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia, por meio do teste SMART. Este local foi escolhido por ser uma região agrícola onde são pulverizados agrotóxicos constantemente (PINHEIRO; DÓREA, 2003) e os resíduos destes, através do escoamento superficial, podem atingir os corpos de água temporários localizados perto das plantações. Para a zona Semiárida, estes corpos de água são de fundamental importância para a sobrevivência da biota que habita neles, e, devido à seca, muitas vezes eles servem de recurso para a população humana.

As Tabelas 1 e 2 resumem os resultados obtidos das análises dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) dos cruzamentos ST e HB, tratados com as amostras ambientais provenientes dos corpos de água temporários 1,2,5 e 6 e seus respectivos controles positivo (Uretano 10mM). Na tabela 3 estão representados os resultados das análises químicas das amostras de água.

O resultado das frequências de manchas mutantes (simples pequenas, simples grandes e gêmeas), das amostras de água coletadas em Agosto de 2013, provenientes do cruzamento ST e HB, dos corpos de água 1, 2, foram estatisticamente não significativos ou inconclusivos ($\alpha > 0,05$), quando comparados com as frequências de manchas mutantes observadas em seus respectivos controles negativos (Tab1 e 2). A varredura de agrotóxicos não detectou a presença de agrotóxicos na água de nenhum dos dois corpos de água, o limite de detecção foi abaixo de 0,03 (LQ $< 0,03$) (Tab. 3).

Provavelmente esses ecossistemas não foram contaminados com agrotóxicos ou se foram, com o tempo decorrido as substâncias químicas podem ter sido degradadas ou volatilizadas no ambiente. De acordo com Tomita; Beyruth (2002), a partir do momento que o

agrotóxico chega à água, dependendo da característica físico-química do produto, o resíduo pode se ligar ao material particulado em suspensão, se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos, correndo o risco de serem detoxicados ou acumulados. Existe também a possibilidade de alguns agrotóxicos retornarem à atmosfera através da volatilização.

As amostras ambientais dos corpos de água 3 (CD3) e 4 (CD4), coletadas no mês de Março de 2014, apresentaram potencial altamente tóxico para as larvas de *D. melanogaster*, uma vez que todas as larvas morreram no primeiro dia de tratamento.

No corpo de água 3 foram detectados os agrotóxicos Malathion e Chlorpyrifos e no corpo de água 4, o Methomyl, Hexythiazox e Pyrimethanil (Tab. 3)

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2014), o Malathion, o Clorpyrifos e o Methomyl, são inseticidas das classes toxicológicas III (medianamente tóxico), II (tóxico) e I (muito tóxico), respectivamente. O Hexythiazox é um acaricida e o Pyrimethanil um fungicida, ambos pertencentes à classificação toxicológica III.

Devido a morte de todas as larvas dos tratamentos do mês de Março de 2014, para a avaliação do potencial mutagênico dos agrotóxicos presentes nas amostras de água dos corpos de água 5 e 6, coletadas no mês de Abril de 2014, os tratamentos foram feitos com as amostras ambientais puras (100%) e nas concentrações de 50%, 25% e 12,5%, diluídas com água ultrapura.

Nos tratamentos realizados com a amostra ambiental do corpo de água 5 e suas diluições, todas as larvas sobreviveram, e o resultado foi significativo para a concentração de 25% do cruzamento ST, quando comparada ao controle negativo. Na amostra pura e nas demais diluições os resultados foram estatisticamente não significativos ou inconclusivos ($\alpha > 0,05$) (Tab. 1). Na análise química desta água não foi detectada a presença de nenhum agrotóxico, Limite de detecção $< 0,03$ (LQ $< 0,03$) (Tab. 3).

Embora não tenha sido detectada a presença de nenhum resíduo de agrotóxico no corpo de água 5 (Tab. 3), o resultado deu positivo para a concentração de 25% do tratamento ST. Considerando que só foram investigados no presente estudo agrotóxicos presentes na área estudada, qualquer outro composto, como fertilizantes ou metais pesados podem ter gerado a resposta genotóxica.

Nos tratamentos realizados com a amostra ambiental do corpo de água 6 e suas diluições, só sobreviveram as larvas provenientes do cruzamento HB, na diluição de 12,5% e as demais larvas morreram no primeiro dia do tratamento. O resultado do Teste SMART com

as moscas sobreviventes foi estatisticamente não significativo ou inconclusivo ($\alpha > 0,05$) (Tab. 2). Foi detectado na amostra de água deste corpo de água o inseticida Methomyl (Tab 3).

Os adultos que emergiram provenientes do cruzamento HB, do tratamento com a diluição de 12,5 % da amostra ambiental do corpo de água 6 (CD6), sobreviveram por que conseguiram metabolizar o Methomyl na menor concentração presente na água. Ainda que tenha sido comprovado que o Methomyl tenha efeitos mutagênicos (BOLOGNESI *et al.*, 1994; GUANGGANG *et al.*, 2013; EL-BENDARY *et al.*, 2014), os resultados mostram que a quantidade de agrotóxico presente na amostra de água não foi suficiente para gerar a resposta mutagênica.

Neste trabalho foi observado que, em todos os experimentos, na presença de agrotóxicos nas amostras de água dos Corpos de água temporários do PIC, a alta toxicidade matou todas ou a maioria das larvas. No entanto, quando nas menores diluições, houve sobrevivência e não foi detectada a mutagenicidade. Os resultados demonstram a necessidade de estudos mais abrangentes, como a realização de bioensaios que possam determinar a dose necessária para gerar a resposta mutagênica nos organismos testados. Estes devem incluir a investigação de agrotóxicos e também outros possíveis contaminantes presentes nas áreas irrigadas. Os dados gerados serão de grande utilidade para a avaliação de efeitos destes na biota residente e na população humana que utiliza os recursos do PIC.

REFERÊNCIAS

ABÍLIO, F.J.P.; RUFO, T.L.M.; SOUZA, A.H.F.F.; FLORENTINO, H.S.; OLIVEIRA JUNIOR, E.T.; MEIRELES, B.N.; SANTANA, A.C.D. Macroinvertebrados Bentônicos como bioindicadores de qualidade Ambiental de corpos aquáticos da Caatinga. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.3, p.397-409, 2007.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografias de agrotóxicos. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>> Acesso em: 05/07/2014.

AMORIM, J.R.A.; CRUZ, M.A.S.; RESENDE, R.R.; BASSOI, L.H.; FILHO, J.G.S. **Espacialização da Porcentagem de Sódio Trocável do Solo no Perímetro Irrigado Califórnia, em Canindé de São Francisco, Sergipe**. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2010.

ANDRADE, A.S.; QUEIROZ, V.T.; LIMA, D.T.; DRUMOND, C.D. Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em municípios do Alto Parnaíba-MG. **Química Nova**, v.34, n.7, p.1129-1135, 2011.

ANVISA. Agencia Nacional de vigilância Sanitária. Seminário volta a discutir mercado de agrotóxicos em 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrotoxicos+em+2012>> Acesso em: 15/06/2014.

ALAVANJA, M.C.R.; HOPPIN, J. A.; KAMEL, F. Health Effects of Chronic Pesticide Exposure: Cancer and Neurotoxicity. **Annual Review Public Health**, v. 25, p. 155-197, 2004.

ASKIN, H.; INCEKARA, U. The Study of the Genotoxic Effect of the Karasu River Surface Water Containing Local Fat Plant Waste Water on the Drosophila melanogaster Using the Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). **Ekoloji**, v. 19, n. 74, p. 45-50, 2010.

BELenguER, V.; MARTINEZ-CAPEL, F.; MASIÁB, A.; PICÓ, Y. Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (Eastern Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 265, p. 271– 279, 2014.

BELL, E.M.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; BEAUMONT, J.J. A Case-Control Study of Pesticides and Fetal Death Due to Congenital Anomalies. **Epidemiology**, v.12, n.2, p. 148-156, March. 2001.

BOLOGNESI, C.; PELUSO, M.; DEGAN, P.; RABBONI, R.; MUNNIA, A.; ABBONDANDOLO, A. Genotoxic effects of the carbamate insecticide, methomyl. II. In vivo

studies with pure compound and the technical formulation, "lannate 25". **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 24, n. 3, p. 235-242, 1994.

CHANG, S.S.; LU, T.H.; STERNE, J.A.C.; EDDLESTON, M.; LIN, J.J.; GUNNELL, D. The impact of pesticide suicide on the geographic distribution of suicide in Taiwan: a spatial analysis. **Biomed Central Public Health**, v.12, p. n.260, p. 1-10, 2012.

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

EL-BENDARY, H. M. Biochemical effects of methomyl on experimental animals. **Applied Science Reports**, v. 1, n. 2, p. 74-78, 2014.

FRAGIORGE, E. J.; REZENDE, A.A.A.; GRAF, U.; SPANO, M.A. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 393–401, 2008.

FREI, H.; CLEMENTS, J.; HOWE, D.; WÜRGLER, F.E. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 279, n.1, p. 21-33, 1992.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, n. 4, p. 297–308, 1998.

GAMA, A.F.; OLIVEIRA, A.H.B.; CAVALCANTE, R.M. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação Química dos Recursos Hídricos no Semiárido cearense. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p.462-467, 2013.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, n. 2, p. 153-188, 1984.

GRAF, U.; Frei, H.; Kägi, A.; Katz, A.J.; Wurgler, F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v. 222, n. 4, p. 359–373, 1989.

GRAF, U., VAN SCHAIK, N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 271, n. 1, p. 59–67, 1992.

GOMES, C.C.S.; NETO, A.O.A.; BARROS, A.C.; LIMA, C.C.V.; CUNHA, L.O. Perfil da produção agrícola no Perímetro Irrigado Califórnia-SE. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.4, n.1, p. 33-40, 2009.

GUANGGANG, X.; DIQIU, L.; JIANZHONG, Y.; JINGMIN, G.; HUIFENG, Z.; MINGAN, S.; LIMING, T. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 352-358, 2013.

GUNNELL, D.; EDDLESTON, M. Suicide by intentional ingestion of pesticides: a continuing tragedy in developing countries. **International Journal of Epidemiology**, v. 32, n. 6, p. 902-909, 2003.

HERNANDEZ, A.F.; PARRÓN, T.; TSATSAKIS, A.M.; REQUENA, M.; ALARCÓN, R.; LÓPEZ-GUARNIDO, O. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. **Toxicology**, v. 307, p. 136-145, 2013.

JACOCIUNAS, L.V.; DIHL, R.R.; LEHMANN, M.; REGULY, M.L.; ANDRADE, H.H.R. Recombinagenic activity of water and sediment from Sinos River and Araçá and Garças Streams (Canoas, Brazil), in the *Drosophila* wing spot test. **Science of the Total Environment**, v. 408, p.571-577, 2010.

KASTENBAUM, M.A.; BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v. 9, p. 527–549, 1970.

KAYA, B.; MARCOS, R.; YANIKOGLU, A.; CREUSB, A. Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 393–401, 2004.

KOUTROS, S.; FREEMAN, L.E.B.; LUBIN, J.H.; HELTSHE, S.L.; ANDREOTTI, G.; BARRY, K.H.; DELLAVALLE, C.T.; HOPPIN, J.A.; SANDLER, D.P.; LYNCH, C.F.; BLAIR, A.; ALAVANJA, M.C.R. Risk of Total and Aggressive Prostate Cancer and Pesticide Use in the Agricultural Health Study. **American Journal of Epidemiology**, v.177, n. 1, Nov. 2012.

KOUZAYHA, A.; RABAA, A.R.; AL ISKANDARANI, M.; BEH, D.; BUDZINSKI, H.; &JABER, F. Multiresidue Method for Determination of 67 Pesticides in Water Samples Using Solid-Phase Extraction with Centrifugation and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 257-265, 2012.

LANCHOTE, V.F.; BONATO, P.S.; CERDEIRA, A.L.; SANTOS, N.A. G.; CARVALHO, D.; GOMES, M.A. HPLC screening and GC-MS confirmation of triazine herbicides residues in drinking water from sugar cane area in Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 118, p. 329-337, 2000.

LEITE, K.C.; TORRES, M.B.R. O uso de agrotóxicos pelos trabalhadores rurais do assentamento Catingueira Baraúna-RN. **Revista verde (Mossoró – RN – Brasil)**, v. 3, n. 4, p. 06-28, 2008.

LI, H.; ZENG, E.Y.; YOU, J. Mitigating Pesticide Pollution in China Requires LawEnforcement, Farmer Training, and Technological Innovation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 5, May. 2014.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, p. 157-177, 2013.

OSABA, L.; REYA, M.J.; AGUIRREA, A.; ALONSOB, A.; GRAF, U. Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*: role of nitrosation. *Mutation Research*, v. 518, p. 95–106, 2002.

PANTALEAO, S.M. ; ALCANTARA, A.V. ; ALVES, J.P.H. ; PAVANIN, L.A. ; GRAF, U.; REZENDE, A.A.A.; VALADARES, B.L.B. ; FRAGIORGE, E.J. ; SOUSA, N. C.; GUTERRES, Z.R.; SPANÓ, M.A. Assessing the Impact of Pollution on the Japarutuba River in Brazil Using the *Drosophila* Wing Spot Test. **Environmental and Molecular Mutagenesis** , v. 48, p. 96-105, 2007.

PINHEIRO, A.S.; DÓREA, H.S. Validação de métodos por MSPD para analisa resíduos de pesticidas em acerola e quiabo por CGC/MSD. Anais: **XXII Encontro Nacional dos Estudantes de Química: UFV**, Jan. 2003.

PIMENTA, V.M.S.D.; NEPOMUCENO, J.C.; PAVANIN, L.A. Genotoxicity of water from the Paraguay River near Caceres-MT, Brazil in the *Drosophila* wing spot test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.49, p.458-466, 2008.

SANCHEZ-BARBUDO, I.S.; CAMARERO, P.R.; MATEO, R. Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. **Science of the Total Environment**, v.420, p. 280-288, 2012.

SANTOS, J.R.; SILVA, J.M. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.4, p. 565-573, 2007.

SOUZA, I.F.; DA SILVA, V.D.P.; SABINO, F.G.; NETO, A.O.A.; SILVA, B.K.; A.PV. Evapotranspiração de referência nos perímetros irrigados do Estado de Sergipe. **Revista brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 633-644, 2010.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, n.2, p. 135-142, 2002.

VAKONAKI, E.; ANDROUTSOPOULOS, V.P.; LIESIVUORI, J.; TSATSAKIS, A.M; SPANDIDOS, S.A. Pesticides and oncogenic modulation. **Toxicology**, v. 307, p. 42-45, 2013.

VALADARES, B.L.B.; NEPOMUCENO, J.C.; SPANO, M.A. Ausência de efeitos genotóxicos de um extrato aquoso de própolis (EAP) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Bioscience Journal (UFU)**, v.20, n.1, p. 123-129, 2004.

VANZELLA, T.P.; MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v. 631, n. 1, p. 36-43, 2007.

VARGAS, V.M.F.; MOTA, V.E.P.; HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research**, v. 319, n.1, p. 31-45, 1993.

VON DER OHE, P.C.; DULIO, V.; SLOBODNIK, J.; DECKERE, E.; KÜHNE, R.; EBERT, R.U.; GINEBRED, A.; COOMAN, W.; SHÜRMANN, G.; BRACK, W. A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic

microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. **Science of the Total Environment**, v.409, n.11, p. 2064-2077, May. 2011.

WANG, C. Y.; ZHAO, Z. B. Somatic mtDNA mutations in lung tissues of pesticide-exposed fruit growers. **Toxicology**, v. 291, n. 1, p. 51-55, 2012.

WILLIAMS, W.D. Biotic adaptations in temporary lentic waters, with special reference to those in semi-arid and arid regions. **Hydrobiologia**, v. 125, p. 85-110, 1985.

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecological Economics**, v. 39, p. 449 – 46, 2001.

Tabela 1. Frequência de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster*, obtidas na progênie do cruzamento padrão (ST), depois do tratamento crônico das Larvas com amostras de água coletadas em 3 corpos de água temporários (CD1, CD2, CD5) do Perímetro Irrigado Califórnia, nos meses de Agosto (2013) e Abril de 2014.

Período da Coleta	Genótipos	Tratamento	nº de moscas	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) diag. estatístico ^a				Total Manchas mwh ^c (n)
				Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	Manchas simples grande (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total de manchas <i>m</i> = 2	
Agosto (2013)	MH	Uretano	30	1,13 (34) +	0,23 (07) +	0,13 (04) i	1,50 (45) +	45
		Água ultrapura	30	0,07 (02)	0,03 (01)	0,00 (00)	0,10 (03)	3
		CD 1	30	0,00 (00)	0,07 (02) i	0,00 (00) i	0,07 (02) i	2
		CD 2	30	0,07 (02)	0,03 (01) i	0,03 (01) i	0,13 (04) i	4
Abril (2014)	MH	Uretano	30	0,87 (26) +	0,07 (02) i	0,00 (00) i	0,97 (28) +	28
		Água ultrapura	30	0,10 (03)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,10 (03)	3
		CD5 (100 %)	30	0,20 (06) i	0,07 (02) i	0,00 (00) i	0,27 (08) i	8
		CD5 (50 %)	30	0,03 (01) i	0,00 (00) i	0,03 (01) i	0,07 (02) i	2
		CD5 (25 %)	30	0,33 (10) +	0,03 (01) i	0,07 (02) i	0,43 (13) +	13
		CD5 (12,5%)	30	0,03 (01) i	0,03 (01) i	0,03 (01) i	0,10 (03) i	3

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras. ^c Considerando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

Tabela 2. Frequência de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster*, obtidas na progênie do cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), depois do tratamento crônico das Larvas com amostras de água coletadas em 4 corpos de água temporários (CD1, CD2, CD5 e CD6) do Perímetro Irrigado Califórnia, nos meses de Agosto (2013) e Abril de 2014.

Período da Coleta	Genótipos	Tratamento	nº de moscas	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) diag. estatístico ^a				Total de Manchas mwh ^c (n)
				Manchas simples pequena (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	Manchas simples grande (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total de manchas <i>m</i> = 2	
Agosto (2013)	MH	Uretano	30	0,67 (20) +	0,40 (12) +	0,30 (09) +	1,37 (41) +	41
		Água destilada	30	0,20 (06)	0,07 (02)	0,03 (01)	0,30 (09)	9
		CD 1	30	0,13 (04) i	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,13 (04) -	2
		CD 2	30	0,07 (02) -	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,07 (20) -	4
Abril (2014)	MH	Uretano	30	1,57 (47) +	0,53 (16) i	0,20 (06) i	2,10 (63) +	63
		Água destilada	30	0,23 (07)	0,00 (00)	0,07 (02)	0,30 (09)	9
		CD5 (100 %)	30	0,17 (05) i	0,10 (03) i	0,00 (00) i	0,27 (08) i	8
		CD5 (50 %)	30	0,30 (09) i	0,03 (01) i	0,00 (00) i	0,33 (10) i	10
		CD5 (25 %)	30	0,13 (04) –	0,03 (01) i	0,00 (00) i	0,17 (05) -	5
		CD5 (12,5%)	30	0, 20(06) i	0,03 (01) i	0,03 (01) i	0,27 (08) i	8
		CD6 (12,5 %)	30	0,13(04) -	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,13 (04) -	4

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras. ^c Considerando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

Tabela 3. Caracterização físico – química das amostras de água de 6 corpos de água temporários (CD1, CD2, CD3, CD4, CD5 E CD6, do Perímetro Irrigado Califórnia – SE.

Período de coleta	Local de coleta	Temperatura °C	pH	Oxigênio dissolvido mg/L	Concentração de agrotóxicos (µg/L)				
					Methomyl	Malathion	Chlorpyrifos	Hexythiazox	Pyrimethanil
Agosto (2013)	CD1	24,9	7,9	8,04	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	<0,03
	CD2	23,7	7,6	7,82	<0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	<0,03
Março (2013)	CD3	23, 8	6,7	8, 01	<0,03	0,9	0,85	<0,03	<0,03
	CD4	24,3	6,9	7, 02	2,0	<0,03	<0,03	0,28	0,12
Abril (2014)	CD5	25, 3	7,4	7,98	<0,03	<0,03	< 0,03	<0,03	<0,03
	CD6	26,1	6,3	7,49	3,8	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03

DISCUSSÃO GERAL

De um modo geral, as regiões semiáridas são caracterizadas pela deficiência hídrica com imprevisibilidade das precipitações pluviométricas, e pela presença de solos pobres em matéria orgânica. A aridez sazonal é caracterizada pelo prolongado período seco anual que eleva a temperatura local. Assim, o grau de aridez de uma região depende da quantidade de água precipitada e da temperatura que influencia a perda de água através da evapotranspiração potencial (DA SILVA, 2006).

A maior parte da região Nordeste do Brasil localiza-se dentro da zona semiárida, é conhecida como uma região seca, em que a maioria da população sobrevive da agricultura de sequeiro. O sucesso das culturas implantadas depende da regularidade e quantidade das chuvas. A precipitação pluvial pode variar consideravelmente, até mesmo dentro de alguns quilômetros de distância e em escalas de tempo diferentes, tornando as colheitas das culturas imprevisíveis. As secas periódicas causam grandes problemas para a sociedade e para os ecossistemas naturais (SILVA, 2011).

Para tentar amenizar o problema das secas e aumentar a produtividade agrícola, o Governo Federal implantou diversos Perímetros irrigados na região semiárida. Estes Perímetros constituem-se em áreas que possuem um significativo potencial agriculturável, caracterizados por solos férteis, clima favorável e abundante força de trabalho. No entanto, nos locais aonde implantaram esses Perímetros, foi imposto o modelo de produção baseado na Revolução Verde, protagonizado pelo agronegócio, caracterizando-se pelo uso intenso de insumos mecânicos e químicos, sobretudo agrotóxicos (PONTES et al., 2013). Este modelo de agricultura afeta negativamente a disponibilidade de água para o consumo humano e promove a degradação ambiental, uma vez que os efluentes agrícolas são contaminantes potentes (AUGUSTO et al., 2012).

No Estado de Sergipe, não há nenhum trabalho realizado sobre o impacto genotóxico dos agrotóxicos nos corpos de água que se formam nas áreas de agricultura irrigada, entre as plantações. Essa observação é preocupante, visto que muitos agrotóxicos tem propriedades carcinogênicas e mutagênicas comprovadas (SISMAN; TURKEZ, 2010; TLILI et al., 2010; GEORGE; SHUKLA, 2011; NOAISHI et al., 2011; REISS et al., 2012; COALOVA et al., 2013; KOUTROS et al., 2013), e esses corpos de água além de servir de recurso para a população humana, abrigam uma grande biodiversidade de organismos (ABÍLIO et al., 2007).

Do ponto de vista do risco genético para humanos e do significado ecológico para a biota aquática, a determinação da potência e a quantificação de mutágenos/carcinógenos presentes em águas de superfície é um dos mais importantes assuntos (PANTALEÃO, 2006).

O PIC foi escolhido para este estudo devido a necessidade de monitoramento sistemático na área, uma vez que já foi relatado que o uso indiscriminado de agrotóxicos no local está influenciando negativamente a saúde dos trabalhadores da área, inclusive já foram detectados resíduos de agrotóxicos nos reservatórios de água de algumas residências (PINHEIRO, 2004; GOMES et al., 2009).

Estudos realizados *in situ* são capazes de proporcionar resultados mais realísticos do que os laboratoriais pelo fato de expressarem uma situação muito mais próxima do real quando comparados aos experimentos realizados em laboratório. Através destes estudos é possível extrapolar as condições reais para o campo experimental, sendo possível simular da maneira mais próxima o ocorrido no ambiente natural (DORNFELD et al., 2006). Além do mais, a contaminação do ambiente natural ocorre de forma natural ou por ação antrópica, e o contato desses poluentes com o ambiente afeta o ecossistema como um todo, criando situações com um alto nível de complexidade e que não podem ser facilmente replicadas em laboratório (BOONE; JAMES, 2005). Em ecossistemas naturais, existe ainda a influência exercida pelos fatores abióticos e bióticos na dinâmica dos poluentes que pode interferir nos fatores como a formação de compostos secundários tóxicos e alteração do grau de toxicidade do produto (VASCONCELOS, 2014).

Foram investigadas a presença de agrotóxicos com potenciais efeitos mutagênicos nos corpos de água temporários do Perímetro Irrigado Califórnia (SE), por meio do Teste SMART em células de asas de *D. melanogaster* e do Teste do Micronúcleo em girinos de *H. creptans*. Ambos os testes já demonstraram ser confiáveis para os estudos de monitoramento de águas superficiais impactadas por poluentes de origem antropogênica (MISSINI et al., 1996; RODRIGUEZ-CEA et al., 2003; AMARAL et al., 2005; PANTALEÃO, 2006; ASKIN, H; INCEKARA, U, 2010). O presente trabalho foi realizado *in situ* e as avaliações biológicas foram integradas com análises químicas, para confirmar a eficiência do estudo. Amostras de água de todos os corpos de água estudados foram levados para o laboratório para a varredura de agrotóxicos.

As coletas de amostras d'água, para o Teste SMART, e de girinos, para o Teste do Micronúcleo, foram realizadas no PIC, nos meses de Agosto de 2013, Março e Abril de 2014.

A região semiárida brasileira é reconhecida por seu longo período cíclico de secas, e devido à escassez de chuvas no local, não foi possível coletar amostras de água e girinos nos

mesmos corpos de água em todos os meses. Assim, no mês de Agosto foram coletadas amostras de água em dois corpos de água para o Teste SMART, mas só foram encontrados girinos em um destes. As análises químicas não detectaram agrotóxicos nestes corpos d'água avaliados. O Resultado do Teste SMART foi não significativo ou inconclusivo e o resultado do Teste do Micronúcleo também não foi significativo.

Em Março foram coletadas amostras de água e girinos em dois corpos de água temporários, entretanto os girinos coletados em um deles, chegaram mortos ao laboratório. Assim, foi realizado o TMN com os girinos provenientes de um único local. Foram detectados mais de dois tipos de agrotóxicos nestas amostras e o resultado do TMN foi significativo, quando comparado ao resultado encontrado na área de referência. Em relação ao Teste SMART, não foi possível concluir o Tratamento, por que todas as larvas morreram.

No mês de Abril, houve a necessidade de realizar duas coletas, por que na primeira, não foram encontrados girinos. Assim, somente as amostras de água de dois corpos de água temporários, foram levadas para o laboratório para a realização do Teste SMART. Entre as duas amostras de água destinadas para o Teste SMART, somente em uma delas foi detectado o agrotóxico Methomyl, na outra amostra não foi detectado nenhum resíduo de agrotóxico.

No mesmo mês, após a primeira coleta, choveu durante alguns dias e como a reprodução dos anfíbios é dependente de chuvas, posteriormente foram encontrados girinos de *H. creptans* em um corpo de água. Os mesmos foram coletados para a realização do TMN. Na amostra de água do local de coleta dos girinos, foram detectados os agrotóxicos Methomyl, Malathion e Hexythiazox. O Resultado não foi significativo quando comparado a área de referência.

Nosso estudo foi o primeiro trabalho realizado no Estado de Sergipe sobre avaliação do impacto mutagênico de resíduos de agrotóxicos presentes em corpos de água temporários do Semiárido sergipano. Dados sobre o potencial mutagênico dessas águas é de extrema importância, uma vez que as alterações provocadas no DNA dos organismos que habitam esses ecossistemas ou da população humana exposta, ao longo do tempo podem causar morte celular e/ou câncer, prejudicando e comprometendo a diversidade das espécies (SPADOTO et al., 2004). Além disso, a deposição continuada desses agrotóxicos no solo perpetua a presença desses no ambiente, fazendo com que eles entrem no ciclo geoquímico das áreas impactadas, e, por último, entrem em contato com a biota residente e com as populações humanas que vivem em seu entorno (SILVA et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, F.J.P.; RUFO, T.L.M.; SOUZA, A.H.F.F.; FLORENTINO, H.S.; OLIVEIRA JUNIOR, E.T.; MEIRELES, B.N.; SANTANA, A.C.D. Macroinvertebrados Bentônicos como bioindicadores de qualidade Ambiental de corpos aquáticos da Caatinga. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.3, p.397-409, 2007.
- AUGUSTO, L. G. S.; GURGEL, I. G. D.; NETO, H. F. C.; MELO, C. H.; COSTA, A. M. O contexto global e nacional frente aos desafios do acesso adequado à água para consumo humano. **Ciência e Saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v.17, n. 6, p. 1511-1522, 2012.
- AMARAL, V.S.; DA SILVA, R. M., REGULY, M. L.; RODRIGUES DE ANDRADE, H. H. Drosophila wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 583, n.1, p. 67-74, 2005.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBUQUERQUE, C. D.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p. 61-72, 2007.
- BOONE, M.D.; JAMES, S.M. Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. **Applied Herpetology**, v. 2, n. 3, p. 231-257, 2005.
- COALOVA, I.; MENCACCI, S.; FASSIANO, A.V. Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: algo más que la suma de la Pesticide mixtures genotoxicity: More than the sum of its parts? **Acta toxicológica argentina**, v. 21, n. 1, 2013.
- DA SILVA, R.M.A. Entre o combate à seca e a convivência com o Semi-árido: Transições paragmáticas e sustentabilidade do desenvolvimento. 2006. 298p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento sustentável), Centro de Desenvolvimento sustentável da Universidade de Brasília, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- DORNFELD, C.B; ESPÍNDOLA, E.L.G.; FRACÁCIO, R.; RODRIGUES, B.K.; NOVELLI, A. Comparação de Bioensaios laboratoriais e “*In situ*” utilizando *Chironomus xanthus* na Avaliação da Toxicidade de Sedimentos do Rio Monjolinho (São Carlos, SP). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.1, n.2, p. 161-165, 2006.
- GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Pesticides and cancer: Insights into toxicoproteomic-based findings. **Journal of proteomics**, v. 74, n.12, p. 2713-2722, 2011.
- KOUTROS, S.; FREEMAN, L.E.B.; LUBIN, J.H.; HELTSHE, S.L.; ANDREOTTI, G.; BARRY, K.H.; DELLAVALLE, C.T.; HOPPIN, J.A.; SANDLER, D.P.; LYNCH, C.F.; BLAIR, A.; ALAVANJA, M.C.R. Risk of total and aggressive prostate cancer and pesticide use in the Agricultural Health Study. **American journal of epidemiology**, v. 177, n.1, p. 59-74, 2013.
- MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection

of mutagens in freshwater. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 367, n.4, p. 245-251, 1996.

NOAISHI, M.A.; MOSTAFA, M.M.A.; NAGLAA, F.E.M. Mutation Analysis of K-ras Gene in Peripheral Blood Lymphocytes of Egyptian Workers Occupationally Exposed to Multiple Pesticides. **Journal of American Science**, v. 7, n. 12, p. 1025-1030, 2011.

PANTALEÃO, S. Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água e sedimento do Rio Japaratuba (Sergipe). 2006. Tese (Doutorado em Genética), Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

PINHEIRO, A.S. Utilização de agrotóxicos no Perímetro Irrigado Califórnia e suas influências na saúde do trabalhador rural. 2004. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Núcleo de Estudos do Semiárido, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2004.

PONTES, A.G.V.; GADELHA, D.; FREITAS, M.C.; RIGOTTO, R.M.; FERREIRA, M.J.M. Irrigated perimeters as a geopolitical strategy for the development of the semi-arid region and its implications for health, labor and the environment. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 11, p. 3213-3222, 2013.

REISS, R.; JOHNSTONB, J.; TUCKER, K.; DESESSOA, J.M.; KEEN, C.L. Estimation of cancer risks and benefits associated with a potential increased consumption of fruits and vegetables. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 4421-4427, 2012.

RODRIGUEZ-CEA, A.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 56, n. 3, p. 442-448, 2003.

SILVA, V.P.R.; PEREIRA, E.R.R.; AZEVEDO, P.V.; SOUSA, F.A.; SOUSA, I.F. Análise da pluviometria e dias chuvosos na região Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.2, p.131-138, 2011.

ŞİŞMAN, T.; TÜRKEZ, H. Toxicologic evaluation of imazalil with particular reference to genotoxic and teratogenic potentials. **Toxicology and industrial health**, v. 26, n. 10, p. 641-648, 2010.

TLILI, S., JEBALI, J., BANNI, M., HAOUAS, Z., MLAYAH, A., HELAL, A. N.; BOUSSETTA, H. Multimarker approach analysis in common carp *Cyprinus carpio* sampled from three freshwater sites. **Environmental monitoring and assessment**, v.168, n. 1-4, p. 285-298, 2010.

VASCONCELOS, A.M. Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae). 2014. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

ANEXO 1. Lista dos agrotóxicos analisados nas amostras ambientais pelo método Multiresíduo LC-MS/MS e/ou CG-MS/MS

Acephate, Acetamiprid, Aldicarb, Aldicarb sulfone, Aldicarb sulfoxide, Aldrin, Allethrin, Ametryn, Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Azoxystrobin, Binfenethrin, Bioallethrin (1,2), Bitertanol, Boscalid, Bromopropylate, Bromuconazole, Buprofezin, Captan, Carbaryl, Carbendazim (Benomyl, Thiophanate-Methyl), Carbofenothion, Carbofuran, Carbosulfan, Chlordane, Chlorfenapyr, Chlorfenvinphos, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Clofentezine, Clothianidin, Cyfluthrin (1,2,3,4), Cymoxanil, Cypermethrin (1,2,3,4), Cyproconazole, Cyprodinil, Cyromazine, Dazomet, DDT total, Deltamethrin, Diazinon, Dichlofluanid, Dichlorvos, Dicofol, Dieldrin, Difenconazole (1,2), Dimethoate, Dimethomorph, Diniconazole, Disulfoton, Diuron, Dodemorph, Endosulfan alpha, Endosulfan beta, Endosulfan sulfate, Endrin, Epoxiconazole, Esfenvalerate, Ethiofencarb, Ethiofencarb sulfone, Ethiofencarb sulfoxide, Ethion, Ethoprophos, Etofenprox, Etrifos, Famoxadone, Fenamiphos, Fenarimol, Fenazaquin, Fenhexamid, Fenitrothion, Fenpropathrin, Fenpyroximate, Fenthion, Fenthion Sulfoxide, Fenvalerate, Fipronil, Fluazifop-P-butyl, Flusilazole, Flutriafol, Folpet, Fosthiazate, Furathiocarb, HCB, HCH (alpha, beta e delta), Heptachlor, Heptachlor epoxide, Hexaconazole, Imazalil, Imidacloprid, Iprodione, Iprovalicarb, Kresoxim-methyl, Lambda-cyhalothrin, Lindane, Linuron, Malaoxon, Malathion, Metalaxyl, Metconazole, Methamidophos, Methidathion, Methiocarb, Methiocarb sulfoxide, Methomyl, Mevinphos (cis and trans), Mirex, Monocrotophos, Myclobutanil, Nuarimol, Oxadixyl, Oxyfluorfen, Paclobutrazol, Paraoxon-ethyl, Parathion-ethyl, Parathion-methyl, Penconazole, Pencycuron, Permethrin (cis and trans), Phenthoate, Phorate, Phosalone, Phosmet, Pirimicarb, Pirimicarb-desmethyl, Pirimiphos-ethyl, Pirimiphos-methyl, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Propargit, Propiconazole (1 and 2), Propoxur, Pyraclostrobin, Pyrazophos, Pyridaben, Pyridaphenthion, Pyrifenoxy, Pyrimethanil, Pyriproxyfen, Quintozene, Spinosad (A and D), Spiroxamine, Tebuconazole, Tebufenpyrad, Terbufos, Tetraconazole, Tetradifon, Thiabendazole, Thiacloprid, Thiametoxam, Thiobencarb, Thiodicarb, Triadimefon, Triadimenol, Triazophos, Trichlorfon, Trifloxystrobin, Triflumizole, Trifluralin, Vamidothion, Vamidothion sulfone, Vamidothion sulfoxide, Vinclozolin.