



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós – Graduação Em Patologia Molecular

**ECOGENOTOXICOLOGIA DOS AGROTÓXICOS:
AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE ECOSSISTEMA AGRÍCOLA
E ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL**

FABIANA APARECIDA CALDART RODRIGUES

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Patologia Molecular da UnB como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor.

Brasília - DF

03/2006

FABIANA APARECIDA CALDART RODRIGUES

**ECOGENOTOXICOLOGIA DOS AGROTÓXICOS:
AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE ECOSSISTEMA AGRÍCOLA
E ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da UnB como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. César Koppe Grisólia
Instituição: Departamento de genética e morfologia- UnB.

Brasília - DF

03/2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. César Koppe Grisólia (orientador).

Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Morfologia.
Universidade de Brasília – UnB

Profa. Dra. Rosana Tidon.

Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Morfologia.
Universidade de Brasília – UnB

Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava

Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Morfologia.
Universidade de Brasília – UnB

Profa. Dra. Maria de Nazaré Klautau Guimarães Grisólia

Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Morfologia.
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Edinaldo de Castro e Silva

Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT.

Profa. Dra. Íris Ferrari (suplente)

Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética Clínica.
Universidade de Brasília - UnB

Brasília, DF, 13 de março de 2006

DEDICATÓRIA

À DEUS e à Nossa Senhora Aparecida.
Mesmo que se dê um passo apenas
pode se sentir uma razão de viver,
iluminada pela ' Esperança de Vencer '.

Ao meu esposo, Celso,
quem sempre me apoiou nessa e em outras jornadas.

A minha mãe, meu pai e minha irmã,
que mesmo distante, mantiveram-se sempre ao meu lado.

Dedico mais esta conquista, com a mais profunda admiração e respeito.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília, principalmente aos Laboratórios de Genética, de Evolução, de Pediatria e de Zoologia e a CAPES, por proporcionarem condições para realização de mais um trabalho e o incentivo à pesquisa.

Ao orientador Prof. Dr. César Koppe Grisólia e à “ex-orientadora” Dra. Iris Ferrari, pela dedicação à pesquisa, apoio no desenvolvimento do nosso trabalho e principalmente pelo incentivo e confiança.

À Banca Examinadora, da qualificação (Professores: Centeno, Nazaré e Rosana) e da defesa de tese, agradeço pelas críticas construtivas e por enriquecer nosso trabalho.

Em especial, aos professores: Eliana, Edinaldo, Roni, Carlos e Ana Maria, da UFMT, Paulo (Indea) e aos professores: Nazaré, Rosana, Guarino, Patresi, Zulmira e Silviene da UnB, agradeço a confiança de um avanço diário, a dedicação e o incentivo ao nosso trabalho e a nossa conquista, mais que professores, AMIGOS.

Aos nossos “orientadores” nos programas de estatística: Juliana, Daniela e Arthur. Agradeço por repartirem seus conhecimentos, sempre dando uma força, quando mais precisei.

Aos colegas do laboratório de evolução, Renata e Luciana, e do laboratório de Zoologia, Mariana, que recebi muita atenção.

Agradeço aos técnicos, Elisa e Ornil pela amizade, dedicação ou simples convívio ao longo desses anos.

Aos Amigos do Laboratório e da Universidade que conquistei: Lane, Neda, Haifa, Elsa, Lena. Vivemos tantas lutas juntos e delas carregamos a marca da experiência. Que a amizade seja maior que a distância.

As minhas companheiras de casa: Lia e Leila, as quais são a minha família, em Brasília.

As minhas companheiras de coleta, Sônia e Meire, ao Srs. Itor e Márcio.

Aos meus pais Víctor e Noeli, minha irmã Franciele, a Anita, César, que mesmo distante, mantiveram-se sempre ao meu lado.

Ao Celso, quem me dá a mão, ensina-me como lidar com momentos inoportunos da vida e acredita no meu potencial.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Toxicologia dos Agrotóxicos.....	1
1.2 Agrotóxicos e o Meio Ambiente.....	6
1.3 Agrotóxicos e a Agricultura.....	9
1.4 Ecogenotoxicidade.....	15
2 OBJETIVOS.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Áreas de Coleta.....	28
3.1.1 Ecossistema agrícola – Área Agrícola-Município de Campo Verde.....	31
3.1.2 Ecossistema de proteção ambiental – Área Controle-Município de Chapada dos Guimarães.....	33
3.2 Pesquisa sobre o perfil de uso dos agrotóxicos.....	34
3.3 Animais e tratamentos.....	35
3.3.1 Coleta de anfíbios para pesquisa de micronúcleos.....	35
3.3.2 Preparação das iscas e das armadilhas para coleta dos drosofilídeos.....	37
3.3.3 Coleta de drosofilídeos para a pesquisa de variabilidade genética.....	37
3.4 Preparação e análise das lâminas de micronúcleos em anfíbios.....	40
3.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – PAGE – Drosofilídeos.....	40
3.6 Análise estatística.....	42
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Levantamento dos Agrotóxicos no Município de Campo Verde.....	44
4.2 Genotoxicidade.....	52
5 DISCUSSÃO.....	57

5.1 Perfil dos Agrotóxicos no Município de Campo Verde.....	57
5.2 Genotoxicidade.....	66
5.2.1 Pesquisa de micronúcleos em anfíbios.....	66
5.2.2 Pesquisa de variabilidade genética em drosofilídeos.....	69
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
7 CONCLUSÕES.....	77
8 RECOMENDAÇÕES.....	78
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
10 ANEXOS.....	89
ANEXO 1: Dados toxicológicos envolvendo aspectos bioquímicos e provas toxicológicas para a avaliação de agrotóxicos e afins (Portaria nº 03/MS/Snvs, de 16 de janeiro de 1992).....	89
ANEXO 2: Questionário.....	91
ANEXO 3: Quantidade de ingrediente ativo (IA) comercializado no município de Campo Verde, no ano de 2001, obtida através de levantamento a partir dos receituários agrônômicos fornecidos pela professora Eliana Freire Gaspar de Carvalho Dores, do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso.....	92
ANEXO 4: Metodologias.....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA I:	Classificação quanto a toxicidade.....	3
TABELA II:	Recomendações repassadas nos rótulos das embalagens de agrotóxicos em relação ao meio ambiente.....	8
TABELA III:	Área plantada (hectares) de lavoura temporária de algodão herbáceo (em caroço) no ano de 2002, no Brasil, região Centro-oeste, Mato-Grosso e as áreas do presente estudo e as porcentagens em relação ao Brasil.....	12
TABELA IV:	Área plantada (hectares) de lavoura temporária de soja no ano de 2004, no Brasil, região Centro-oeste, Mato-Grosso e as áreas do presente estudo e as porcentagens em relação ao Brasil.....	12
TABELA V:	Área plantada (ha) por cultura, no município de Campo Verde – MT, no ano de 2001.....	13
TABELA VI:	Quantidade de Princípio Ativo (IA) e classes dos agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde–MT, no ano de 2001.....	44
TABELA VII:	Quantidade de Princípio Ativo (IA) e grupo químico dos dez agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde–MT, no ano de 2001.....	44
TABELA VIII:	Nome químico, classificação, classe toxicológica, periculosidade ambiental, grupo químico e quantidade de agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde–MT, no ano de 2001.....	45
TABELA IX:	Produto, grupo químico, classificação, classe toxicológica, PPA, cultivo e a quantidade de agrotóxicos utilizados - Fazenda Jampruca/Chapada dos Guimarães (2004).....	51
TABELA X:	Produto, grupo químico, classificação, classe toxicológica, PPA, cultivo e a quantidade de agrotóxicos utilizados – Fazenda São Francisco/Campo Verde (2004).	51
TABELA XI:	Produto, grupo químico, classificação, classe toxicológica, PPA, cultivo e a quantidade de agrotóxicos utilizados – Fazenda Felicidade/Campo Verde (2004).....	51
TABELA XII:	Número total, probabilidade, número de células analisadas, número de micronúcleos, porcentagem, média e desvio padrão das amostras de anfíbios coletadas nos ecossistemas: agrícola,	

	no município de Campo Verde e de Proteção Ambiental, Chapada dos Guimarães.....	53
TABELA XIII:	Número de indivíduos, probabilidade, frequência alélica e heterogozidade (He) da enzima α -esterase em amostras de <i>D. simulans</i> coletadas no ecossistema de proteção ambiental (controle), proximidades da Fazenda Jampruca, rio da Casca, município de Chapada dos Guimarães comparando-se com resultado das amostras do ecossistema agrícola, Fazendas Felicidade e São Francisco, município de Campo Verde.....	55
TABELA XIV:	Número de indivíduos, probabilidade, frequência alélica, e heterogozidade média da enzima α -esterase em amostras de <i>Z. indianus</i> coletadas no ecossistema de proteção ambiental (controle), proximidades da Fazenda Jampruca, rio da Casca, município de Chapada dos Guimarães comparando-se com resultado das amostras do ecossistema agrícola, Fazendas Felicidade e São Francisco, município de Campo Verde.....	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Comportamento e destino dos agrotóxicos no meio ambiente (GRISOLIA, 2005).....	8
FIGURA 2:	Esquema representando a ação da esterase sérica com substratos como o ester carboxilado (a) e organofosforados inibidores (b) (ALDRIDGE & REINER, 1972). E = esterase, OP (organofosforados).....	24
FIGURA 3:	Esquema exemplificando a atividade da esterase (E). a) Atividade normal; b) Atividade reduzida devido a ligação da enzima com organofosforados (OP).....	25
FIGURA 4:	Mapa dos municípios de Campo Verde e Chapada dos Guimarães no estado do Mato Grosso.....	29
FIGURA 5:	Locais de coleta em Chapada dos Guimarães (ecossistema de proteção ambiental: a) Rio da casca localizado às proximidades da Fazenda Jampruca) e b) região de mata da Fazenda Jampruca. Locais de coleta no município de Campo Verde (ecossistema agrícola): c) Fazenda Felicidade e d) Fazenda São Francisco (plantação de soja).....	30
FIGURA 6:	Foto da área urbana do Município de Campo Verde, ano de 2004....	31
FIGURA 7:	Fotos mostrando alguns dos interesses dos turistas no Município de Chapada dos Guimarães e abaixo o mapa com a localização do município no Brasil e em Mato Grosso (Foto: FOLHA ON LINE, 2005).....	34
FIGURA 8:	Foto destacando a espécie de anfíbio utilizada no estudo: <i>Bufo schneideri</i>	36
FIGURA 9:	Fotos destacando as armadilhas e o local onde foram colocadas: a) Rio da Casca, próximo à Fazenda Jampruca, ecossistema de proteção ambiental. b) Fazenda São Francisco e c) Fazenda Felicidade, ecossistemas agrícola.....	39
FIGURA 10:	Foto destacando as espécies de drosofilídeos estudadas: a) <i>Zaprionus indianus</i> (Foto: STEIN, TEIXEIRA & NOVO, 2005) e b) <i>Drosophila simulans</i> , fêmea a esquerda e macho a direita (Foto: myweb.uiowa.edu/ bballard/Dsimulans.htm).....	39
FIGURA 11:	Esquema da migração eletroforética dos alelos para <i>Drosophila simulans</i> . a – alelo 1.00, b – alelo 1.05, c – alelo 0.90, d – alelo 0.75.....	41

- FIGURA 12: Esquema da migração eletroforética dos alelos do loco 1 para *Zaprionus indianus*. a – alelo 1.00, b – alelo 0.94, c – alelo 0.80, d – alelo 0.75..... 42
- FIGURA 13 Foto da lâmina de células do sangue periférico de anfíbio, com coloração de acridina orange, conforme técnica de HAYASHI, *et al.*,1990. Obseçada em microscopia de fluorescência e objetiva de imersão (100x). A seta aponta a presença de um micronúcleo..... 52
- FIGURA 14: Gráfico representando os dados de genotoxicidade das amostras de anfíbios coletadas na área agrícola e na área controle. $p= 0,07$, portanto não significativo ao nível de 0,05..... 53
- FIGURA 15: a) Esquema da migração eletroforética dos alelos para *Drosophila simulans*. A – alelo 1.00, B – alelo 1.05, C – alelo 0.90, D – alelo 0.75. b) Foto e interpretação do gel de *Drosophila simulans*..... 54
- FIGURA 16: a) Esquema da migração eletroforética dos alelos do loco 1 para *Zaprionus indianus*. A – alelo 1.00, B – alelo 0.94, C – alelo 0.80, D – alelo 0.75. b) Foto e interpretação do gel de *Zaprionus indianus*..... 54
- FIGURA 17: Freqüência alélica e heterozigosidade média (H_e) da enzima α -esterase em amostras de *D. simulans* coletadas no ecossistema agrícola, Fazendas Felicidade e São Francisco, município de Campo Verde, comparadas com resultado das amostras do ecossistema de proteção ambiental, proximidades da Fazenda Jampruca, rio da Casca, município de Chapada dos Guimarães. Alelos A, B, C, D..... 55
- FIGURA 18: Freqüência alélica e heterozigosidade média (H_e) da enzima α -Esterase em amostras de *Z. indianus* coletadas no ecossistema agrícola, Fazendas Felicidade e São Francisco, município de Campo Verde, comparando-se com resultado das amostras do ecossistema de proteção ambiental, proximidades da Fazenda Jampruca, rio da Casca, município de Chapada dos Guimarães. Alelos A, B, C, D..... 56

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A. C.: Antes De Cristo

Ác.: Ácido

Andrei: Organização Andrei Editora Ltda

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Coefa: Coordenação e Manejo de Fauna e Natureza

D.: Drosophila

D. C.: Depois de Cristo

DDE: Diclorodifeniletileno

DDT : Diclorodifeniltricloreto

DEA: Desetil-Atrazina

DIA: Deisopropil-Atrazina

DNA: Ácido Desoxiribonucleico

E: Esterases

EDB: 1,2-Dibromoetano

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária

EPA: Environmental Protection Agency

ETU: Etileno-Etiluréia

Exttoxnet: Extension Toxicology Network

FAO: Food and Agriculture Organization

Gerex: Gestão e Utilização

GPS: Global Positioning Systems

ha: Hectares

He ou H: Heterozigosidade Média

HW: Hardy-Weinberg

IA: Ingrediente Ativo

Iarc: International Agency For Research On Cancer

Ibama: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

Ibge: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Indea-MT: Instituto de Defesa Agropecuária do Estado do Mato Grosso

Loael: Lowest Observed Adverse Effect Level

Mn: Número de Micronúcleos.

MT: Mato Grosso

MS: Ministério da Saúde

N: Numero Total

N^o: Número

ND: Não Determinado
NE: Não Especificado
Noael: Non-Observed Adverse Effect Level

OP: Organofosforados
OPS: Organização Pan-Americana Da Saúde
p: Probabilidade
Pahs: Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
Pcmb: Para-Cloromercuriobenzoato
PPA: Classes de Periculosidade Ambiental

Sindag: Sindicato Nacional da Industria de Defensivos Agrícolas

Tmed: N, N, N, N, Tetramethyl- Ethylenediamine

μl: Microlitros

UFMT. Universidade Federal do Mato Grosso
UNB: Univesidade de Brasília

Z.: Zaprionus

WHO: World Health Organisation

2,4 D: 2,4 Diclorofenoxiacético
2,4,5 T: 2,4,5 Triclorofenoxiacético

α: Alpha

β: Betha

—
X: Média de Mn/Indivíduos±Desvio Padrão.

RESUMO

O presente estudo traça um perfil quantitativo e qualitativo, dos principais agrotóxicos utilizados no município de Campo Verde, estado do Mato Grosso – Brasil, um ecossistema agrícola que está localizado adjacente a Chapada dos Guimarães, uma área de ecossistema de proteção ambiental. Verificou-se os agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde, no ano de 2001. Foram investigadas as freqüências de alterações cromossômicas, mediante análise de micronúcleos em sangue periférico de anfíbios (*Bufo schneideri*) e o padrão da distribuição genética da enzima α -esterase em drosofilídeos (*Drosophila simulans* e *Zaprionus indianus*), os animais foram coletados nos ecossistemas agrícola e de proteção ambiental. Os resultados mostraram que os herbicidas foram os agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde, no ano de 2001, além do uso intenso de agrotóxicos de classes I, II e III. A freqüência de células micronucleadas de 0,069% na área agrícola não diferiu estatisticamente com as dos anfíbios da área de proteção ambiental (0,013%). O ecossistema agrícola apresentou índice de heterozigosidade média menor que o da área de proteção ambiental, demonstrando sua influência na estrutura genética de comunidades de drosofilídeos.

PALAVRAS-CHAVE: MICRONUCLEOS; ESTERASE; ANFIBIOS;
DROSOFILÍDEOS.

ABSTRACT

The present study reports a quantitative and qualitative toxicological profile of the main pesticides used in the municipality of Campo Verde, Mato Grosso-Brazil, an agricultural impacted ecosystem, which is located adjacent of the Chapada dos Guimarães, a conservation site. Investigation of chromosomal aberrations, through micronuclei scoring from peripheral erythrocytes of amphibious (*Bufo schneideri*) was carried out as genotoxicity end point. Genetic variability of the *a*-esterases in drosophilidae (*Drosophila simulans* e *Zaprionus indianus*) was carried out to investigate alterations in the genetic structure of such insects in the impacted area. Animals were collected in the agricultural ecosystem and conservation site. The results showed that the herbicides were widely used in Campo Verde, followed by other classes of pesticides. The frequency of micronuclei of 0,069% found in the agricultural ecosystems was very low, not differing statistically from the conservation site of 0,013%, which could be due to a small sample size of amphibious. In the agricultural ecosystem was observed a decreased heterozygosity level in the esterase loci in both species of *Drosophila*, comparing with the National Park of Chapada dos Guimarães. Our results demonstrated that agricultural ecosystems really have an effect on genetic structure of Drosophilidae communities.

KEY-WORDS: MICRONUCLEI; ESTERASE; AMPHIBIOUS; DROSOPHILIDAE

1 INTRODUÇÃO

1.1 Toxicologia dos Agrotóxicos

Os agrotóxicos são conhecidos por diversos nomes, dentre eles, praguicidas, pesticidas, defensivos agrícolas, venenos, biocidas, mas o nome mais ético e mais adequado, no Brasil, ainda é agrotóxico. A lei federal nº 7.802, em seu artigo 2, Inciso I, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, define os agrotóxicos e afins como sendo os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, bem como em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos, considerados nocivos. Assim, substâncias e produtos podem ser empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento. Portanto, o que encontramos no ambiente é uma miscelânea de agrotóxicos e essa mistura é considerada como pesticidas, por alguns autores (PERES & MOREIRA, 2003).

Os estudos sobre os efeitos de pesticidas à saúde humana podem ser de dois tipos: 1) efeitos agudos, ou aqueles resultantes da exposição a concentrações de um ou mais agentes tóxicos capazes de causarem dano efetivo em um período de 24 horas; 2) efeitos crônicos, ou daqueles resultantes de uma exposição continuada a doses relativamente baixas de um ou mais produtos. Os efeitos agudos são os mais visíveis, que aparecem durante ou logo após o contato, como náuseas, vômitos, desmaios, convulsões, espasmos musculares, dificuldades respiratórias, já

os efeitos crônicos podem demorar semanas, meses, anos ou até mesmo gerações para aparecer, sendo mais difíceis de identificação (PERES & MOREIRA, 2003).

A toxicidade aguda é tipicamente expressa como a dose usada para matar 50% de uma população de animais em teste, que pode ser por ingestão, inalação ou em contato com a pele. Para verificar a toxicidade crônica, animais de laboratório são expostos a baixas concentrações por longos períodos de tempo. São feitas observações sobre a incidência de câncer, defeitos congênitos, mutações genéticas e outras anomalias, como danos ao fígado ou ao sistema nervoso central. Uma vez obtidos os dados toxicológicos de laboratório, esses devem ser interpretados sob condições reais de campo. O nível mais baixo derivado de todos estes testes é definido como NOAEL (“non-observed adverse effect level”), nível que não produz algum efeito adverso observável. É obtido em estudos toxicológicos, também, o LOAEL (“lowest observed adverse effect level”), que é a dose mais baixa determinada experimentalmente na qual ainda tenha sido observado algum efeito adverso (TRAUTMANN, PORTER, WAGENET, 1998 citados por DORES, 2000).

Todo produto agrotóxico é classificado quanto ao grau de toxicidade, referente aos resultados de testes ou estudos realizados em laboratórios, estabelecido pela portaria nº 03/MS/Snvs, de 16 de janeiro de 1992 da ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária), 2005 (anexo 1). O Ministério da Saúde, para as finalidades desta legislação, emite parecer quanto aos produtos técnicos, ingredientes ativos e produtos formulados e distribuídos em classes toxicológicas, conforme a tabela I (PERES & MOREIRA, 2003).

TABELA I: Classificação quanto à toxicidade.

Classificação quanto à toxicidade	
I	Extremamente tóxico
II	Altamente tóxico
III	Medianamente tóxico
IV	Pouco tóxico

Pó Fonte: Portaria nº 03/ms/snvs, de 16 de janeiro de 1992 da ANVISA, 2005.

Quanto à classificação os agrotóxicos podem ser Inseticidas, Herbicidas e Fungicidas. Quanto ao grupo químico, tem-se como os principais: os organoclorados, os piretróides, os organofosforados e os carbamatos, os quais são classificados como inseticidas; alguns carbamatos, são fungicidas, como o dietiditiocarbamato, e os derivados do ácido fenoxiacético, são herbicidas (BRASIL, 1999).

Os organoclorados têm alta capacidade de acumulação no ambiente e são usados para controle de formigas e em campanhas de saúde pública. Em sua ação tóxica compromete a transmissão do impulso nervoso central e autônomo, provocando alterações comportamentais, sensoriais, do equilíbrio, da atividade da musculatura voluntária e de centros vitais. São encontrados também em associação com outros grupos químicos, por exemplo, o Carbox: acaricida, classe toxicológica II, que é uma associação entre o Tetradifom e o Dicofol, indicado para as culturas de algodão e citros (BRASIL, 1999).

Os organoclorados penetram por via dérmica, pulmonar, gástrica e respiratória, são lipossolúveis podendo acumular-se nas células gordurosas de organismos humanos e animais (é contra-indicado o uso de leite nas intoxicações), podem ser eliminados pela urina e leite materno. Os produtos mais conhecidos são

Folidol, Tamarom, Rodiatox, Azodrim, Diazinom, Nuvacrom, DDT, Metoxiclor, Dicofol, Dieldrim, Toxafeno (BRASIL, 1999; SANTOS, 2002). Esses produtos são os responsáveis pelo maior número de intoxicação no meio rural (OLIVEIRA-SILVA, 2001). A maior parte de seus compostos são formados por carbono, hidrogênio e cloro. Podem persistir nos organismos e no ambiente por até 30 anos. Assim eles podem acumular-se ao longo da cadeia alimentar o que pode levar a biomagnificação, ou seja, ao aumento da concentração de uma determinada substância de acordo com a passagem de nível trófico (PERES & MOREIRA, 2003).

Os piretróides, segundo o Ministério da Saúde (1999), causam no homem, principalmente, irritação nos olhos, mucosas e pele. São muito utilizados em "dedetizações" de domicílios e prédios de uso público (grandes lojas, shoppings, etc.) por firmas especializadas, e têm sido responsabilizados pelo aumento de casos de alergia em adultos e crianças. A alta atividade inseticida dos piretróides, associada à seletividade que apresentam, possibilita o seu emprego em pequenas dosagens (CUNHA, 2003).

Os organofosforados foram desenvolvidos na década de 40, foram os primeiros a substituírem os representantes do grupo dos organoclorados, aos quais os insetos já apresentavam resistência. Possuem uma ampla gama de produtos agrícolas e sanitários, desde os extremamente tóxicos até aqueles com baixa toxicidade. São biodegradáveis, sendo, portanto sua persistência curta no solo, de 1 a 3 meses. Podem transformar-se em fosfatos, resultando em compostos potencialmente perigosos. Isso pode ocorrer quando os praguicidas são armazenados sob altas temperaturas (PERES & MOREIRA, 2003). Os organofosforados incluem todos os inseticidas que contêm fósforo e que surgiram da tecnologia química para produzir os "gases de nervos", utilizados na Segunda

Grande Guerra. Alguns exemplos são: clorpirifós, dimetoato, fentiona, malationa, metamidofós, parationa metilica, monocrotofós, pirimifós-metilico, tiometom e triclorfom (WARE, 1983; GARCIA, 1997).

Os organofosforados e carbamatos têm causado o maior número de intoxicações (agudas, subagudas e crônicas) e mortes no Brasil e no mundo. Esses inseticidas são inibidores das enzimas colinesterases, as quais atuam na degradação da acetilcolina, responsável pela transmissão dos impulsos do sistema nervoso (BRASIL, 1999).

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico, empregados como inseticidas (carbaril, cartape, metomil, propoxur), fungicidas (tiram), herbicidas (tiobencarbe) ou nematicidas (aldicarbe, oxamil). Esses produtos são bem absorvidos por via oral e inalatória. Sua ação leva ao acúmulo de acetilcolina nas sinapses (GARCIA, 1997; BRASIL, 1999). Os fungicidas do grupo dietilditiocarbamato (manebe, mancozebe, zinebe, ditane, tiram) são usados no Brasil principalmente na cultura do tomate, do pimentão e na fruticultura. A absorção se dá por via dérmica. Alguns desses produtos contêm manganês, o que possibilita o surgimento de sintomas de parkinsonismo e a impureza dos mesmos, chamada ETU (etileno-etiluréia) é suspeita de ser carcinogênica, teratogênica e mutagênica. A exposição intensa provoca dermatite, conjuntivite, laringite e bronquite (BRASIL, 1999; OPS, 1996).

Os herbicidas são produtos de uso crescente, por serem substitutivos de mão-de-obra. Um dos produtos usados é o Paraquate (Gramoxone), que provoca lesões hepáticas, renais e fibrose pulmonar (insuficiência respiratória e óbito). Ainda neste grupo, pode-se verificar o 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) e o 2,4,5 triclorofenoxiacético (2,4,5 T), produtos cuja mistura representa o principal

componente do agente laranja, que foi utilizado como desfolhante na guerra do Vietnã, com o nome comercial de Tordon. São absorvidos pelas três vias já citadas. O primeiro produz neurite periférica e diabetes transitória, o segundo leva a abortamentos, teratogênese, carcinogênese (está relacionado à dioxina, que aparece como uma impureza do processo de fabricação) e cloroacnes. Provocam ainda: neurite periférica retardada, lesões do Sistema Nervoso Central e lesões degenerativas - hepáticas e renais (BRASIL, 1999). Em relação aos herbicidas fenoxiacéticos foram detectados evidências de que seriam promotores de carcinogênese e causadores das infertilidades em homens, assim como os nematicidas dibromocloropropano (WHO, 1990).

1.2 Agrotóxicos e o Meio Ambiente

Os agrotóxicos são adicionados intencionalmente ao ambiente para destruir ou controlar algumas formas de vida que são consideradas indesejáveis, as chamadas pestes ou pragas, as quais representam problemas para a agropecuária tradicional e para a saúde pública. Muitos são os argumentos usados em favor do uso de pesticidas, como por exemplo: aumento de produção agrícola e de carne e leite na pecuária, diminuição das perdas de alimentos armazenados, erradicação de vetores de doenças, entre outros. Entretanto, muitas conseqüências são indesejáveis, como a fitotoxicidade, a destruição de microorganismos do solo, os efeitos prejudiciais sobre organismos não-alvo, a mortalidade de insetos benéficos e a presença de resíduos no solo, água, ar, nos tecidos vegetais e animais, em alimentos, além da contaminação ocupacional que atinge a população em geral (DORES, 2000).

Além disso, a aplicação de agrotóxicos coincide com o período mais intenso das chuvas na região do cerrado e em algumas áreas vulneráveis, onde o solo tem permeabilidade média a alta, permitindo que substâncias químicas possam contaminar águas subterrâneas. A preocupação aumenta quando essas águas são utilizadas para o consumo humano, como por meio de poços artesianos (DORES, CARBO & ABREU, 2003).

Os agrotóxicos podem contaminar a atmosfera, a água e a terra, são persistentes no meio ambiente, entram nas cadeias ecológicas e nos ciclos biogeoquímicos, atravessam continentes e provocam efeitos tóxicos adversos que atingem desde uma bactéria até o homem, como representado no esquema da figura 1. A permanência dos agrotóxicos nos diversos compartimentos (água, ar e solo) depende diretamente de variáveis oriundas do próprio composto ou da mistura, bem como a estrutura, o tamanho, a fórmula molecular e a presença de grupos funcionais. Sendo assim, é importante verificar as características físico-químicas dos contaminantes (FORGET, 1991; BUCKHART & GADNER, 1997; GRISOLIA, 2005).

A Portaria Normativa nº 139, de 21 de dezembro de 1994, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com base no Decreto nº 98.816/90, classificou os pesticidas quanto ao potencial de periculosidade ambiental, levando-se em consideração as seguintes variáveis: bioacumulação, persistência, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico. Os produtos foram classificados em I, II, III, IV, (tabela II), altamente perigoso, muito perigoso, perigoso e pouco perigoso, respectivamente (ANDREI, 1999).

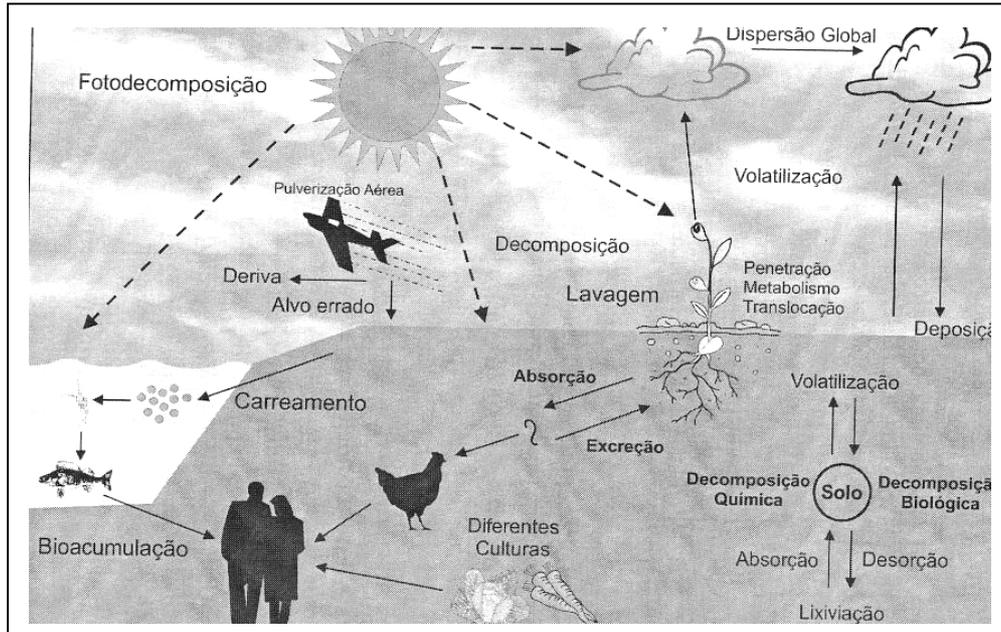


FIGURA 1: Comportamento e destino dos agrotóxicos no meio ambiente (GRISOLIA, 2005).

TABELA II: Recomendações repassadas nos rótulos das embalagens de agrotóxicos em relação ao meio ambiente.

CLASSES De Periculosidade Ambiental (PPA)	O Produto Em Relação Ao MEIO AMBIENTE É:
I	Altamente perigoso
II	Muito perigoso
III	Perigoso
IV	Pouco perigoso

Ainda, em relação à periculosidade ambiental, algumas recomendações são repassadas nos rótulos das embalagens de agrotóxicos tais como: preserve a natureza, não utilize equipamentos com vazamento; cuidados com as embalagens, aplicação aérea (não executar em áreas situadas a uma distância inferior a 500 metros de povoação e mananciais de captação de água para abastecimento público e de 250 metros de mananciais de águas, moradias isoladas, agrupamento de animais e culturas suscetíveis a danos, além de cuidados de armazenamento e em

caso de acidentes), são algumas precauções de uso e advertência quanto aos cuidados de proteção ao meio ambiente.

No Brasil, foi normatizado em 1996, o conceito de potencial de periculosidade ambiental para pesticidas e definiu-se a sua aplicação. A competência para avaliar o comportamento ambiental dos pesticidas e estabelecer suas classificações quanto ao PPA é do Ministério do Meio Ambiente, conforme definido na Lei dos Agrotóxicos (BRASIL, 1998). A divisão das classes de periculosidade ambiental baseia-se nos parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico. A periculosidade ambiental, portanto, é atribuída a características do produto que promovem contaminação e danos aos comportamentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (RIEDER, 1999).

1.3 Agrotóxicos e a Agricultura

A utilização de pesticidas é tão antiga quanto a agricultura. As civilizações grega, romana e chinesa, já conheciam, há três mil anos, a capacidade do pó de enxofre para controlar insetos e do sal para matar ervas daninhas (DELAPLANE, 2003). Historiadores atribuem ao tempo de Homero (1000 a.C. - antes de Cristo) o uso dos primeiros inseticidas, mas foi Plínio (23 – 79 d.C.– depois de Cristo) na sua história natural que registrou, pela primeira vez, a utilização dos mesmos. Nos anos seguintes, uma grande variedade de matéria foi usada com resultados questionáveis, tais como extrato de pimenta e tabaco, água com sabão, cal, vinagre, etc (DELAPLANE, 2003; SANTOS, 2002).

Desde a década de 50, quando iniciou-se a revolução verde, grandes transformações ocorreram no processo tradicional de trabalho agrícola, o que levou

ao desenvolvimento da agricultura, bem como os impactos sobre o ambiente e a saúde humana com o uso extensivo de agrotóxicos. Entretanto, essas novas facilidades não foram acompanhadas pela implementação de programas de qualificação do trabalho e de preservação do meio ambiente, expondo comunidades rurais e o ambiente a riscos ainda desconhecidos (PERES & MOREIRA, 2003).

Um documento da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) indica hoje o Brasil como um dos países que mais exageram na aplicação de pesticidas nas lavouras, principalmente a horticultura, onde se utilizam até 10 mil litros de calda (mistura de agrotóxico e água) por hectare (ALVES, 1998). De acordo com o SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas), em 2001, o Brasil consumiu 328.413 toneladas de agrotóxicos, sendo considerado em 7º. lugar em relação aos dez principais países consumidores desses produtos (ANVISA, 2002).

De acordo com NUNES (1999), o consumo de pesticidas no Brasil cresceu cerca de 44% nos últimos 10 anos. Vários fatores têm contribuído para o aumento no consumo desses produtos. Um deles é a falta de informação básica por parte dos agricultores, além da utilização de equipamentos obsoletos, que tem levado grande parte dos trabalhadores rurais a pulverizar mais veneno que o necessário. Como consequência, os casos de intoxicação e óbitos por ingestão e/ou inalação de pesticidas têm aumentado assustadoramente nos últimos 20 anos. Paralelamente, o faturamento no setor de vendas de pesticidas no nosso país sinaliza que o consumo continua em alta. Somente entre 1993 e 1997, as vendas cresceram 104%, de US\$ 1,05 bilhões para US\$ 2,161 bilhões. Apesar disso, as perdas atribuídas às pragas e doenças não sofreram uma redução drástica nesse período.

O sucesso das culturas de soja e milho em nível comercial despertou o interesse dos agricultores para outras culturas como algodão, cana-de-açúcar, milho e sorgo. Decorridas três décadas da expansão da modernização da agricultura, o estado do Mato Grosso figura como um dos principais consumidores de agrotóxicos. Os números oficiais das vendas que operam no Estado mostram que esse estado é o 4º colocado nacionalmente (SEVERINO, 2001).

O estado do Mato Grosso passou a consumir agrotóxicos em larga escala partir dos anos 70, quando o governo federal criou atraentes programas como o Polonoroeste, o Polocentro e o Proterra. A oferta de financiamentos em condições vantajosas para a compra de terras, benfeitorias e estruturas como armazéns, secadores, aquisição de equipamentos agrícolas, além da melhoria e abertura de rodovias como as BR-364 (Campo Grande - Cuiabá) e BR-163 (Cuiabá - Santarém) atraíram para o Mato Grosso agricultores paulistas, paranaenses e gaúchos, que deram início ao ciclo da mecanização agrícola na região. As culturas mais extensivas na região são a soja e o algodão (SEVERINO, 2001).

Em 2004, foram plantados, no Brasil, 1.159.677 hectares (ha) de algodão, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004), sendo que 57,9% dos hectares plantados encontram-se na região centro-oeste, dos quais o estado do Mato Grosso contribui com 40,5% e os municípios desse estado, Campo Verde (ecossistema agrícola) e Chapada dos Guimarães (ecossistema de proteção ambiental), com 5,6% e 0% respectivamente, do Brasil (Tabela III).

TABELA III - Área plantada (hectares) de lavoura temporária de algodão herbáceo (em caroço) no ano de 2004, no Brasil, região Centro-oeste, Mato-Grosso e as áreas do presente estudo e as porcentagens em relação ao Brasil.

Localidade	Hectares de Algodão Plantados em 2004	(%)
Brasil	1.159.677	100
Centro-Oeste	672.325	57,9
Mato Grosso	470.780	40,5
Campo Verde	65.671	5,6
Chapada dos Guimarães	558	0
Total = 1.159.677 ha		

Fonte: IBGE, 2004

Em relação à cultura de soja, foram plantados, no Brasil, em 2004, 21.601.340 ha, segundo dados do IBGE (2004), sendo que 45,1% dos ha plantados encontram-se na região centro-oeste, onde o estado do Mato Grosso contribui com 24,4% e os municípios desse estudo, Campo Verde e Chapada dos Guimarães com 0,7% e 0,05% respectivamente, do Brasil (Tabela IV).

TABELA IV - Área plantada (hectares) de lavoura temporária de soja no ano de 2004, no Brasil, região Centro-oeste, Mato-Grosso e as áreas do presente estudo e as porcentagens em relação ao Brasil.

Localidade	Hectares de Soja Plantados em 2004	(%)
Brasil	21.601.340	100
Centro-Oeste	9.734.271	45,1
Mato Grosso	5.279.928	24,4
Campo Verde	150.600	0,7
Chapada dos Guimarães	12.022	0,05
Total = 21.601.340 ha		

Fonte: IBGE, 2004

O município de Campo Verde localiza-se no estado do Mato Grosso, a 130 Km da capital (Cuiabá), e possui a economia baseada em diversos setores, principalmente o plantio de soja, milho, algodão. Em 2001 foram plantados 171.961 ha, onde 75 mil ha (43,6%) foram de soja, 60.416 ha (35,1%) de algodão e de 26 mil

ha (15,1%) de milho. Na tabela V observa-se a área plantada de hectare por cultura, no município de Campo Verde – MT, no ano de 2001. Campo Verde foi o maior produtor de algodão do país, chegando a uma produção de 116 mil toneladas na safra 2002/2003 (IBGE, 2004). Já em 2005, a Assessoria de imprensa da prefeitura do município de campo verde, (2006) divulgou que foram plantados 180 mil ha de soja, 70 mil de algodão e 50 mil de milho, dados que colocam o município de Campo Verde em destaque no cenário nacional.

TABELA V- Área plantada (ha) por cultura, no município de Campo Verde – MT, no ano de 2001.

Tipo de Cultura	Hectares Plantados em 2001	(%)
Abacaxi	50	0,03
Algodão	60.416	35,13
Arroz	1.500	0,87
Banana	131	0,08
Batata – doce	10	0,01
Seringa	50	0,03
Cana-de-açúcar	127	0,07
Côco	60	0,03
Feijão	1.360	0,79
Laranja	15	0,01
mamão	7	0,004
Mandioca	200	0,12
maracujá	10	0,01
Milho	26.000	15,12
Soja	75.000	43,61
Sorgo granífero	7.000	4,07
Tomate	20	0,01
Uva	5	0,003
Total de hectares plantados em 2001 = 171.961		

Fonte IBGE, 2004

Os períodos de safra em Campo Verde em 2004 foram: a) plantio do algodão: de 15 de novembro a 25 de janeiro, a safra durou 150 dias e foram plantados 62.000 há, tendo ocorrido extra oficialmente, a safrinha, no período de 25 de janeiro a 10 de março com 4.000 ha; b) o plantio da soja teve início de 1^o a 30 de

novembro; c) O milho foi plantado de 10 de outubro a 15 de fevereiro. Geralmente faz-se a rotação de culturas com a soja plantada em novembro e após a colheita da mesma planta-se o milho e também ocorre a rotação de algodão e milho ou milheto (PARO, 2004).

As culturas de soja e de algodão têm mais riscos de contaminação ambiental, devido ao amplo uso de agrotóxicos necessários (SEVERINO, 2001). Na cultura do algodão ocorre a combinação de diferentes classes de agrotóxicos, sendo esse um dos problemas mais difíceis para solucionar em relação a ecotoxicologia, tanto nos ecossistemas terrestres, como aquáticos (WALKER, 1998).

A cultura do algodão é a mais complexa com relação ao controle químico e a aplicação dos produtos fitossanitários depende das pragas existentes na lavoura. São consideradas pragas aquelas populações que podem causar prejuízos consideráveis ao agricultor com redução na quantidade e qualidade da produção. O técnico agrícola que trabalha como monitor das pragas, percorre a lavoura a cada dois dias fazendo um exame criterioso. São realizadas 15 aplicações em média para controle de 104 espécies de insetos e 20 pragas chaves, aproximadamente. As principais pragas do algodoeiro podem ser: o trepes, o pulgão, broca da raiz, da haste, curuquerê, lagarta das maçãs, cigarrinha, mosca branca, ácaros, bicudo, lagartas e percevejos (DEGRANDE, 1998).

Inicialmente planta-se o milheto ou o milho, essas gramíneas servem para o preparo do solo que posteriormente receberá as sementes de algodão. A cultura do milheto é plantada de agosto a setembro e dura até 15 dias antes do plantio do algodão. Logo após a semeadura, aplicam-se herbicidas pré-emergentes. As sementes são tratadas com inseticidas sistêmicos (carbamatos e organofosforados). Vinte dias após o plantio, aplicam-se inseticidas sistêmicos. Aos

30 e 45 dias de plantio ocorre a aplicação de inseticidas, herbicidas e reguladores de crescimento. Com 50 – 55 dias recomenda-se a pulverização de fungicidas foliares. Aos 80, 95 e 115 dias, quando são formadas as maçãs, faz-se a pulverização com piretróides (DEGRANDE, 1998).

Para o cultivo da soja realiza-se o manejo das plantas daninhas, que pode ser após a cultura de entre safra, pode ser realizado mecanicamente com a utilização de roçadeira ou rolo-faca. Outra forma seria o uso de herbicidas pré-emergentes e/ou de dessecantes de amplo espectro (controlando mono e dicotiledôneas). No mercado estão disponíveis para essa prática os produtos como o glifosato, sulfosate, 2,4-D, paraquate, paraquate + diuron, cianazina e flumioxazina. Existe a aplicação de pós-emergentes, evitando algumas plantas daninhas, como a guanxuma (*Sida* spp.). A utilização de um ou mais produtos, bem como a dose a ser utilizada, dependem das espécies, de pragas, presentes na área, do estágio de desenvolvimento e da cultura subsequente a ser implantada (BUZATTI, 1999).

1.4 Ecogenotoxicologia

A preocupação com o uso de agrotóxicos tem aumentado nos últimos anos. Sendo assim, tem havido um esforço acadêmico voltado para estudos em laboratório e no campo, onde técnicas de genética e toxicologia são aplicadas para verificar efeitos de agentes tóxicos no meio ambiente. Esse tipo de estudo caracteriza uma subdisciplina conhecida por ecogenotoxicologia, ou seja, o estudo do perfil genético de uma população e sua alteração pela exposição a poluentes ambientais mutagênicos (KLEINJANS & SCHOOTEN, 2002).

Um exemplo de estudo de ecogenotoxicologia poderia ser o programa de biomonitoramento da qualidade da água da bacia do rio Mills que abastece boa

parte da população do oeste da Carolina do Norte, USA, que utiliza a fauna de macroinvertebrados, os quais apresentaram uma diminuição drástica que foi associada com o clima úmido e conseqüentemente ao aumento do uso de pesticidas nas lavouras. Nesse caso, tanto a detecção do impacto quanto o diagnóstico foram baseados na bioavaliação das comunidades de macroinvertebrados e pelo padrão do uso da terra (PERES & MOREIRA, 2003).

Estudos sobre os efeitos das genotoxinas no DNA podem ser realizados por técnicas que incluem marcadores citogenéticos, aberrações cromossômicas, micronúcleos e mutações. O monitoramento genotóxico pode ser realizado em espécies aquáticas, bem como as terrestres (KLEINJANS & SCHOOTEN, 2002). Peixes bentônicos, por exemplo, podem servir para monitoramento de poluição do sedimento, uma associação entre a presença de contaminantes, como os PAHs (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos) e o aparecimentos de aductos de DNA (elemento químico ligado às macromoléculas de DNA) em células hepáticas (KLEINJANS & SCHOOTEN, 2002). Peixes que vivem em canais de irrigação agrícola contaminados por agrotóxicos, tornam-se resistentes a inseticidas (GRISOLIA, 2005).

Entre os efeitos mutagênicos pode-se incluir o câncer e várias outras doenças genéticas (GRISOLIA, 2005). Cerca de 70% de problemas no desenvolvimento de crianças não tem causa conhecida e alguns podem estar relacionados com a exposição a produtos químicos, cujos efeitos podem ser agravados quando combinados a fatores nutricionais ou genéticos (PERES & MOREIRA, 2003).

Com exceção dos cânceres familiares, o câncer esporádico pode apresentar mutações derivadas de exposições genotóxicas endógenas e exógenas

com formações de aductos de DNA. A probabilidade de ocorrência de mutações e a persistência dos clones podem ser influenciadas pela capacidade individual dos organismos de metabolizar e excretar substâncias tóxicas e também a eficiência no reparo dos erros ocorridos no DNA. Essa capacidade de proteção varia entre os indivíduos (PERES & MOREIRA, 2003).

Em 1997, a EPA (Environmental Protection Agency) promoveu uma conferência sobre causas de câncer em crianças. As recomendações, estabelecidas na conferência, concentraram-se em quatro áreas de pesquisa: 1) fatores de suscetibilidade; 2) fatores epidemiológicos e de risco; 3) marcadores biológicos de exposição e efeito; 4) medidas quantitativas de exposição. Estudos prévios têm sugerido uma associação entre exposição a agrotóxicos e diferentes tipos de câncer (PERES & MOREIRA, 2003). Estudos como esses servem para compreensão dos mecanismos toxicológicos relacionados ao tipo de exposição (ACQUAVELLA *et al.*, 2003) com o objetivo de avaliar alterações que precederiam o desenvolvimento do câncer (KOIFMAN & HATAGIMA, 2003). Os carcinógenos químicos são compostos eletrofílicos que atacam o núcleo de carga negativa do DNA, podendo causar mutações que, por sua vez, iniciam uma cadeia de eventos que levam ao câncer (PERES & MOREIRA, 2003).

De acordo com GRISOLIA (2005), muitos agrotóxicos em uso apresentam risco de mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade. Estes dados são obtidos de estudos em animais, bem como do próprio homem, que se expõe ocupacionalmente ou acidentalmente. A análise de micronúcleos pode ser utilizada como bioindicador de substâncias genotóxicas no meio ambiente. A avaliação do impacto do uso de agrotóxicos sobre o organismo não alvo pode ser realizada com um elenco de testes. São considerados em tais testes organismos

representativos dos principais grupos que sofrem a ação tóxica destes compostos, como por exemplo pequenos mamíferos, pássaros, microorganismos, insetos polinizadores como as abelhas e as vespas, organismos aquáticos como peixes, zooplâncton e microcrustáceos (FORGET, 1991; BUCKHART & GADNER, 1997).

Organismos vivos têm um papel significativo na distribuição de agrotóxicos, os quais podem se acumular nesses seres vivos, fenômeno conhecido como bioacumulação. Um exemplo disso é a absorção ou ingestão de pesticidas altamente insolúveis em água. Quando esse pesticida seja armazenado no organismo, seus níveis aumentam com o tempo. Se esse organismo for consumido por outro que também pode armazenar esse pesticida, os níveis podem atingir valores cada vez mais elevados em organismos de níveis tróficos superiores (EXTOXNET, 1998). Pesticidas podem penetrar nos tecidos das plantas após a aplicação direta ou por absorção pela raiz. Uma vez na planta, o composto pode ser metabolizado ou acumular-se em partes não-vivas das células vegetais. Em animais, que em geral estão expostos a pesticidas especialmente através da dieta, estas substâncias podem ser metabolizadas, distribuídas no organismo na sua forma original ou como um metabólito, acumular-se em órgãos ou tecidos específicos ou ser excretadas. Animais mortos, em decomposição, podem liberar novamente o produto para o ambiente (ESSER *et al.*, 1988).

O alto índice de acidentes com animais silvestres e domésticos em decorrência da utilização de agrotóxicos leva as instituições a aperfeiçoarem mecanismos de monitoramento e controle. A lei nº 7.802 proíbe o registro de agrotóxicos que revelem características teratogênicas, carcinogênicas, mutagênicas e que provoquem danos à reprodução e ao meio ambiente. A portaria IBAMA nº 84/96 considera que a avaliação ambiental dos agrotóxicos, seus componentes e

afins não se limita à análise de resultados de ensaios de laboratório, mas, ao contrário enfatiza a utilização de dados de campo para controle e monitoramento (BRASIL, 1998).

Por definição, genotoxicidade pode ocorrer pela presença de agentes físicos e químicos capazes de induzir mutações em células vivas. Para testar os efeitos genotóxicos são utilizados como bioindicadores para monitoramento do meio ambiente: 1. os humanos, 2. as plantas (*Tradescantia paludosa*, *Zea mays*, *Allium cepa*) e 3. os animais (Pisces, Amphibia, Reptilia, Aves). Nesses organismos são realizados vários testes. O teste do cometa consiste em análise direta das células de sangue total, quanto à frequência de danos ao DNA, verificado quando fragmentos do DNA migram do núcleo da célula e, desse modo, se obtém a informação de lesões ao DNA que ocorreram *in vivo* (RALPH & PETRAS, 1998). Outros testes são o de aberrações cromossômicas e o teste do micronúcleo (MUNHOZ *et al.*, 1987; WÜRGLER & KRAMERS 1992; BENNER *et al.*, 1994; PASTOR *et al.*, 2001) que permitem identificar um aumento na frequência de mutação em células, que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos. Micronúcleos são estruturas formadas de pedaços de cromossomos ou cromossomos inteiros que não migraram durante a telófase e esse teste tem sido utilizado há mais de dez anos para avaliar os efeitos da exposição ocupacional a vários químicos (AUGUSTO *et al.*, 1997).

Os estudos de genotoxicidade com agrotóxicos são realizados basicamente em laboratório. Entretanto, autores como BELFIORI e ANDERSON (2001) recomendam estudos *in loco* e com populações residentes, pois podem dar uma noção mais real dos efeitos ambientais dessas substâncias. Os anfíbios são modelos de populações naturais usados para estudos genotóxicos, pois essas espécies constituem um grande grupo em risco, devido às práticas agrícolas

extensivas e ao uso de insumos químicos das mais diferentes classes que alteram os ecossistemas, matando crustáceos, moluscos, e insetos, além da destruição de seus habitats naturais com as drenagens de lagoas, pântanos e brejos, conseqüentemente, afetando a sua sobrevivência (BELFIORI & ANDERSON, 2001; AURICH *et al.*, 1998).

Assim, os anfíbios são indicadores bióticos, pois sofrem os impactos direto das substâncias químicas. Os girinos são extremamente sensíveis aos agrotóxicos sulfactantes, especialmente ao Nonilfenol etoxilado, componente comum das formulações, que produz uma espécie de narcose nestes animais, alterando seus padrões de permeabilidade de membrana. Os animais ficam impossibilitados de nadar até a superfície para obter oxigênio e assim morrem por asfixia. Existem evidências de aumento das práticas agrícolas e declínio desses animais que tem um comportamento importante para ecologia e vivem parte da vida em ambiente aquático e a outra parte em ambiente terrestre (BELFIORI & ANDERSON, 2001; AURICH *et al.*, 1998).

Os anfíbios podem ser considerados indicadores biológicos, tais organismos são muito úteis devido a sua especificidade a certos tipos de impacto, já que inúmeras espécies são comprovadamente sensíveis a um tipo de poluente, mas tolerante a outros (PERES, 1999).

Além disso, diferenças interindividuais e interétnicas marcantes quanto à capacidade de metabolizar drogas e outros xenobióticos têm sido observadas em vários estudos (BOARD, 1981; NELSON *et al.*, 1995 citados por PERES, 1999).

Em mamíferos, a bioativação e desintoxicação pela via metabólica desenvolvem-se em duas fases. A reação da fase I que corresponde à ativação e absorção por meio da difusão, ou seja, à penetração do agente tóxico na pele

seguida de hidrólise, redução e oxidação. Na fase II ocorre a conjugação com glutathione, aminoácidos e metilação. Nela se verifica a distribuição para os tecidos através do sangue e nesta etapa processa-se, a biotransformação. A distribuição final depende da afinidade de muitas enzimas que são polimórficas, o que diferencia na capacidade de processar os xenobióticos (PARKINSON, 1996; GRZYBOWSKA *et al.*, 2000).

Uma das mais importantes questões da biologia evolutiva é a variação genética que existe em populações de organismos e a significância adaptativa dessa variação. Em insetos, as isoenzimas esterases, por exemplo, estão relacionadas a diversos processos metabólicos, tais como digestão de alimentos, degradação de inseticidas organofosforados e carbamatos (SPACKMAN *et al.*, 1994; RAUSCHENBACH *et al.*, 1994). Várias enzimas como as colinesterases, oxidases e glutathione-S-transferase (GSTs) desintoxicam mamíferos e insetos de inseticidas organofosforados, reduzindo as moléculas livres (TERRIERE, 1984; KALISTE-KORHONEN *et al.*, 1998 citados por SOUZA-POLEZZI & BICUDO, 2004).

A isoenzima esterase divide-se em regiões α (alpha) e β (beta). CAMPBELL *et al.*, (2003) estudaram as α -esterases em espécies de *Drosophila melanogaster*, pois nessa região há 40% da atividade enzimática e isso pode significar uma proporção adequada para visibilidade da isoenzima. OAKESHOTT *et al.* (1993) e RUSSELL *et al.* (1996) sugerem que as α -esterases interagem diretamente com substratos ambientais e dessa maneira ocorre a desintoxicação de xenobióticos. Isso foi baseado na abundância de esterases em tecidos digestivos e no desenvolvimento de resistência a organofosforados em alguns insetos.

O termo esterase engloba um conjunto de enzimas geneticamente distintas que podem desempenhar funções diversificadas em um organismo e

possuem, em comum, a propriedade de catalisar a hidrólise de ésteres. A classificação mais amplamente aceita é baseada na sua sensibilidade a três grupos de inibidores da atividade enzimática (HOLMES & MASTER, 1967 citado por OAKESHOTT *et al.*, 1993), incluindo os regentes sulfidrílicos (como exemplo o para-cloromercuriobenzoato – pCMB), os organofosforados (exemplo: malationa) e carbamatos (LAPENTA, 1998). Em insetos, estas enzimas estão relacionadas a diversos processos metabólicos, tais como digestão de alimentos, degradação de inseticidas organofosforados e carbamatos, além da degradação de ferormônios e do hormônio juvenil (SPACKMAN *et al.*, 1994; RAUSCHENBACH *et al.*, 1994).

A família das esterases (E) inclui enzimas séricas, responsáveis pela hidrólise de alguns substratos, entre eles ésters carboxilados. Nessa reação de hidrólise há a participação de enzimas intermediárias, como as do grupo acyl, que se ligam com as esterases e utilizam moléculas de água livres, completando o ciclo catalítico (figura 2a e 3a). No entanto, resíduos séricos, como os organofosforados (OP), por exemplo, reagem com as enzimas e isso pode reduzir a atividade da mesma, desse modo podem mudar a conformação tetraédrica da enzima, assim ela torna-se organofosforilada, o que resulta em baixa atividade de hidrólise, interrompendo a ligação de esterases com o grupo acyl, caracterizando o ciclo catalítico como incompleto, ou seja, não ocorrerá a hidrólise, redução e oxidação do produto tóxico, o qual poderá acumular-se no organismo (figura 2b e 3b).

As esterases são um grupo multifuncional e heterogêneo de isoenzimas, cuja atividade pode ser verificada em eletroforese em gel de poliacrilamida, método que proporciona traçar um perfil das amostras de acordo com a análise da posição das bandas na seqüência horizontal que podem representar um gráfico de pontos

com o eixo vertical. Os valores podem variar de 0 a 255 o que pode representar uma variação na expressão da enzima esterase (SOUZA-POLEZZI & BICUDO, 2004).

Estudos com a utilização de marcadores genéticos, tais como o polimorfismo de esterases, têm sido realizados para entender a dinâmica das populações dos drosofilídeos, sendo essa uma das formas de quantificar a variabilidade genética dessas populações ao longo do tempo. Alguns trabalhos com isoenzimas enfocaram estudos com membros da família Drosophilidae, como *Drosophila simulans* (KAROTAM & OAKESHOTT, 1993) e *Zaprionus indianus* (PARKASH *et al*, 1994). Essas espécies foram recentemente introduzidas e têm se disseminado com extrema versatilidade. Essas populações são destacadas como invasoras e o estudos dessas espécies permitem entender como os invasores reagem às novas condições bióticas e abióticas, e como espécies nativas reagem à invasão (SILVA *et al*. 2005).

A aplicação de técnicas de eletroforese tem revelado a existência de variações em populações naturais, na maioria dos organismos. Os achados têm gerado controvérsias quanto ao valor adaptativo dessas variações. Pesquisadores que estudam a natureza desses genes verificaram uma relação com o ambiente. Associações significativas entre as freqüências alélicas em loci de esterases e fatores ambientais têm sido descritas em alguns insetos, tais como os drosofilídeos (KOJIMA *et al.*, 1972; SCHAFFER & JOHNSON, 1974; ROCKWOOD-SLUSS, 1973; JOHNSTON & HEED, 1973; TSUNO, 1975; MULLEY, 1979; JAMES & BARKER, 1979 citados por ALBUQUERQUE & NAPP, 1981), mosquitos (SAUL *et al.*, 1978 citado por ALBUQUERQUE & NAPP, 1981) e borboletas (BURRNS & JOHNSON, 1971 citado por ALBUQUERQUE & NAPP, 1981) e a maioria dos polimorfismos

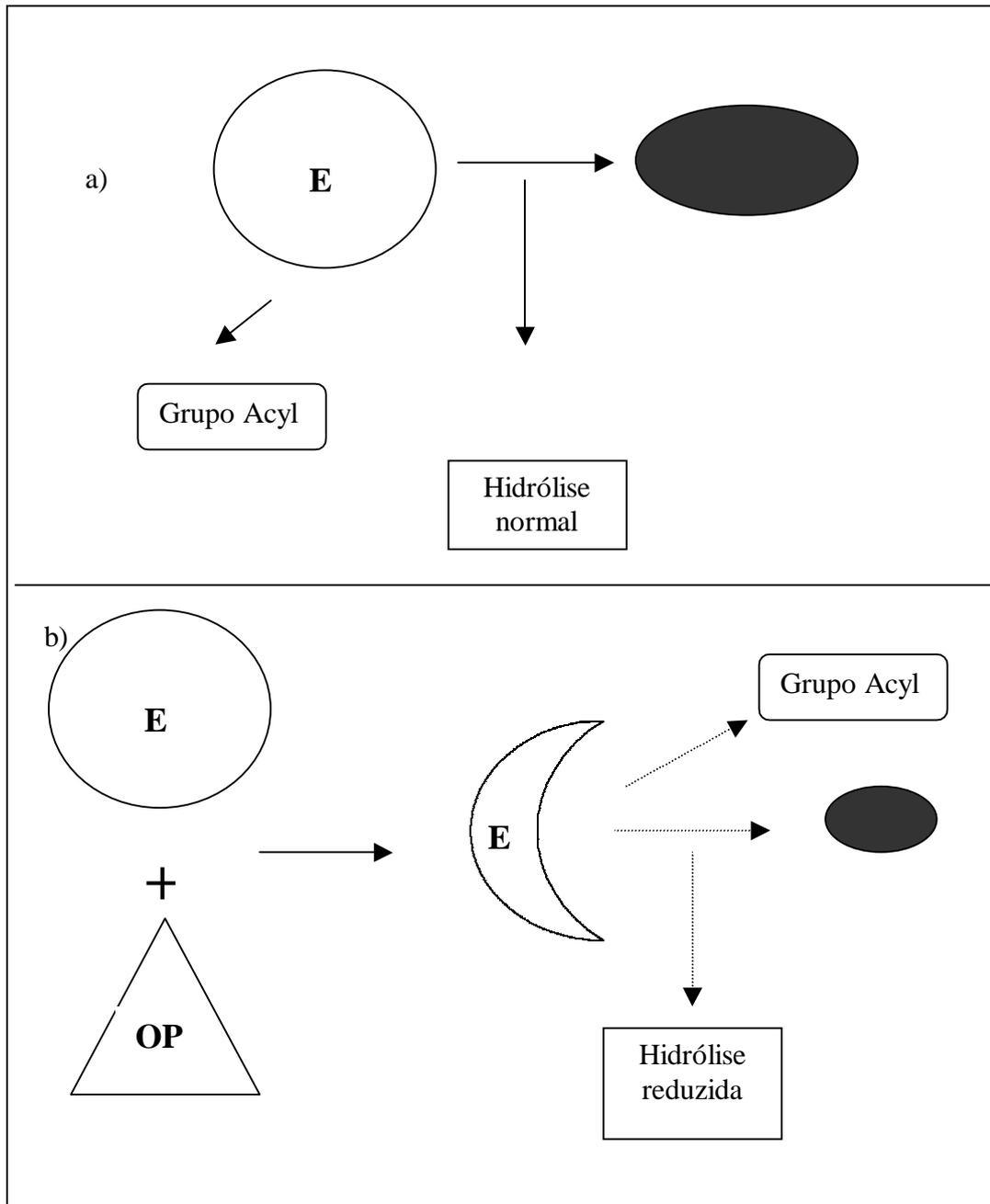


FIGURA 3: Esquema exemplificando a atividade da E, esterase. a) Atividade normal; b) Atividade reduzida devido a ligação da enzima com OP, organofosforados (modificado de ALDRIDGE & REINER, 1972).

2 OBJETIVOS

Esse estudo faz parte do Projeto: “Ecotoxicologia dos agrotóxicos na região centro-oeste (cerrados), utilizando-se como referência áreas de grande biodiversidade, ameaçadas pela contaminação química, devido a expansão das fronteiras agrícolas”. Esse projeto estuda regiões de grande biodiversidade que estejam sendo ameaçadas pela expansão das áreas agrícolas com conseqüentes queimadas, desmatamentos e contaminação ambiental pelo amplo uso de agrotóxicos. Abrange estudos nos Parques Nacionais: das Emas, Grande Sertão Veredas, Chapada dos Veadeiros, Chapada dos Guimarães

Esse projeto têm como objetivos gerais: 1) avaliar a ecotoxicologia dos agrotóxicos utilizados em áreas de expansão de fronteiras agrícolas no cerrado do Centro-Oeste; 2) investigar os níveis de contaminação por agrotóxicos nas espécies silvestres afetadas direta e indiretamente; 3) identificar as práticas agrícolas incorretas que levem a contaminação por agrotóxicos, para elaboração de um plano de diretrizes a ser enviado aos órgãos de governo institucionalmente responsáveis pela sua devida fiscalização; 4) identificar os agrotóxicos mais utilizados, para avaliação dos potenciais de mutagenicidade; 5) pesquisar e identificar as melhores espécies do cerrado, dentro de diferentes grupos, que possam servir como sentinela (bioindicadores) da toxicologia dos agrotóxicos.

Assim esse trabalho tem por objetivos:

- a) traçar o perfil do uso de agrotóxicos no município de Campo Verde – Mato Grosso, onde a base econômica é a agricultura;

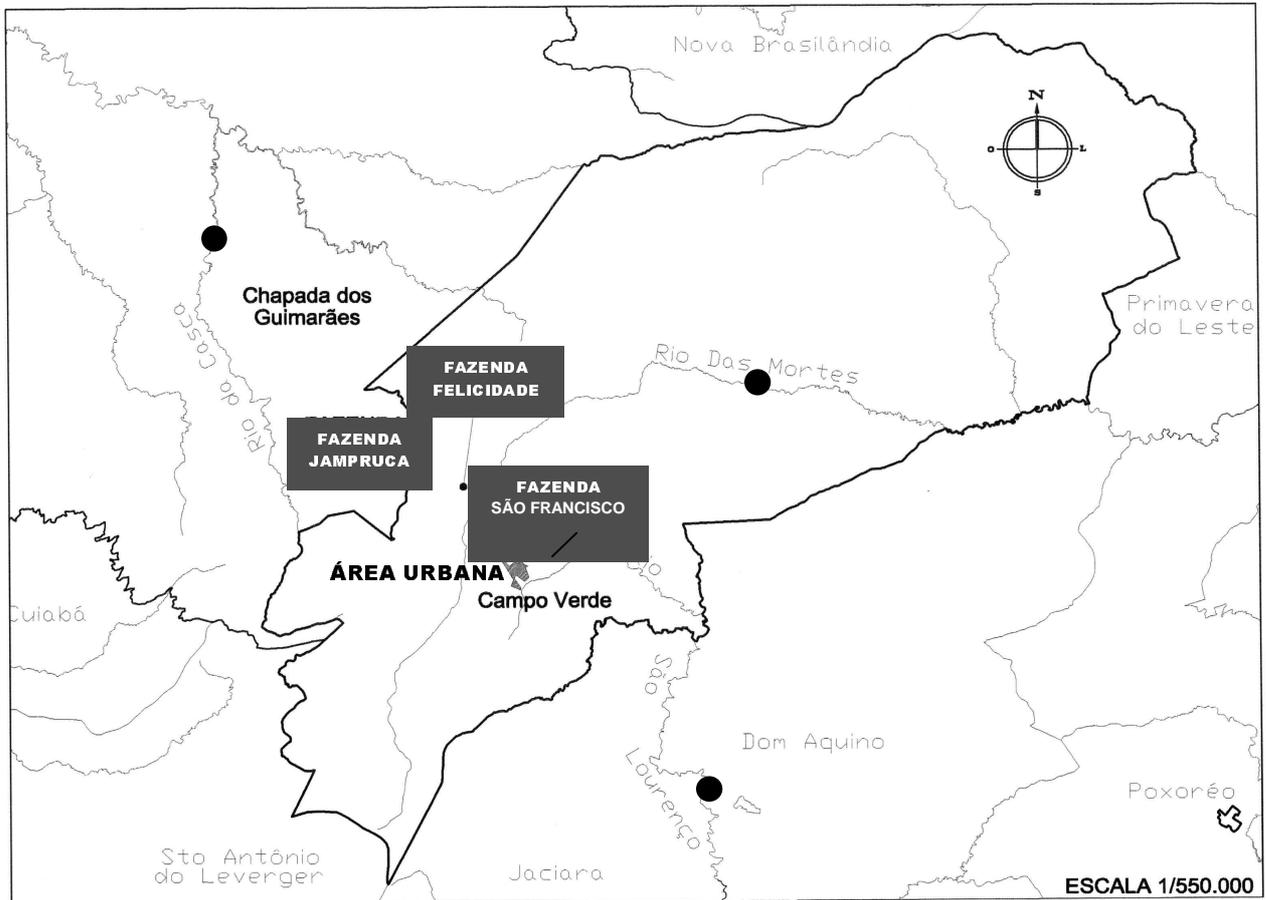
- b) analisar e comparar os resultados das freqüências de micronúcleos em sangue periférico de anfíbios da espécie *Bufo schneideri* coletados no ecossistema agrícola (município de Campo Verde - MT) com exemplares do ecossistema de proteção ambiental adjacente (município de Chapada dos Guimarães - MT);
- c) analisar e comparar a variabilidade genética de espécies de drosofilídeos: *Drosophila simulans* e *Zaprionus indianus*, em relação a enzima α -esterase, de ambos ecossistemas: agrícola e de proteção ambiental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Áreas de Coleta

Foram determinados dois ecossistemas vizinhos como áreas de estudo: Um Agrícola: município de Campo Verde – Mato Grosso, devido a sua ampla área de plantio e um de Proteção Ambiental: município de Chapada dos Guimarães, como controle, onde o plantio é restritivo, sendo esse um grande centro de conservação e preservação. Foram selecionadas duas fazendas no município de Campo Verde: a Fazenda São Francisco, que se localiza nas proximidades da área urbana e a Fazenda Felicidade, zona rural e uma fazenda em Chapada dos Guimarães: a Fazenda Jampruca, nas proximidades do rio da Casca, a 20 km da área urbana do município de Campo Verde (figura 4).

A Fazenda Jampruca, apesar de possuir uma área de plantação foi considerada como área de proteção ambiental, pois se localiza no município de Chapada dos Guimarães e está distante de outras áreas de cultivo, ou seja, as coletas na área controle foram feitas nas proximidades da área de influência do Parque Nacional, mesmo sendo em fazenda. As iscas para coletas de drosofilídeos e as coletas de anfíbios foram realizadas em áreas conservadas (de mata) da fazenda e no rio da Casca, nas proximidades da fazenda. Em relação ao ecossistema agrícola, os dados gerados das duas fazendas do município de Campo Verde foram agrupados, apesar de serem distintas em relação aos hectares plantados, pois não houve nenhuma diferença significativa quanto aos dados de genotoxicidade que foram comparados (figura 5).



■ Fazendas que serviram de coleta com o respectivo posicionamento global por satélite fuso 21 (gps): fazenda São Francisco (696214E; 8280948N), fazenda Felicidade (690267E; 8290086N), fazenda Jampruca (679345E; 8293579N).

● Rios importantes para região.

FIGURA 4 - Mapa dos municípios de Campo Verde e Chapada dos Guimarães no estado do Mato Grosso.

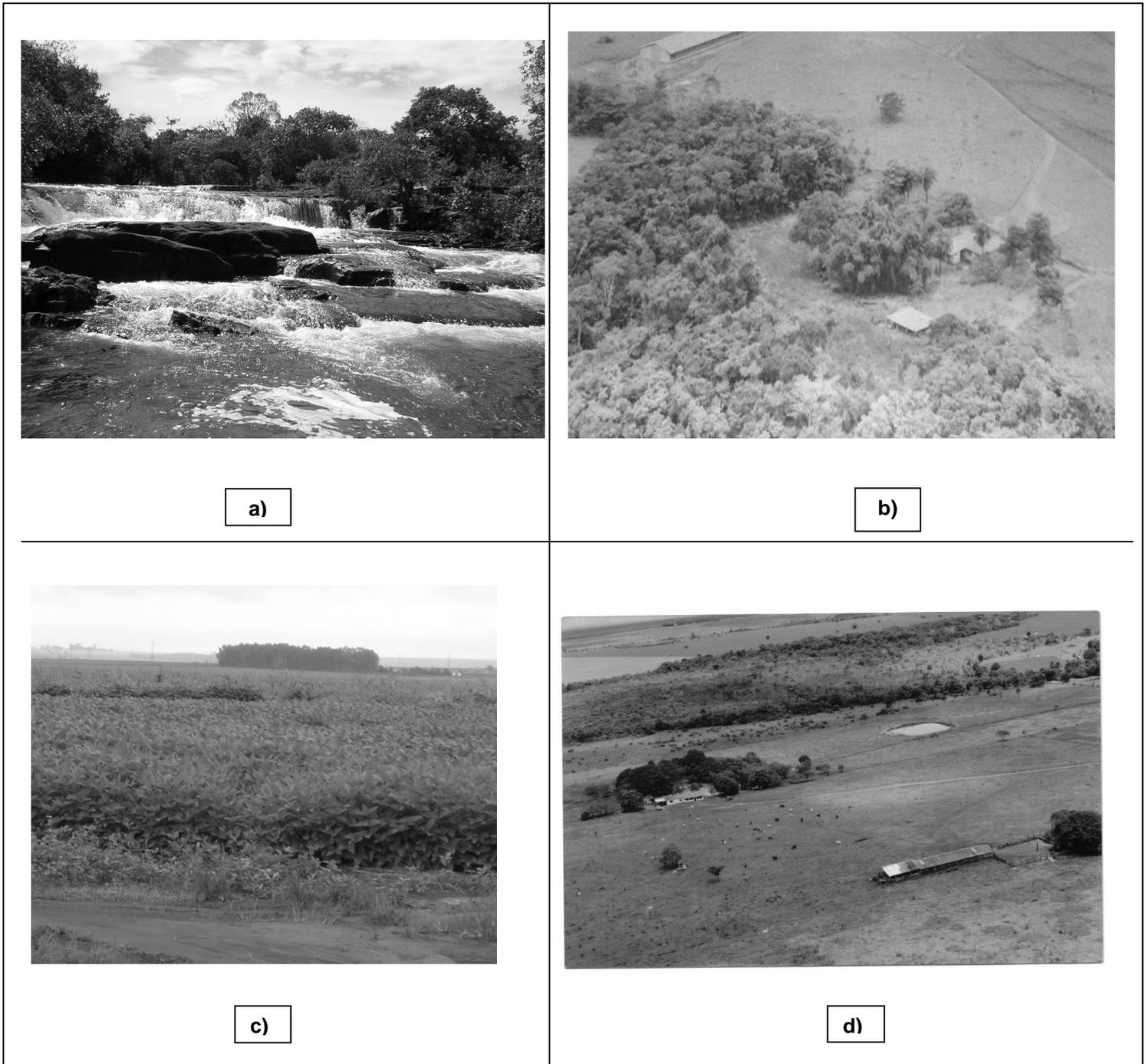


FIGURA 5 – Locais de coleta em Chapada dos Guimarães (ecossistema de proteção ambiental: a) Rio da casca localizado às proximidades da Fazenda Jampruca) e b) região de mata da Fazenda Jampruca. Locais de coleta no município de Campo Verde (ecossistema agrícola): c) Fazenda São Francisco e d) Fazenda Felicidade.

3.1.1 Ecosistema agrícola – Área Agrícola - Município de Campo Verde

O município de Campo Verde (figura 6) foi criado em 04 de julho de 1988 (Lei nº 5.314- D.O./MT) e está localizado no Centro Oeste do Brasil, sudeste do Mato Grosso, e a leste de Cuiabá, a 130 km de distância da capital, mais precisamente entre as coordenadas 15° 33' 12" de latitude sul, 55° 10' 03" de longitude oeste e 735 m de altitude. Ao norte limita-se com o município de Nova Brasilândia; ao sul, com os municípios: Jaciara, Dom Aquino e Santo Antônio do Leverger; a leste com: Primavera do Leste e Poxoréu e a oeste com: Chapada dos Guimarães e Cuiabá. A área deste município é de 4.744,49 km² (FERREIRA, 1997). A população do município é de 24.267 habitantes e divide-se em rural e urbana, com taxa de crescimento de 12,4% ao ano, segundo informações da ASSESSORIA DE IMPRENSA DA PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE CAMPO VERDE, 2006.



Figura 6: Foto da área urbana do Município de Campo Verde, ano de 2004.

Os rios de divisa do Município são o rio Cumbica com Primavera do Leste, rio Roncador com Nova Brasilândia, rio da Casca com Chapada dos Guimarães. Alguns rios da grande bacia do Tocantins, como o rio das Mortes (ou Manso), e da bacia do Prata, rio da Casca, fazem parte do município. O município de Campo Verde ainda é banhado pelos rios: São Lourenço, Córrego Lages, Café, Capitão, Augustin, Jacuba, entre outros (FERREIRA, 1997).

O relevo é constituído em sua maior parte por planícies, além disso possui o Planalto Guimarães, a Serra dos Coroados (entre o rio das Mortes e o rio da Casca) e a Serra do Roncador. O solo é arenoso e calcáreo. A formação geológica possui coberturas não dobradas do fanerozóico, sub-bacia ocidental da Bacia do Paraná, coberturas dobradas do proterozóico com granitóides associados, Grupo Aguapeí e faixa Móvel Brasileira. A vegetação é caracterizada por cerrados e matas correspondendo 97% e 3% respectivamente. O clima da região é o tropical com temperatura média variando entre 18^oC e 24^oC, com temperatura mínima oscilando entre 10 e 19^oC e a máxima variando entre 29 e 34^oC. Tem duas estações bem definidas: a das secas, de junho a setembro, e a das chuvas de outubro a maio. Precipitação pluviométrica: 9,4mm a 25mm sendo que os meses de maior pluviosidade são de setembro a maio (FERREIRA, 1997).

O grande movimento migratório em Campo Verde, principalmente de sulistas, foi fortalecido na década de 80, com a monocultura de erva-mate foi quando a cidade despontou como uma das mais progressistas do Estado de Mato Grosso com grandes grupos econômicos, como empresas de avicultura de corte e de postura, colaborando para o seu desenvolvimento. Além disso a agricultura também colaborou para o crescimento, cuja renda provém de diversas culturas, principalmente o plantio de grãos de soja, milho, algodão, sorgo e outros. No

município está instalada uma empresa de água mineral, cuja produção e engarrafamento gera lucro para o município, o qual é responsável pela distribuição do produto dentro do estado do Mato Grosso. Outras atividades em expansão são a piscicultura, que se desenvolve graças às condições hidrográficas excelentes e a pecuária, que possui rebanhos bovinos e suínos (FERREIRA, 1997).

3.1.2 Ecossistema de proteção ambiental – Área Controle - Município de Chapada dos Guimarães

O município de Chapada dos Guimarães está localizado no Estado de Mato Grosso, Brasil, na região central da América do Sul (Figura 7), mais precisamente entre as coordenadas geográficas 15° 10' - 15° 30' latitude Sul e 55° 40' - 56° 00' longitude Oeste. Os limites do município são: Nova Brasilândia, Campo Verde, Rosário Oeste e Cuiabá. A cidade localiza-se a 62 Km da capital do Mato Grosso, possui cerca de 6.000 km², com 15.736 habitantes segundo informações relacionadas pelo IBGE em 2004. Está a 860m acima do nível do mar e situa-se na borda do Planalto Central Brasileiro. Parte do município de Chapada dos Guimarães foi transformado em Parque Nacional segundo o decreto N.º 97.656, de 12 de abril de 1989, com o objetivo de proteger e preservar amostras dos ecossistemas ali existentes (Figura 7). A economia do município de Chapada dos Guimarães é praticamente baseada em turismo ecológico. É o divisor de águas entre as Bacias Amazônica e do Prata. Possui nascentes de vários rios, entre eles o Aricazinho, o Coxipó e o Mutuca, que abastecem a cidade de Cuiabá. As formações de relevo são areníticas. Um local chamado Mirante é o Centro Geodésico do Brasil. O clima é predominantemente tropical quente e sub-úmido, a precipitação média anual de 1.500 mm, com intensidade nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro, a temperatura média anual de 24° C, maior máxima 40° C, e menor mínima 0° C (FERREIRA, 1997).

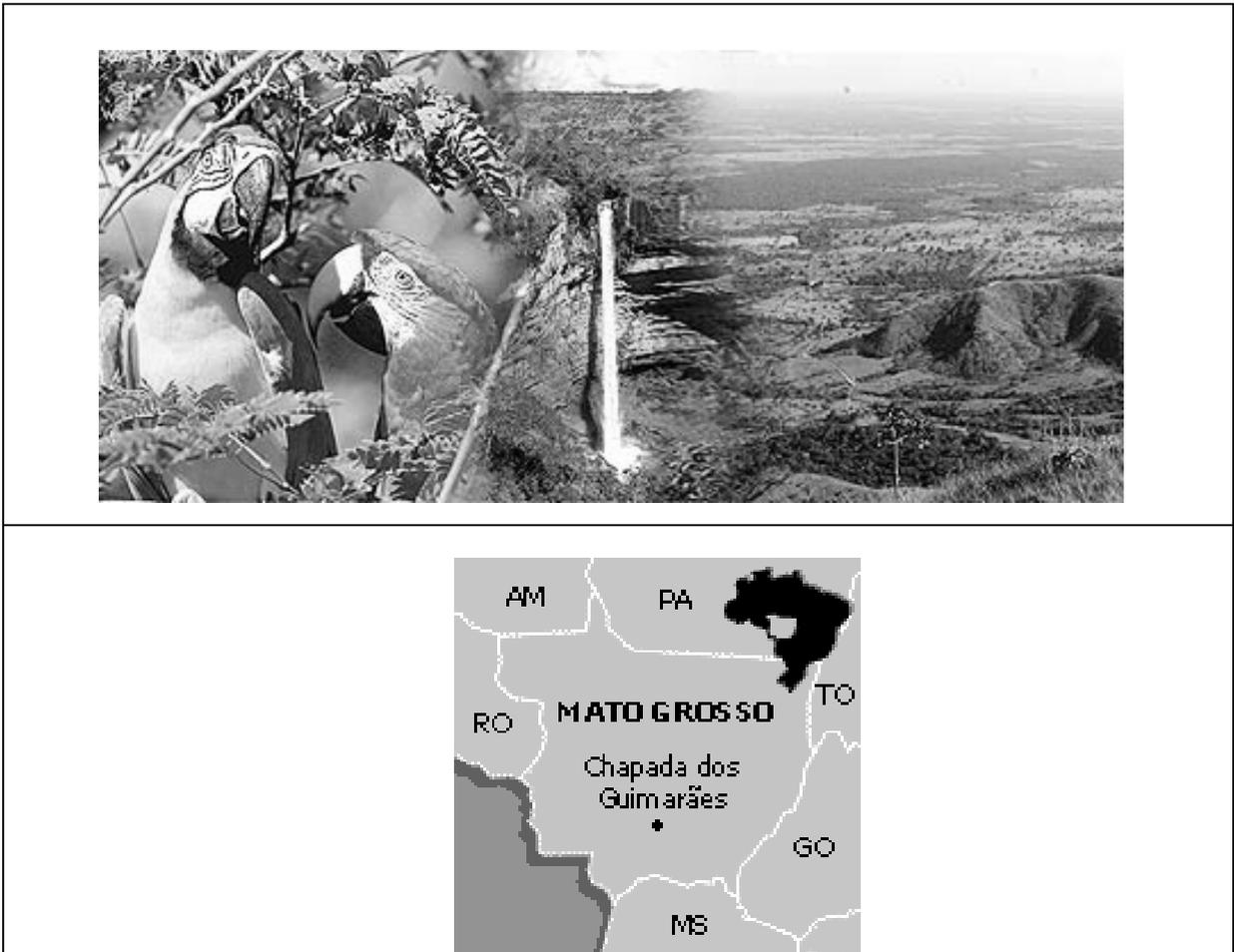


FIGURA 7: Fotos mostrando alguns dos interesses dos turistas no Município de Chapada dos Guimarães e abaixo o mapa com a localização do município no Brasil e em Mato Grosso (Foto: FOLHA ON LINE, 2005).

3.2 Pesquisa sobre o perfil de uso dos agrotóxicos

Os dados apresentados neste estudo são provenientes de questionários (anexo 2) realizados com os agricultores e/ou proprietários das Fazendas São Francisco, Fazenda Felicidade, localizadas em Campo Verde e da Fazenda Jampruca em Chapada dos Guimarães, nas quais foram coletadas as amostras de anfíbios e drosofilídeos. Foram entrevistados alguns responsáveis do Instituto de Defesa Agropecuária do Estado do Mato Grosso (INDEA-MT) e da Secretaria de

Agricultura. As informações foram compiladas e uma lista dos agrotóxicos mais utilizados foi gerada, cujos nomes químicos, serviram para determinar sua classe toxicológica e periculosidade ambiental. Obteve-se a quantidade de ingrediente ativo (IA) comercializado no município de Campo Verde durante o ano de 2001, a partir do levantamento dos receituários agronômicos, fornecidos pela professora Eliana Freire Gaspar de Carvalho Dores (anexo 3), do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), os quais foram agrupados em classes químicas.

3.3 Animais e tratamentos

A seleção da amostra foi determinada conforme dados da literatura, que recomenda a utilização de cinco a dez exemplares para estudos em laboratório, com tratamentos variados para um mesmo tipo de produto químico e o grupo controle (GRISOLIA & FERRARI, 1997; GRISOLIA & CORDEIRO, 2000; GRISOLIA 2002). Estudos em campo (biomonitoramento) com diversidade de produtos exigem mais ou menos trinta exemplares para o grupo de estudo caso e dez para o grupo controle (D'ARCE & CÓLUS, 2000). Procurou-se não exceder esses números para evitar redução das populações e não comprometer a variabilidade intraespecífica.

3.3.1 Coleta de anfíbios para pesquisa de micronúcleos

Foram coletados exemplares de anfíbios, adultos jovens, com as devidas autorizações: licenças 011/04-COEFA, 036/04-COEFA e 067/04-GEREX-1/MT, emitidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA). As coletas foram divididas em três etapas devido ao período determinado pelo IBAMA, de três em três meses, que ocorreram no período de março a maio, junho a agosto de 2004 e de dezembro de 2004 a abril de 2005.

As coletas ocorreram no período noturno, preferencialmente na época de chuva, utilizou-se redes para captura e caixa para acondicionamento dos animais. Os locais eram de difícil acesso e dependiam da disponibilidade do fazendeiro para receber, atender, e servir como guia. Foram realizadas nove coletas no total, sendo sete em 2004, nos dias 05, 07 e 20 de abril (dez exemplares), 10 de maio (três exemplares), 04 e 25 de junho (três exemplares), 05 de dezembro (22 exemplares) e duas em 2005, nos dias 03 e 21 de janeiro (sete exemplares).

Um total de 45 animais foi coletado, sendo que três exemplares da espécie *Scinax fuscovarius* e dois da *Leptodactylus labyrinthicus* foram descartados pela dificuldade de coleta, sendo assim poucos exemplares da mesma espécie. Portanto, optou-se trabalhar com 40 animais da espécie *Bufo schneideri* (figura 8), Desses animais, após a eutanásia com éter, extraiu-se cerca de 0,5 μ L de sangue periférico para o esfregaço, os animais foram fixados em formol a 10% por três dias e depois transferidos para vidros com álcool a 70%. Esses animais foram depositados na coleção do Laboratório de Zoologia da UnB, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Guarino Colli.



FIGURA 8 – Foto destacando a espécie de anfíbio utilizada no estudo: *Bufo schneideri*.

3.3.2 Preparação das iscas e das armadilhas para coleta dos drosofilídeos

A preparação das iscas e das armadilhas para coleta dos drosofilídeos foi feita conforme as técnicas de SENE *et al.*, (1980) e TIDON *et al.*, (2003). As iscas utilizadas foram preparadas 24 horas antes de serem levadas ao campo, para acelerar o processo de fermentação. Foram utilizadas bananas nanicas (*Musa sinensis* L.) maduras, laranjas (*Citrus sinensis*) e fermento Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*) seco. As proporções usadas foram de 50 gramas de fermento para 5 quilos de bananas sem cascas. Cada armadilha recebeu entre 100 a 150 mL de isca.

As dez armadilhas utilizadas foram de lata, suspensas em árvores, na sombra, entre 1,0 m e 1,20 m de altura e separadas por 20 passos em linhas perpendiculares às plantações e no rio da Casca (figura 9). As armadilhas ficaram expostas por 48 horas e após este período fez-se a coleta dos animais com a utilização de um pequeno “puçá”, que foi agitado e após os animais foram transferidos para tubos de vidro. O horário de coleta foi entre 9 e 10 horas.

3.3.3 Coleta de drosofilídeos para a pesquisa de variabilidade genética

Um total de 900 amostras de drosofilídeos foi coletado no período de dezembro de 2004 a janeiro de 2005, com a licença 067/04-GEREX-1/MT, emitida pelo IBAMA. Foram realizadas seis coletas, duas em cada localidade, que ocorreram nas seguintes datas: 18 de dezembro de 2004 e 22 de janeiro de 2005, na Fazenda São Francisco, 26 de dezembro de 2004 e 26 de janeiro de 2005, na Fazenda Jampruca e 30 de dezembro de 2004 e 08 de janeiro de 2005, na Fazenda Felicidade. Optou-se trabalhar com as espécies que tiveram maior ocorrência sendo

elas: *Drosophila simulans* e *Zaprionus indianus* (figura 10). Dos exemplares coletados 480 foram processados, 80 de cada espécie/localidade.

Apesar de terem sido processadas 480 amostras de drosofilídeos para a pesquisa da variabilidade genética, somente 406 amostras apresentaram resultados satisfatórios, fato esse que foi devido à padronização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. De um total de 236 exemplares de *D. simulans*, somente 191 apresentaram resultados satisfatórios, sendo 67 da Fazenda Jampruca, ecossistema de proteção ambiental e 124 do ecossistema agrícola, sendo 75 da Fazenda São Francisco e 49 da Fazenda Felicidade. Um total de 244 amostras de *Z. indianus* foram analisadas e 215 foram conclusivos, 70 da área controle e 145 da área agrícola, sendo 72 da Fazenda São Francisco e 73 da Fazenda Felicidade.

Logo após a coleta no campo os indivíduos foram eutanaziados com éter e separados por espécie, com auxílio de uma lupa, acondicionados em pequenos vidros identificados com data e região. Esse material foi acondicionado no freezer até serem levadas ao Laboratório de Genética, na Universidade de Brasília (UnB). Foram transportados com gelo e após chegarem ao laboratório, os exemplares foram separados em tubos de centrífuga e permaneceram no freezer até serem processados.



FIGURA 9 – Fotos destacando as armadilhas e o local onde foram colocadas: a) Rio da Casca, próximo à Fazenda Jampruca, ecossistema de proteção ambiental. b) Fazenda São Francisco e c) Fazenda Felicidade, ecossistemas agrícolas.

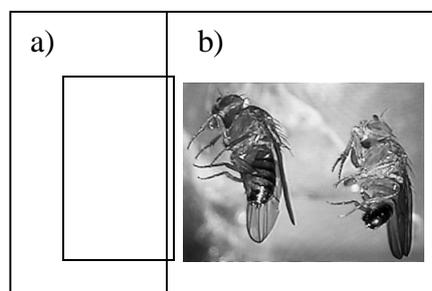


FIGURA 10 – Foto destacando as espécies de drosofilídeos estudadas: a) *Zaprionus indianus* (Foto: STEIN, TEIXEIRA & NOVO, 2005) e b) *Drosophila simulans*, fêmea a esquerda e macho a direita (Foto: myweb.uiowa.edu/bballard/Dsimulans.htm).

3.4 Preparação e análise das lâminas de micronúcleos em anfíbios

A lâminas foram preparadas conforme a técnica de HAYASHI *et al.* (1990) com algumas adaptações. As lâminas limpas e secas foram aquecidas em estufa e receberam uma gota do corante “acridine orange” que foi previamente dissolvido em água destilada na proporção de 1mg/mL. Após o tratamento com o corante as lâminas secaram a temperatura ambiente, receberam uma gota (cerca de 0,5 µL) de sangue periférico do anfíbio e fez-se o esfregaço. Essas lâminas, após secarem à temperatura ambiente foram tratadas com metanol por dez minutos e novamente coradas com o corante “acridine orange” por três minutos. A análise de micronúcleos foi realizada em dois ou três dias após o preparo. Fez-se a contagem de três mil eritrócitos por exemplar, utilizando-se microscopia de fluorescência e objetiva de imersão (100x), em um microscópio Zeiss Axioskop 2, com filtro de 450 – 490 nm.

3.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – PAGE - Drosofilídeos

Para determinação do padrão de migração e classificação das esterases de drosofilídeos foi utilizado o gel de poliacrilamida para a análise eletroforética conforme LAPENTA (1998) com algumas adaptações (anexo 4). Gel a 10%, com acrilamida (29%) e bis acrilamida (1%), tampão do gel com Tris, pH 8.8, TMED (N, N, N, N, tetramethyl- ethylenediamine) e Persulfato de amônia (10%), para polimerizar (volume final de 25mL). Para a obtenção das amostras, os indivíduos foram macerados individualmente em tubos de centrífuga, resfriados, contendo 30µl de tampão (Tris-HCl 0.1M, pH 6.3) e centrifugados a 12.000 rpm, por aproximadamente cinco minutos. De cada uma das amostras foram utilizados 20 µL de sobrenadante, para a detecção das esterases, que foram aplicados em gel de poliacrilamida.

A corrida eletroforética em Tampão Tris-Glicina 0.1M, pH 8,3 se deu em cuba vertical, dentro da geladeira a 200V, 30 mA, por um período de cinco horas para espécies de *Drosophila simulans* e a 100V, 15 mA e seis horas para *Zaprionus indianus*. Após a corrida os géis foram pré-incubados por 30 minutos em 100mL de tampão fosfato monobásico e dibásico 0.1M pH 6.1, e mais 4mL de α -naftilacetato e 15mL de álcool isopropílico. Após esse tempo, acrescenta-se 600mg de corante RR Salt dissolvido em 30mL de álcool isopropílico e 50 mL de tampão fosfato monobásico e dibásico. O gel revela-se em aproximadamente 30 minutos, sob agitação. Após a coloração é tratado com uma solução fixadora de ácido acético, álcool etílico comercial e água destilada na proporção de 2:1:8, durante 2 horas. Após esse procedimento o gel é fixado em glicerol 10% e seco em papel celofane.

As variantes eletroforéticas da enzima esterase foram indicadas por letras A, B, C, D, do pólo negativo para o positivo, respectivamente, dependendo da mobilidade no gel de poliacrilamida a 10% (figuras 11 e 12). As bandas que apresentaram características similares nos padrões de migração, espessura e colocação foram incluídas no mesmo grupo.

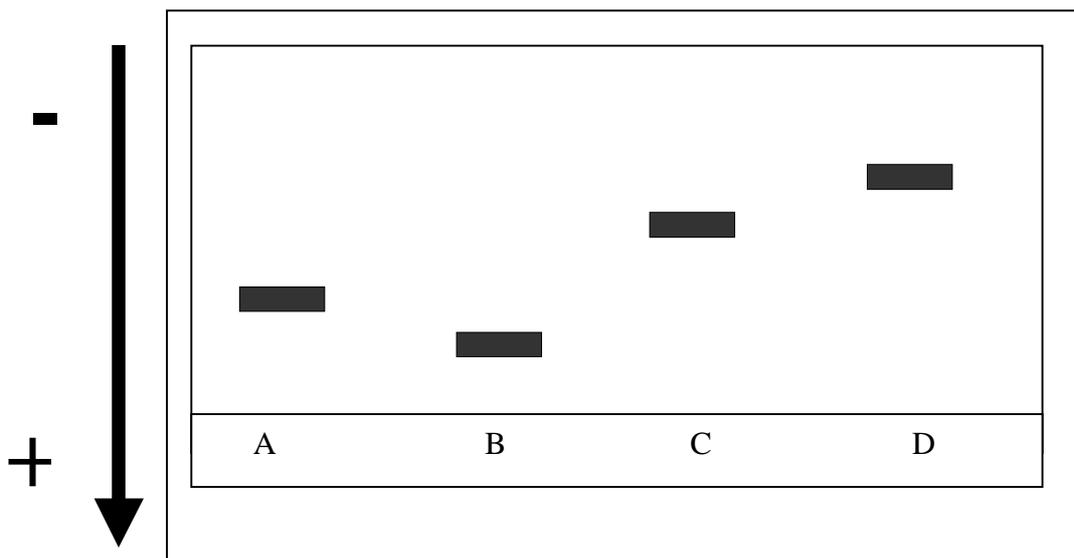


FIGURA 11 – Esquema da migração eletroforética dos alelos para *Drosophila simulans*. a – alelo 1.00, b – alelo 1.05, c – alelo 0.90, d – alelo 0.75

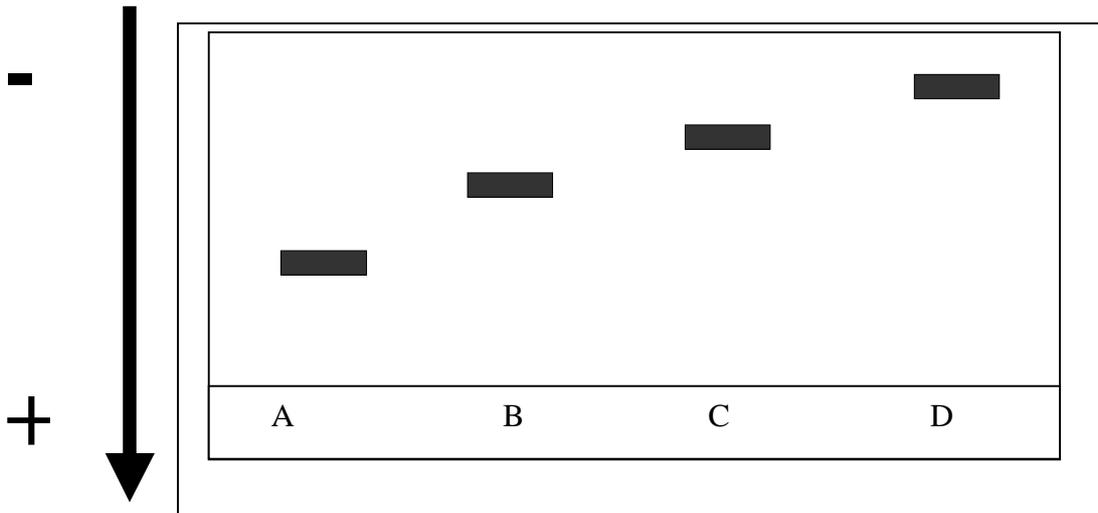


FIGURA 12 – Esquema da migração eletroforética dos alelos do loco 1 para *Zaprionus indianus*. a – alelo 1.00, b – alelo 0.94, c – alelo 0.80, d – alelo 0.75.

3.6 Análise estatística

A distribuição da frequência de micronúcleos nas células foi analisada estatisticamente, comparando-se os resultados das amostras da população de anfíbios do ecossistema de proteção ambiental (Chapada dos Guimarães) com animais do ecossistema agrícola (município de Campo Verde) para avaliação de impacto ambiental. O nível de significância utilizado foi $\alpha = 0,05$ para a seguinte hipótese: H_0 Não há diferenças significativas entre as populações de anfíbios do ecossistema de proteção ambiental e do ecossistema agrícola em relação à frequência de células micronucleadas. Com o suporte do programa BIOESTAT 2.0 (AYRES, *et al.*, 2000), foram calculadas as médias, desvio padrão e porcentagens e o teste exato de Fisher ou prova de Fisher.

O teste estatístico realizado, ou seja a prova de Fisher do programa BIOESTAT 2.0, (AYRES, *et al.*, 2000) constitui um teste não-paramétrico que pode ser aplicado quando os grupos são independentes. Essa técnica é determinada no conjunto de frequências, o qual considera-se a ausência ou presença de

micronúcleo, no caso desse estudo, sendo portanto considerado mais adequado para verificar a diferenças entre o grupo controle e o grupo da área agrícola, pois desconsidera a quantidade de micronúcleos em cada amostra, que poderia ser comparado a parâmetros de contaminação, na água, no solo ou em tecidos, os quais não foram trabalhados.

Os resultados da variabilidade genética das duas espécies de drosofilídeos em relação à enzima esterase foram trabalhados estatisticamente para avaliar a seguinte hipótese: H_0 Não há diferenças significativas entre as populações de drosofilídeos do ecossistema agrícola e de proteção ambiental em relação à enzima α -esterase. A partir das frequências alélicas foram estimados os índices de diversidade genética, heterozigosidade média (H_e) e número médio de alelos, com auxílio do programa BIOSYS, desenvolvido por SWOFFORD E SELANDER (1989).

4 RESULTADOS

4.1 Levantamento dos Agrotóxicos no Município de Campo Verde

De acordo com as tabelas VI, VII, VIII verificou-se que os agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde, em 2001, foram da classe dos herbicidas, seguidos dos inseticidas, fungicidas e reguladores de crescimento. O grupo químico das glicinas (herbicidas) foi o mais adquirido. Em relação ao nome químico, os herbicidas glifosato e o ácido fenoxiacético (2,4-D); os inseticidas clorpirifos e o endossulfam e o fungicida óleo mineral foram os mais comercializados.

TABELA VI: Quantidade de Princípio Ativo (IA) e classes dos agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde–MT, no ano de 2001.

Classes	Quantidade de IA (Kg)
Herbicidas	247.778,92
Inseticidas	209.402,14
Fungicidas	129.587,62
Reguladores de crescimento	17.001,28

TABELA VII: Quantidade de Princípio Ativo (IA) e grupo químico dos dez agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde–MT, no ano de 2001.

Grupo Químico	Quantidade de IA (Kg)
Glicinas	107.865,31
Organofosforados	96.723,84
Hidrocarbonetos	80.410,27
Ácido Fenoxiacético	49.916,91
Organoclorados	42.656,91
Uréia e derivados	39.563,08
Carbamatos	30.716,66
Benzimidazol	27.284,90
Triazina	19.832,20
Éster de Ácido Graxo	19.806,21

TABELA VIII: Nome químico, classificação, classe toxicológica, periculosidade ambiental, grupo químico e quantidade de agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde–MT, no ano de 2001.

Nome Químico	Classificação	Classe Toxicológica	Periculosidade Ambiental	Grupo Químico	Quantidade De IA (kg)
Glifosato	Herbicida	IV	III	Glicina	107.865,31
Óleo Mineral	Fungicida	IV	NE	Hidrocarboneto	80.410,27
Clorpirifós	Inseticida	III	II	Organofosforado	52.306,99
2,4 D	Herbicida	I	I	Ác. fenoxiacético	49.916,19
Endossulfam	Inseticida	I	I	Organoclorado	42.655,10
Carbendazim	Fungicida	III	II	Benzimidazol	25.266,50
Metamidofós	Inseticida	II	II	Organofosforado	22.917,60
Diuron	Herbicida	IV	II	Uréia	21.208,16
Óleo Vegetal	Inseticida	IV	NE	Éster de Ác. Graxo	19.806,21
Benfuracarbe	Inseticida	III	III	Metilcarbamato de Benzofuranila	17.528,40
Ciazina	Herbicida	III	II	Triazina	11.012,50
Monocrotofós	Inseticida	II	II	Organofosforado	9.922,80
Etefom	Regulador de Crescimento	III	NE	Etileno	9.604,24
Diafentiurom	Inseticida	I	II	Derivado de Uréia	9.159,10
Atrazina	Herbicida	III	NE	Triazina	8.330,30
Trifluralina	Herbicida	I	II	Dinitroanilina	8.095,50
Enxofre	Fungicida	IV	IV	Inorgânico	7.588,80
Carbosulfam	Inseticida	II	II	Carbamato	7.322,80
Profenofós	Inseticida	III	II	Organofosforado	7.087,70
Alacloro	Herbicida	III	NE	Cloroacetanilida	5.995,60
Hidróxido de Fentina	Fungicida	I	I	Organoestânico	5.753,50
Acetamiprido	Inseticida	III	II	Neonicotinóide	5.746,80
Paraquate	Herbicida	II	II	Derivado de uréia	5.339,80
Metolacloro	Herbicida	I	II	Cloroacetanilida	3.995,20
Msmá	Herbicida	II	NE	Organoarsênico	3.637,20

Classe toxicológica I=extremamente tóxico, II=altamente tóxico, III=mediamente tóxico, IV=pouco tóxico. Periculosidade Ambiental I=altamente perigoso, II=muito perigoso, III=perigoso, IV=pouco perigoso (ANVISA, 2005) . IA= quantidade de ingrediente ativo comercializado no município. (anexo 3). NE (não especificado).

TABELA VIII cont.: Nome químico, classificação, classe toxicológica, periculosidade ambiental, grupo químico e quantidade de agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde–MT, no ano de 2001.

Nome Químico	Classificação	Classe Toxicológica	Periculosidade Ambiental	Grupo Químico	Quantidade De IA (kg)
Cloreto de Cloromequate	Regulador de Crescimento	IV	III	Amônio Quaternário	3.463,70
Haloxifop-P	Herbicida	II	III	Ácido Ariloxifeno-Xipropiônico	3.175,32
Oxicloreto de Cobre	Fungicida	IV	III	Inorgânico	2767,71
Benomil	Fungicida	III	NE	Benzimidazol-carbamato	2737,50
Cloreto De Mepiquate	Regulador De Crescimento	III	III	Amônio Quaternário	2.711,50
Setoxidim	Herbicida	III	NE	oxima ciclohexanodiona	2708,48
Acefato	Inseticida	IV	III	Organofosforado	2.168,63
Tiofanato Metílico	Fungicida	IV	III	benzimidazol	2018,40
Clomazona	Herbicida	II	II	Isoxazolidinona	1.998,00
Lactofem	Herbicida	I	II	Éter Difenílico	1.769,90
Acetocloro	Herbicida	III	NE	Cloroacetanilida	1764,00
Glufosinato	Herbicida	NE	NE	Homoalanina	1710,60
Diquate	Herbicida	NE	NE	Bipiridílio	1688,00
Metomil	Inseticida	I	NE	Metilcarbamato de oxima	1658,51
Nonil Fenoxi Poli Etanol	NE	NE	NE	NE	1524,50
Tiram	Fungicida	II	NE	Dimetilditio-carbamato	1497,50
Nonil Fenol Etoxilado	NE	NE	NE	NE	1430,60
Fenitrotiona	Inseticida	II	NE	Organofosforado	1403,20
Piritiobaque-sódico	Herbicida	III	NE	Ac. Pirimidiniloxi-benzóico	1398,95

Classe toxicológica I=extremamente tóxico, II=altamente tóxico, III=mediamente tóxico, IV=pouco tóxico. Periculosidade Ambiental I=altamente perigoso, II=muito perigoso, III=perigoso, IV=pouco perigoso (ANVISA, 2005) . IA= quantidade de ingrediente ativo comercializado no município. (informação verbal²). NE (não especificado).

TABELA VIII cont. Nome químico, classificação, classe toxicológica, periculosidade ambiental, grupo químico e quantidade de agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde–MT, no ano de 2001.

Nome Químico	Classificação	Classe Toxicológica	Periculosidade Ambiental	Grupo Químico	Quantidade De IA (kg)
Azoxistrobina	Fungicida	III	III	Estrobilurina	1335,90
Tidiazuron	Herbicida	IV	NE	Uréia	1214,88
Sulfentrazone	Herbicida	I	NE	Triazolona	1200,00
Ciclanilida	Regulador de Crescimento	I	NE	Carboxanilida	1195,80
Teflubenzuron	Inseticida	IV	NE	Benzoiluréia	1167,75
Carbofuram	Inseticida	I	II	Carbamato	1.137,48
Mancozebe	Fungicida	III	II	Ditiocarbamato	1071,84
Fomesafen	Herbicida	III	NE	Éter difenílico	981,93
Fluazifop-P-Zeta-	Herbicida	III	NE	Ac. Ariloxifenoxi-propiónico	950,88
Cipermetrina	Inseticida	II	II	Piretróide	909,90
Bifentrina	Inseticida	III	III	Piretróide	747,24
Cipermetrina	Inseticida	II	II	Piretróide	720,08
Tiametoxam	Inseticida	III	III	Neonicotinóide	713,30
Flumioxazina	Herbicida	III	III	Carboximida	690,09
Permetrina	Inseticida	II	I	Piretróide	689,22
Triazofós	Inseticida	II	NE	Organofosforado	682,25
Imazetapir	Herbicida	III	NE	Imidazolinona	458,98
Diclosulam	Inseticida	III	II	Sulfonanilida	
Parationa				Triazolpirimida	454,57
Metílica	Inseticida	I	NE	Organofosforado	412,80
Bentazona	Herbicida	III	NE	Benzoatiadiazinona	388,60
Carboxina	Fungicida	IV	I	Carboxanilida	303,45
Tiodicarbe	Inseticida	II	NE	Metilcarbamato de Oxina	381,25
Cletodim	Herbicida	II	NE	Oxina	373,59
Ametrina	Herbicida	III	NE	Ciclohexadiona	
Pendimetalina	Herbicida	III	NE	Triazina	342,00
Clorimuron etílico	Herbicida	IV	III	Dinitroanilina	335,00
Lufenuron	Inseticida	III	NE	Sulfoniluréia	311,50
Triflumuron	Inseticida	IV	NE	Benzoíluréia	297,05
Acetato de Fentina	Fungicida	II	NE	Benzoilureia	296,24
				Organoestânico	261,80

Classe toxicológica I=extremamente tóxico, II=altamente tóxico, III=mediamente tóxico, IV=pouco tóxico. Periculosidade Ambiental I=altamente perigoso, II=muito perigoso, III=perigoso, IV=pouco perigoso (ANVISA, 2005) . IA= quantidade de ingrediente ativo comercializado no município. (anexo 3). NE (não especificado).

TABELA VIII cont.: Nome químico, classificação, classe toxicológica, periculosidade ambiental, grupo químico e quantidade de agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde–MT, no ano de 2001.

Nome Químico	Classificação	Classe Toxicológica	Periculosidade Ambiental	Grupo Químico	Quantidade De IA (kg)
Brometo de Metila	Fungicida	I	NE	Alifático Halogenado	261,17
Novalurom	Inseticida	IV	NE	Benzoiluréia	260,50
Acifluorfem	Herbicida	NE	NE	Éter Difenílico	227,45
Procloraz	Fungicida	I	NE	Imidazolilcarbo-	225,00
Alfa-Cipermetrina	Inseticida	II	NE	xamida	216,70
Tebuconazole	Fungicida	IV	NE	Piretróide	214,75
Triazol					
Carfentrazona-Etílica	Herbicida	II	II	Triazolona	194,80
Imazaquim	Herbicida	III	NE	Imidazolina	172,68
Diflubenzurom	Inseticida	IV	NE	Benzoiluréia	167,00
Quizalofope-P-Tefurilico	Herbicida	III	NE	Ac. Ariloxifenoxi-propionico	160,80
Fenoxaprope-P-Etílico	Herbicida	III	NE	Ac. Ariloxifenoxi-propionico	157,79
Fosfeto de Alumínio	Inseticida	I	NE	Fosfina	156,43
Simazina	Herbicida	III	NE	Triazina	145,00
Clorfluazurom	Inseticida	IV	NE	Benzoiluréia	141,10
Terbufós	Inseticida	I	NE	Organofosforado	133,50
Picloram	Herbicida	III	NE	Ac. Piridincarboxílico	88,16
Aldicarbe	Inseticida	I	NE	Metilcarbamato de Oxima	87,00
Lambda-Cialotrina	Inseticida	III	II	Piretróide	81,38
Difenoconazol	Fungicida	III	NE	Triazol	80,45
Esfenvalerato	Inseticida	II	NE	Piretróide	76,61
Tiabendazol	Fungicida	IV	NE	Benzimidazol	72,98
Espinosade	Inseticida	III	NE	Espinozinas	70,68
Oxima					
Tepaloxidim	Herbicida	III	NE	Ciclohexadiona	70,00
Clorfenapir	Inseticida	II	NE	Pirazol	68,64
Flumetsulam	Herbicida	IV	NE	Sulfonalida	66,60
Quizalofope-P-Etil	Herbicida	III	NE	Triazolopirimidina	66,45
Cloransulam Metílico	Herbicida	III	NE	Ac. Ariloxifenoxi-propionico	66,45
Pirimifos-Metílico	Inseticida	III	NE	Sulfonanilida	65,72
Tolifluanida	Fungicida	I	NE	Triazolopirimidina	62,00
Bromacila	Herbicida	III	NE	Organofosforado	62,00
Deltametrina	Inseticida	III	NE	Organofosforado	54,50
Uracila					52,00
Piretróide					46,65

Classe toxicológica I=extremamente tóxico, II=altamente tóxico, III=mediamente tóxico, IV=pouco tóxico. Periculosidade Ambiental I=altamente perigoso II=muito perigoso, III=perigoso, IV=pouco perigoso (ANVISA, 2005) . IA= quantidade de ingrediente ativo comercializado no município. (anexo 3). NE (não especificado).

TABELA VIII cont.: Nome químico, classificação, classe toxicológica, periculosidade ambiental, grupo químico e quantidade de agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde–MT, no ano de 2001.

Nome Químico	Classificação	Classe Toxicológica	Periculosidade Ambiental	Grupo Químico	Quantidade De IA (kg)
Tiacloprido	Inseticida	II	NE	Neonicotinóide	39,96
Fipronil	Inseticida	II	NE	Pirazol	38,98
Clorotalonil	Fungicida	III	NE	Isoflalonitrila Oxima	37,70
Butroxiidim	Herbicida	IV	NE	Ciclohexadiona	36,75
Dimetenamida	Herbicida	IV	NE	Cloroacetanilida	36,00
Indoxacarbe	Inseticida	I	NE	Oxadiazina	31,80
Beta Ciflutrina	Inseticida	II	NE	Piretróide	29,75
Imidacloprido	Inseticida	III	NE	Neonicotinoide	27,85
Tebufenozida	Inseticida	IV	NE	Benzoidrazida	24,00
Furatiocarbe	Inseticida	II	NE	Metilcarbamato de Benzofuranilida	22,00
Cianamida	Regulador de Crescimento	I	NE	Carbamida	21,84
Glufosinato de Amonio	Herbicida	III	NE	Homoalanina	19,20
Bacilus Thuringiensis	Inseticida	IV	IV	Biológico	18,96
Abamectina	Inseticida	III	II	Avermectina	18,63
Hexazinona	Herbicida	III	NE	Triazinona	18,63
Propargito	Inseticida	III	NE	Sulfito de Alquila	15,84
Fentoato	Inseticida	III	NE	Organofosforadp	15,50
Manebe	Fungicida	III	NE	Ditiocarbamato	15,36
Oxassulfurom	Herbicida	IV	NE	Sulfoniluréia	15,15
Dimetoato	Inseticida	II	NE	Organofosforado	13,20
Flumicloraque-Pentílico	Herbicida	IV	NE	Ciclohexanodicarboximida Ac.	12,90
Triclopir Éster Sulfato de Cobre	Herbicida	NE	NE	Piridiniloxialcanóico	12,48
Casugamicina	Fungicida	IV	NE	Inorgânico	10,25
Cartape	Fungicida	III	NE	Antibiótico	9,65
Sulfloramida	Inseticida	NE	NE	Tiocarbamato Sulfonamida	8,00
Isoxaflutol	Fungicida	IV	NE	Fluoroalifática	7,83
Malationa	Inseticida	III	NE	Isoxazol	7,31
Pencicurom	Herbicida	III	NE	Organofosforado	6,33
Oxido Cuproso	Fungicida	IV	NE	Feniluréia	6,00
Propiconazol	Fungicida	IV	NE	Inorgânico	5,60
Triclorfom	Inseticida	II	NE	Triazol	3,00
		II	NE	Organofosforado	3,00

Classe toxicológica I=extremamente tóxico, II=altamente tóxico, III=mediamente tóxico, IV=pouco tóxico. Periculosidade Ambiental I=altamente perigoso, II=muito perigoso, III=perigoso, IV=pouco perigoso (ANVISA, 2005) . IA= quantidade de ingrediente ativo comercializado no município. (anexo 3). NE (não especificado).

TABELA VIII cont.: Nome químico, classificação, classe toxicológica, periculosidade ambiental, grupo químico e quantidade de agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde–MT, no ano de 2001.

Nome Químico	Classificação	Classe Toxicológica	Periculosidade Ambiental	Grupo Químico	Quantidade De IA (kg)
Tetradifona	Inseticida	IV	NE	Clorodifenilsulfona	2,56
Triadimefom	Fungicida	III	NE	Triazol	2,50
Prometrim	Herbicida	III	NE	Triazina	2,40
Propaquizafope	Herbicida	III	NE	Ac. Ariloxifenoxi-propionico	2,00
Cimoxanil	Fungicida	III	NE	Acetamida	1,92
Dicofol	Inseticida	II	NE	Organoclorado	1,81
Pirimicarbe	Inseticida	II	NE	Dimetilcarbamato	1,50
Metalaxil-M	Fungicida	II	NE	Acilalaninato	1,44
Diazinona	Inseticida	II	NE	Organofosforado	1,14
Folpete	Fungicida	IV	NE	Dicarboximida	1,00
Procimidona	Fungicida	IV	NE	Dicarboximida	1,00

Classe toxicológica I=extremamente tóxico, II=altamente tóxico, III=mediamente tóxico, IV=pouco tóxico. Periculosidade Ambiental I=altamente perigoso, II=muito perigoso, III=perigoso, IV=pouco perigoso (ANVISA, 2005) . IA= quantidade de ingrediente ativo comercializado no município. (anexo 3). ND (não determinado). NE (não especificado).

Os agrotóxicos utilizados nas fazendas estudadas, na safra 2004, segundo dados obtidos nos questionários, foram representados nas tabelas IX, X, XI e também foram citados na relação de 2001. A Fazenda São Francisco possui o cultivo de 680 ha de soja e 400 ha de milho. A Fazenda Felicidade, tem 713 ha e 70 desses hectares são destinados ao plantio de soja. Já a Fazenda Jampruca, em Chapada dos Guimarães, possui 250 ha onde 112 ha são destinados ao plantio de soja.

TABELA IX: Produto, grupo químico, classificação, classe toxicológica, PPA, cultivo e a quantidade de agrotóxicos utilizados - Fazenda Jampruca/Chapada dos Guimarães (2004).

Produto	Grupo químico	Classificação	Classe	PPA	Cultivo	Quantidades
Glifosato	Glicina	Herbicida	IV	III	Soja	112 kg; 1,7 L
Flutriafol	Triazol	Fungicida	III	NE	Soja	112 L
Clorimuron	Sulfoniluréia	Herbicida	NE	NE	Soja	5 Kg
Ac. ariloxifeno- xipropiônico		Herbicida	III	NE	Soja	0,5 L
Endosulfam	Organoclorado	Inseticida	I	I	Soja	0,1 L

TABELA X: Produto, grupo químico, classificação, classe toxicológica, PPA, cultivo e a quantidade de agrotóxicos utilizados – Fazenda São Francisco/Campo Verde (2004).

Produto	Grupo químico	Classificação	Classe	PPA	Cultivo	Quantidades
Diclosulam	Sulfonilida triazolpirimida	Inseticida	III	II	Soja	27.200 Kg
Metamidofós	Organofosforado	Inseticida	II	II	Soja	3.400 L
Tebuconazole	Triazol	Fungicida	IV	NE	Soja	3.400 L
Flutriafol	Triazol	Fungicida	III	NE	Soja	3.400 L
2,4 D	Ac. Fenoxiácido	Herbicida	I	I	Soja	2.720 L
Acefato	Organofosforado	Inseticida	IV	III	Soja	2.720 L
Triflumurom	Benzoiluréia	Inseticida	IV	NE	Milho	1.200 L
Triazina		Herbicida	III	NE	Milho	1.000 L
Metolacoloro	Cloroacetanilida	Herbicida	I	II	Soja	680 L
lambda-cialotrina	Piretróide	Inseticida	III	II	Soja	170 L

TABELA XI: Produto, grupo químico, classificação, classe toxicológica, PPA, cultivo e a quantidade de agrotóxicos utilizados – Fazenda Felicidade/Campo Verde (2004).

Produto	Grupo químico	Classificação	Classe	PPA	Cultivo	Quantidades
Metamidofós	Organofosforado	Inseticida	II	II	Soja	126 L
Clomazona	Isoxazolidinona	Herbicida	II	II	Soja	70 L
Tebuconazole	Triazol	Fungicida	IV	NE	Soja	63L
Haloxifop-P	Ac. Ariloxifenoxi- propilônico	Herbicida	II	NE	Soja	35 L
Diclosulam	Sulfonilida triazolpirimida	Inseticida	III	II	Soja	2,9Kg

4.2 Genotoxicidade

Em relação aos dados de genotoxicidade, foram analisados 40 exemplares de anfíbios da espécie *Bufo schneideri*. De 90 mil células analisadas de amostras do município de Campo Verde (ecossistema agrícola), 62 apresentaram micronúcleos (figura 13) , ou seja, correspondente a 0,069% de células micronucleadas. Já no município de Chapada dos Guimarães (ecossistema de proteção ambiental) 30 mil células foram analisadas e em quatro delas verificou-se a presença de micronúcleo, um total de 0,013% (Tabela XII e figura 14). De acordo com o teste Exato de Fisher do programa BIOESTAT 2.0, (AYRES, *et al.*, 2000), as diferenças das médias não foram significativas ($p=0,0711$).

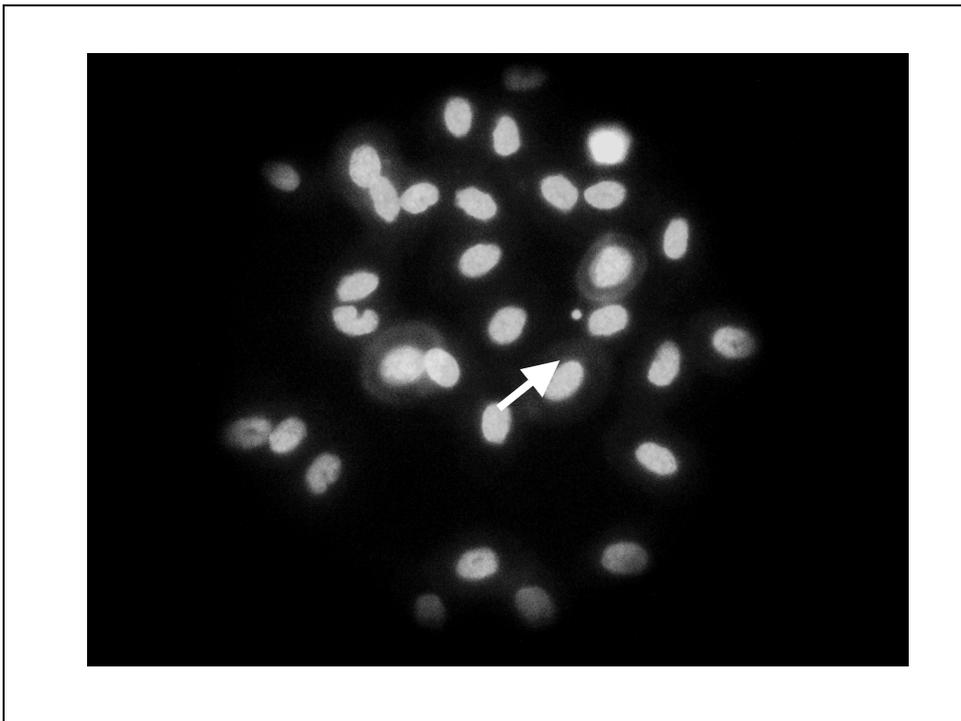


FIGURA 13 – Foto da lâmina de células do sangue periférico de anfíbio, com coloração de “acridine orange”, conforme técnica de HAYASHI, *et al.*,1990. Obseçada em microscopia de fluorescência e objetiva de imersão (100x). A seta aponta a presença de um micronúcleo.

TABELA XII: Número total, probabilidade, número de células analisadas, número de micronúcleos, porcentagem, média e desvio padrão das amostras de anfíbios coletadas nos ecossistemas: agrícola, no município de Campo Verde e de Proteção Ambiental, Chapada dos Guimarães

	N	p	N Cel.analisadas	MN	%	\bar{X}
Ecossistemas						
Proteção Ambiental	10	0,07	30.000	04	0,013	0,4±0,7
Agrícola	30		90.000	62	0,069	2,1±2,9

N= numero total, p= probabilidade= 0,07 não significativo ao nível de 0,05. MN (número de micronúcleos). X =média de Mn/indivíduos±desvio padrão.

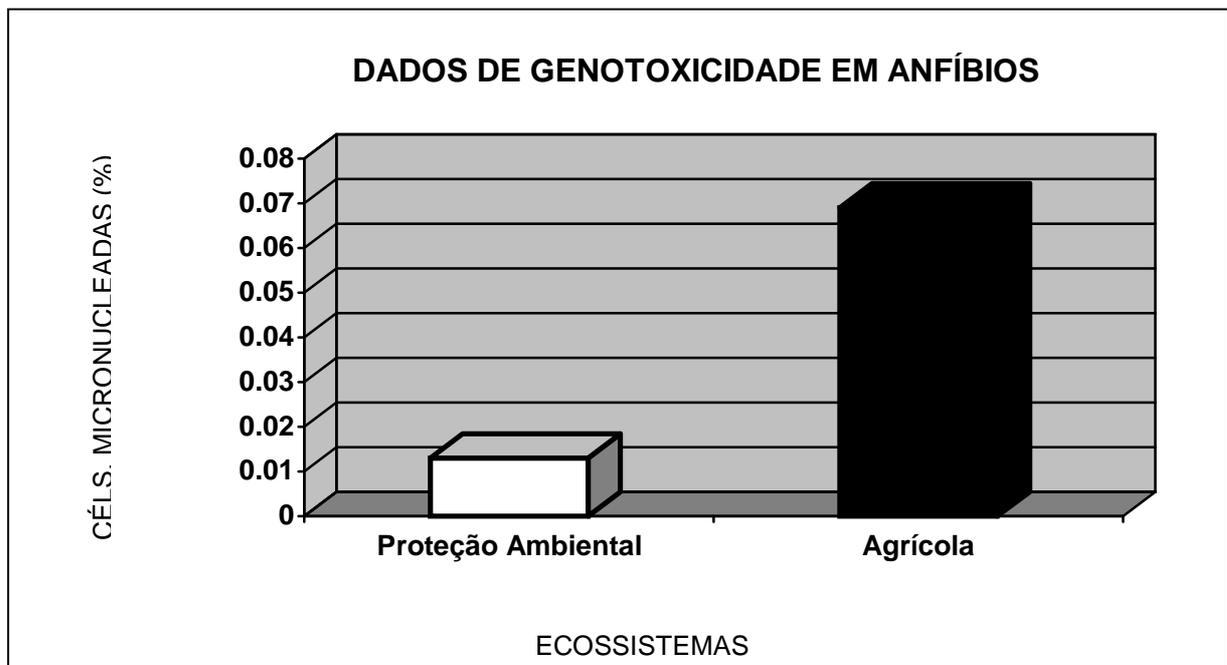


FIGURA 14: Gráfico representando os dados de genotoxicidade das amostras de anfíbios coletadas na área agrícola e na área controle. $p= 0,07$, portanto não significativo ao nível de 0,05.

Referente aos dados de distribuição genética da enzima esterase foi possível identificar uma região de atividade enzimática que apresentou variação em *D. simulans* e *Z. indianus*. Outras regiões apresentaram-se com atividade enzimática fraca e não foram consideradas nesse estudo. Foram observados 4 alelos mais característicos nomeados: A, B, C, D (figuras 15 e 16).

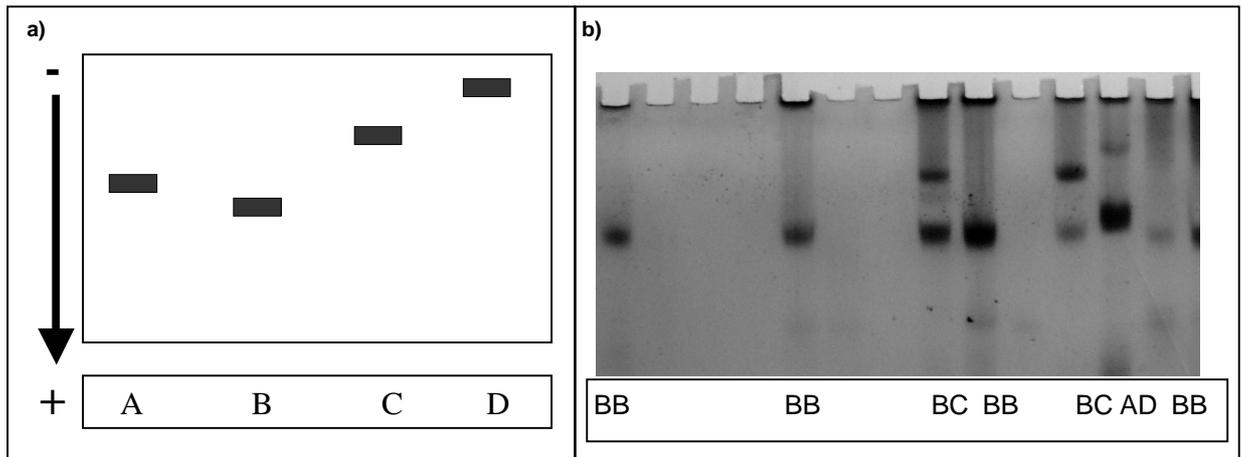


FIGURA 15 – a) Esquema da migração eletroforética dos alelos para *Drosophila simulans*. A – alelo 1.00, B – alelo 1.05, C – alelo 0.90, D – alelo 0.75. b) Foto e interpretação do gel de *Drosophila simulans*.

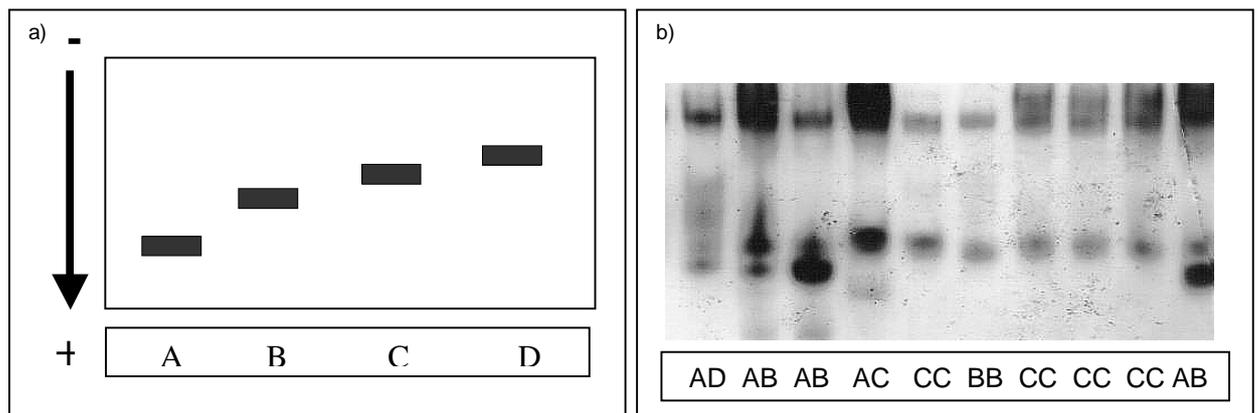


FIGURA 16 – a) Esquema da migração eletroforética dos alelos do loco 1 para *Zaprionus indianus*. A – alelo 1.00, B – alelo 0.94, C – alelo 0.80, D – alelo 0.75. b) Foto e interpretação do gel de *Zaprionus indianus*.

O alelo A foi o mais encontrado nas populações de *D. simulans* da área controle e da área agrícola (tabela XIII, figura 17). O alelo C foi o mais encontrado nas populações de *Z. indianus* das áreas controle e agrícola (tabela XIV, figura 18). O índice de heterozigosidade da área controle foi maior que o da área agrícola em ambas as populações.

TABELA XIII – Número de indivíduos, probabilidade, frequência alélica e heterozigiosidade(He) da enzima α -esterase em amostras de *D. simulans* coletadas no ecossistema de proteção ambiental (controle), proximidades da Fazenda Jampruca, rio da Casca, município de Chapada dos Guimarães comparando-se com resultado das amostras do ecossistema agrícola, Fazendas Felicidade e São Francisco, município de Campo Verde.

Ecossistemas	N	p	Alelos				He
			A	B	C	D	
Proteção Ambiental	67	0.004*	0.478	0.045	0.119	0.358	0.642
Agrícola	124	0.000**	0.480	0.121	0.185	0.214	0.435

N= número total, p=probabilidade, significativo a nível *p< 0,005, **p<0,001, A-alelo 1.00, B-alelo 0.95, C-alelo 0.90, D-alelo 0.85, He= heterozigiosidade média.

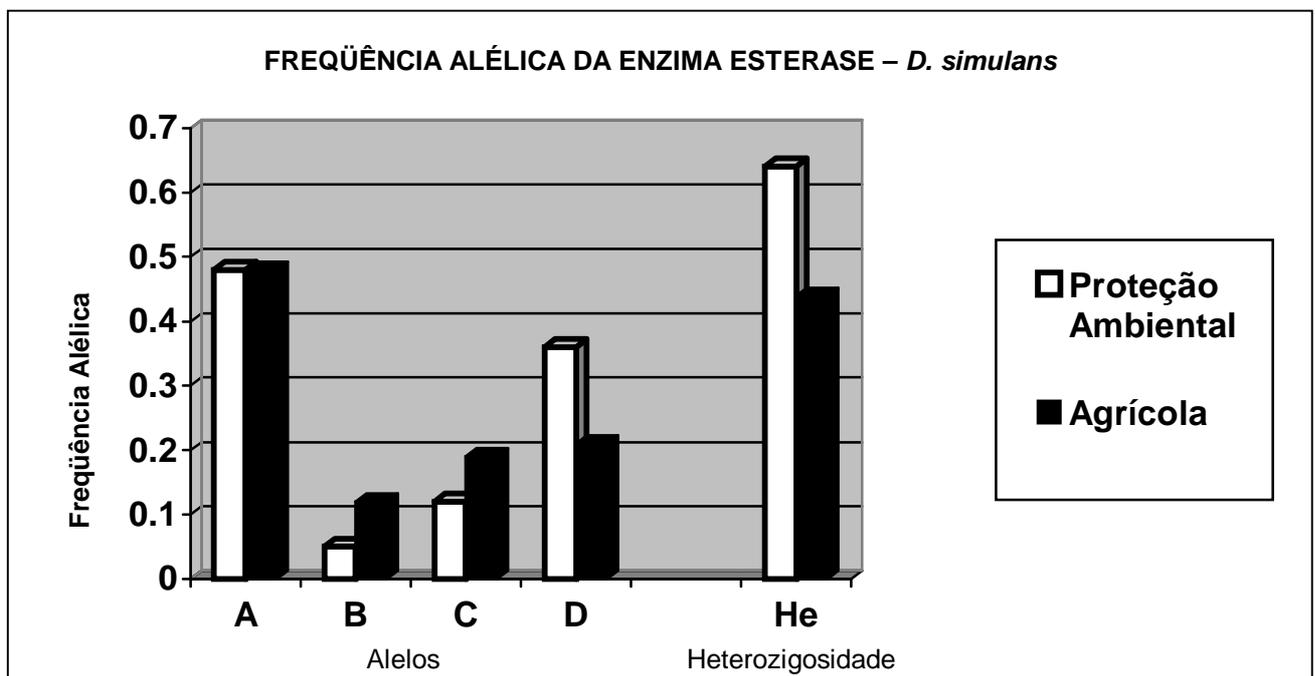


FIGURA 17: Frequência alélica e heterozigiosidade média (He) da enzima α -esterase em amostras de *D. simulans* coletadas no ecossistema agrícola, Fazendas Felicidade e São Francisco, município de Campo Verde, comparadas com resultado das amostras do ecossistema de proteção ambiental, proximidades da Fazenda Jampruca, rio da Casca, município de Chapada dos Guimarães. Alelos A, B, C, D.

TABELA XIV - Número de indivíduos, probabilidade, freqüência alélica, e heterozigidade média da enzima α -esterase em amostras de *Z. indianus* coletadas no ecossistema de proteção ambiental (controle), proximidades da Fazenda Jampruca, rio da Casca, município de Chapada dos Guimarães comparando-se com resultado das amostras do ecossistema agrícola, Fazendas Felicidade e São Francisco, município de Campo Verde.

Ecossistemas	N	p	Alelos				He
			A	B	C	D	
Proteção Ambiental	70	0.000**	0.207	0.193	0.414	0.186	0.457
Agrícola	145	0.000**	0.210	0.266	0.352	0.172	0.414

N= numero total, p=probabilidade, significativo a nível *p< 0,005, **p<0,001, A-alelo 1.00, B-alelo 0.95, C-alelo 0.90, D-alelo 0.85 , He= heterozigidade média.

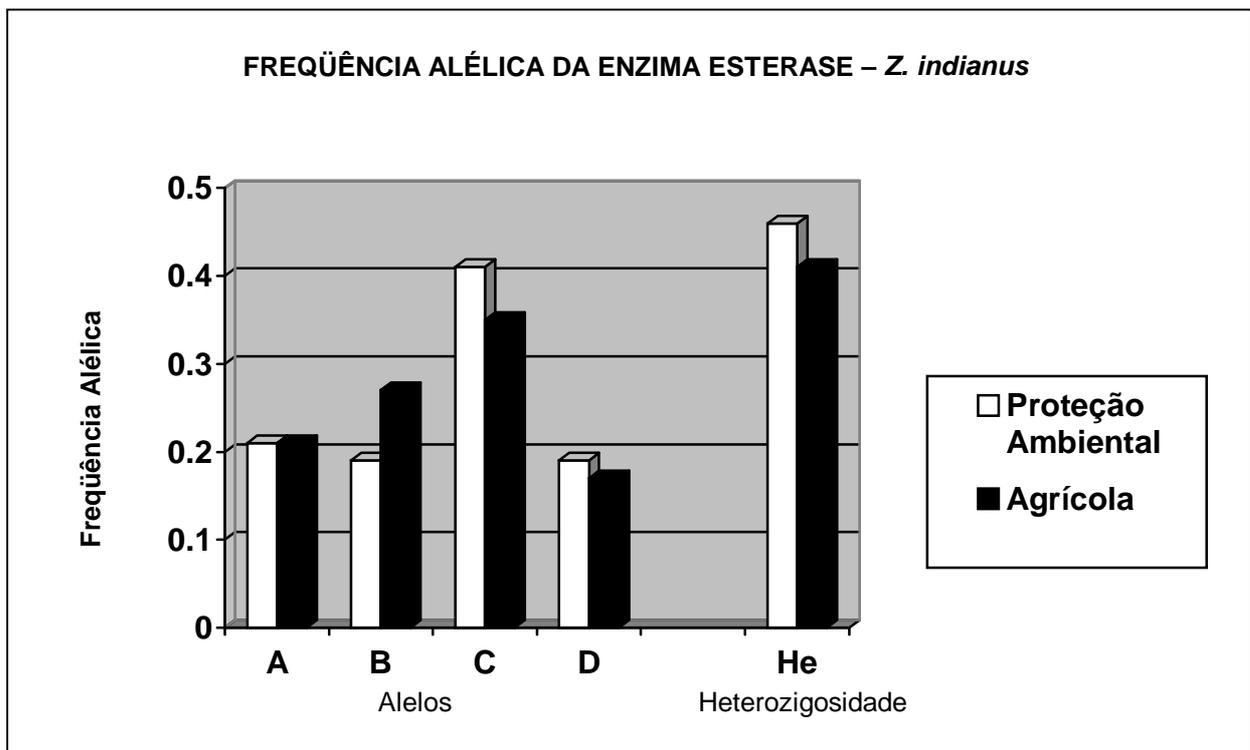


FIGURA 18 – Freqüência alélica e heterozigidade média (He) da enzima α -Esterase em amostras de *Z. indianus* coletadas no ecossistema agrícola, Fazendas Felicidade e São Francisco, município de Campo Verde, comparando-se com resultado das amostras do ecossistema de proteção ambiental, proximidades da Fazenda Jampruca, rio da Casca, município de Chapada dos Guimarães. Alelos A, B, C, D.

5 DISCUSSÃO

5.1 Perfil dos Agrotóxicos no Município de Campo Verde

Os agrotóxicos da classe dos herbicidas foram os mais comercializados no município de Campo Verde, em 2001, seguidos dos inseticidas, fungicidas e reguladores de crescimento (tabela VI). O grupo químico das glicinas (herbicida) foi o mais adquirido, sendo que os organofosforados e hidrocarbonetos também foram amplamente usados (tabela VII). Em relação ao nome químico, o glifosato e o 2,4-D (herbicidas); o endossulfam e o clorpirifós (inseticidas); o óleo mineral e o carbendazim (fungicidas) foram os mais comercializados.

Dentre os agrotóxicos mais comercializados no município de Campo Verde, no ano de 2001, o ácido fenoxiácetico, 2,4-D; o organoclorado, endossulfam; os organofosforados, clorpirifós e metamidofós; e o benzimidazol carbendazim merecem toda a atenção com relação aos seus efeitos danosos, sendo eles dos grupos I, II ou III, ou seja, são considerados extremamente, altamente e medianamente tóxicos, respectivamente, quanto à classificação toxicológica e altamente perigosos, muito perigosos e perigosos quanto à periculosidade ambiental (tabela VIII). Já o herbicida glifosato e o fungicida óleo mineral, que foram os mais utilizados no município de Campo Verde, em 2001, pertencem à classe toxicológica IV, pouco tóxico, porém em relação à periculosidade ambiental o glifosato (produto derivado do grupo das glicinas) é considerado perigoso (classe III).

A alta solubilidade do glifosato em água e baixa solubilidade em lipídios sugerem que ele não deveria bioacumular. O glifosato é pouco tóxico aos vertebrados e não permanece ativo no meio ambiente, ficando firmemente adsorvido tão logo atinge o solo (GRISOLIA, 2005). A atividade genética do glifosato tem sido

investigada em diferentes sistemas-teste. Os resultados de mutagenicidade são contraditórios, pois vários estudos apontam efeitos mutagênicos, enquanto em outros, não-mutagênicos. Essas diferenças podem ser explicadas pelos modelos experimentais utilizados e o tipo de formulação estudada (LI e LONG, 1988). Apesar de adsorver fortemente ao solo, o glifosato poderia contaminar águas subterrâneas quando às características do solo, tais como teor de argila e húmus, não favorecerem a adsorção (DORES, 2000).

O óleo mineral é um hidrocarboneto alifático, pouco tóxico, usado no combate de várias pragas: pulgão, lagartas, moscas, mosquitos, ácaros, ovos e larvas de insetos, tripes, mosca branca e viroses. O óleo pode ser adicionado em vários defensivos, melhorando sua efetividade (ANVISA, 2005).

O clorpirifós é um inseticida organofosforado e foi o terceiro mais comercializado no município de Campo Verde, em 2001. Seus produtos de degradação são menos tóxicos que o original. A sensibilidade das espécies a esse produto varia de acordo com o reino e filo: plantas e microrganismos terrestres apresentam certa tolerância, invertebrados aquáticos e larvas de insetos são bastante sensíveis, enquanto os peixes são menos sensíveis. Apresenta risco de mutagenicidade, pois induziu mutações em diferentes organismos testados. O principal alvo é o homem, pois no meio ambiente é pouco persistente (GRISOLIA, 2005). Os organofosforados apresentam uma toxicidade mais elevada para os vertebrados que os organoclorados, porém são mais instáveis (SANTOS, 2002; GARCIA, 1997).

O ácido 2,4 – diclorofenoxiacético, mais conhecido como 2,4-D, foi o quarto produto mais comercializado no município de Campo Verde, em 2001, sendo um herbicida dos mais utilizados no controle de plantas daninhas de folhas largas.

Assim como existem estudos que o consideram carcinogênico e teratogênico (IARC, 1985), outros são negativos (CHARLES *et al.*, 1999a, 1999b; GALLOPUD *et al.*, 1999). Alguns autores atribuem essas considerações à mistura na formulação comercial, que contém subprodutos de síntese, como as dioxinas, um composto clorado que é considerado carcinogênico e induz efeitos teratogênicos em roedores. Quando o ingrediente ativo 2,4-D foi utilizado puro não foram observadas tais toxicidades.

O quinto produto mais adquirido no município de Campo Verde, em 2001, foi o endossulfam, um inseticida organoclorado, considerado altamente bioconcentrável em peixes, muito tóxico para organismos terrestres, altamente tóxico para mamíferos (por via inalatória), altamente irritante aos olhos de mamíferos, medianamente tóxico para aves e altamente tóxico para abelhas (IPCS, WHO, 1984 citados por GRISOLIA, 2005). Quanto à mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, a maioria dos resultados são positivos (GUPTA *et al.*, 1978 citados por GRISOLIA, 2005; REUBER, 1980; QUIJANO, 2000).

O sexto produto mais comercializado no município de Campo Verde, em 2001, foi o carbendazim, o qual pertence à classe toxicológica II e classificação ambiental III. Dentre os agrotóxicos mais usados, é aquele que apresenta o menor risco de mutagênese. A maioria dos estudos apresentou resultado negativo (GRISOLIA, 2005).

O metamidófos foi o sétimo mais consumido no município de Campo Verde, em 2001. Esse inseticida sistêmico é organofosforado, pertence à classe toxicológica II, altamente tóxico e muito perigoso ao meio ambiente, classe II de ecotoxicidade, altamente tóxico a organismos aquáticos e altamente tóxico para

mamíferos, por via inalatória. Apresenta em geral os mesmos riscos de mutagênese que os organofosforados (ANDREI, 1999).

A preocupação principal com relação ao uso de agrotóxicos seria o seu potencial de causar problemas crônicos à saúde. É importante enfatizar que existe muita controvérsia com relação aos efeitos tóxicos crônicos dos agrotóxicos, principalmente quando consumidos em baixas doses ao longo de toda uma vida. Isto indica a necessidade de se desenvolver estudos sobre a presença de resíduos no ambiente e seus efeitos sobre a saúde (DORES, CARBO & ABREU, 2003).

De modo geral, a utilização de pesticidas na agricultura do município de Campo Verde decresce na seguinte ordem: herbicida > inseticida > fungicida > regulador de crescimento. Essa classificação e a grande maioria dos agrotóxicos apresentados na tabela VI, desse estudo, foram encontrados em vários trabalhos da literatura que verificaram a utilização de agrotóxicos em regiões de agricultura extensiva realizados no Mato Grosso.

A contaminação por pesticidas no ambiente (RIEDER, 1999; DORES, 2000), em alimentos (VIEIRA, 1999) e no leite humano (OLIVEIRA, 1997) tem sido estudada progressivamente no Mato Grosso, inclusive contemplando a região do Pantanal. Esses trabalhos têm como objetivo conhecer a periculosidade ambiental dos pesticidas que estão sendo utilizados em 24 dos 26 municípios da região norte da Bacia do Alto Paraguai; entre eles: Cáceres, Araputanga, Barra dos Bugres, Diamantino, Mirassol D'Oeste, Nobres, São José dos Quatro Marcos e Tangará da Serra.

BLUMENSCHHEIN (1995) desenvolveu um trabalho sobre a agricultura e o uso de pesticidas nos municípios de Jaciara e Campo Verde, MT; CAIRES & CASTRO (2002) fizeram um levantamento dos agrotóxicos usados por produtores

rurais do município de Alta Floresta – Mato Grosso, e constataram a presença de alguns dos mesmos agrotóxicos desse estudo. Segundo esses pesquisadores, mais da metade dos agrotóxicos usados pelos produtores de Alta Floresta são muito tóxicos, ao homem e ao meio ambiente.

Outro trabalho realizado em Mato Grosso analisou amostras de sedimento do rio Cuiabá e fez um levantamento de receitas agronômicas expedidas para pesticidas, que foram disponibilizadas pelo Instituto de Defesa Agropecuária de Mato Grosso (INDEA-MT), durante o período de 1999 a 2000, assim verificou-se que os pesticidas receitados, pertencentes à classe IV (Pouco Perigoso), representaram apenas 1,6% e geralmente são os herbicidas, portanto os pesticidas das classes I, II e III, quando somados, predominaram (ALVES, 1998).

DORES & DE-LAMÔNICA-FREIRE (1999) também destacaram alguns dos inseticidas e herbicidas, citados nesse estudo, que foram usados, em 1997, nas vizinhanças da cidade de Primavera do Leste, MT, município que se localiza a 100 Km de Campo verde. Alguns dos agrotóxicos, mencionados nesse estudo, foram encontrados em análises de águas superficiais e subterrâneas, tais como a atrazina, e no solo foi verificada a presença de metonil, atrazina, glifosato, clorimuron etil, imazetapir e clorpirifós.

LAABS *et al.* (1999) estudaram a percolação de pesticidas em latossolos de uma região nas proximidades do município de Primavera do Leste, com características semelhantes às do solo das regiões investigadas nesse estudo e observaram que aqueles que possuem maior mobilidade no ambiente eram: metomil, triadimefon, atrazina, metribuzina, simazina, clorimuron etil, imazetapir, flumetsulan, fomesafen, glifosato e metolaclor. Quanto à persistência no solo, os agrotóxicos clorpirifós etil, endosulfan, lambdacialotrina, tiofanate, metil, atrazina,

metribuzina, simazina, fomesafen, imazetapir e trifluralina, apresentam meia-vida no solo de um mês a mais de seis meses. Dentre estes, atrazina e seus metabólitos DIA (deisopropil-atrazina) e DEA (desetil-atrazina), simazina, metribuzina, clorpirifós etil, metolaclo e trifluralina têm sido encontrados com frequência em águas superficiais em diversos países. As triazinas podem chegar aos rios principalmente pelo escoamento superficial, pois elas podem ter uma interação tanto com a água como com as partículas do solo (EXTONET, 2003).

RITTER (1990) apresentou uma revisão da ocorrência de pesticidas em águas subterrâneas, na qual relata que mais de 70 princípios ativos já foram detectados em águas subterrâneas no Brasil. Dentre os pesticidas encontrados com maior frequência estão o alacloro, aldicarbe, atrazina, cianazina, metolaclo, metribuzina, simazina e EDB (1,2-dibromoetano). Esse pesquisador alerta para o risco de contaminação de águas subterrâneas próximas aos depósitos das empresas que comercializam pesticidas. Como pode ser citado um estudo realizado no estado de Iowa, onde a concentração máxima detectada de atrazina em área próxima ao local de carga e descarga de uma empresa foi $65 \mu\text{g.L}^{-1}$, de alacloro, $145 \mu\text{g.L}^{-1}$ e metolaclo, $50 \mu\text{g.L}^{-1}$. Estes valores são muito superiores ao máximo encontrado no mesmo estado, em áreas agrícolas: atrazina $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$; alacloro $0,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ e metolaclo $4,5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

A preocupação com a contaminação de águas subterrâneas é maior em áreas onde o lençol freático é pouco profundo, como em áreas alagadas, que é o caso do Pantanal. RIEDER (1999), em um estudo sobre a percolação do pesticida parationa metílica em solos da região de Cáceres - Mato Grosso, às bordas do Pantanal, constatou que este pesticida não percolava abaixo da camada de 5 cm do solo, porém destacou que nas áreas alagáveis o risco de contaminação do lençol

por esta substância deve ser considerado. CUNHA (2003) verificou as análises de resíduos de pesticidas em amostras de sedimento em alguns rios do Pantanal Mato-Grossense e os agrotóxicos que apresentaram concentrações mais elevadas foram o DDT, o endosulfan e o metoxicloro.

No município de Campo Verde, nasce o rio São Lourenço (figura 4) que percorre terrenos de grande erodibilidade, principalmente na bacia de seu maior afluente, o rio Vermelho. Ambos os rios correm diretamente para o Pantanal, ou seja, se houver uma contaminação nessas regiões isso pode ser transportado a esses rios e conseqüentemente ao Pantanal, que é considerada uma região de alta diversidade animal e vegetal (CUNHA, 2003).

Nas últimas décadas, o Pantanal mato-grossense vem sofrendo agressões pelo homem, praticadas não somente na planície, mas principalmente nos planaltos adjacentes. A implantação das culturas da soja, milho, arroz, algodão, dentre outros, ocasionou o uso de insumos agrícolas, como fertilizantes e pesticidas, cuja entrada no sistema ainda não foi quantificada e os efluentes urbanos, desenvolvidos nas áreas altas que circundam o Pantanal estão entre os principais fatores potenciais que podem estar causando alterações ambientais neste ecossistema e rios associados (EMBRAPA, 2001).

Estudos realizados pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) e pela Embrapa Pantanal detectaram, em uma análise preliminar, que os sedimentos e a água dos principais rios que atravessam regiões agrícolas e correm para o Pantanal, apresenta contaminação, embora, em proporções pequenas. Resultados semelhantes foram também encontrados num estudo publicado pelo Projeto Ecologia do Gran Pantanal, da UFMT, em parceria com a Universidade de Bayreuth, da Alemanha. Dos trinta e dois ingredientes ativos

pesquisados, vinte e dois apareceram pelo menos uma vez nos rios da sub-bacia do Rio Tenente Amaral e baía de Siá Mariana, no Pantanal mato-grossense. A maioria dos estudos, para autorização do uso dos agrotóxicos, são desenvolvidos em países de clima temperado, onde as características ambientais são bastante diversas do clima tropical (DORES, 2000).

Além do Pantanal, outra preocupação seria a proximidade das áreas agrícolas com as de grande biodiversidade, preservadas, nativas e conservadas como os Parques Nacionais. Estudo recente realizado em Mato Grosso na região de Chapada dos Guimarães mostrou que os pesticidas metolacoloro, simazina e atrazina exibiram potencial de lixiviação para camadas mais profundas do solo da região. Foi observado neste estudo que a meia-vida dos pesticidas estudados era substancialmente menor do que os dados publicados para regiões temperadas (LAABS, AMELUNG & ZECH, 1999).

Além de danos ao meio ambiente, causados pelo uso de agrotóxicos em larga escala, muitas áreas estão sendo desmatadas, para utilização na agricultura intensiva, pastagens cultivadas, garimpo e agroindústria. Com relação ao desmatamento, na região do Mato Grosso, por exemplo, para os municípios de Primavera do Leste e Campo Verde, havia uma área de 2.304,6 km² de vegetação natural contra 5.482,43 km² de área desmatada, até o ano de 1994. Observa-se então um alto índice de ocupação da região (UFMT, 1998).

Outro problema relacionado aos agrotóxicos é o destino e descarte inadequado ou reutilização das embalagens vazias, apesar da obrigatoriedade dos usuários de devolverem as embalagens aos estabelecimentos comerciais de responsabilidade das empresas produtoras após a tríplice lavagem, conforme a lei 9.974, de 6 de junho de 2002. Anualmente são comercializados 130 milhões de

unidades de embalagens de agrotóxicos e são recolhidas e destinadas adequadamente, somente 10 a 20%, apesar da fiscalização (PERES & MOREIRA, 2003). Além disso, uma via de exposição somatória denominada paraocupacional, envolve o transporte dos contaminantes, do local de trabalho para dentro de casa, em roupas ou pessoas. Estudos recentes revelam que essa forma atua como contribuinte para a contaminação residencial, no meio rural (CURL *et al.*, 2002).

Modelos de agriculturas estão relacionados entre decisões econômicas dos fazendeiros e os efeitos ecológicos destas práticas. Os fertilizantes requeridos para aplicação são calculados em função de rendimento estimado (AURICH *et al.*, 1998). Assim sendo, a boa prática agrícola, realimentada com pesquisas, promove a redução do risco de contaminação e de acidentes ambientais (RIEDER, 1999).

O presente estudo traça um perfil quantitativo e qualitativo, dos principais agrotóxicos utilizados em uma região de agricultura extensiva (município de Campo Verde), que está localizada adjacente a uma área de conservação e preservação ambiental (Parque Nacional de Chapada dos Guimarães). Com a utilização de questionários verificou-se o uso dos agrotóxicos nas fazendas, na safra 2004/2005, e os dados apresentados corroboram com o que foi encontrado na tabela VI e na literatura. No município de Campo Verde, ecossistema agrícola, as duas fazendas estudadas (São Francisco e Felicidade) são circundadas por outras, com o cultivo de milho, soja e algodão. Esses cultivos são os mais extensivos na região. Apesar da cultura do algodão utilizar mais agrotóxicos, durar mais tempo e conseqüentemente ter mais riscos de contaminação, a área plantada de algodão ainda é menor que a de soja.

A Fazenda São Francisco, onde foram plantados 680 ha de soja e 400 ha de milho, apresentou a maior área de cultivo e utilizou a maior quantidade de agrotóxicos

(tabela X), em relação às outras áreas do presente estudo. Tendo sido o herbicida diclosulam o mais utilizado. Segundo a ANVISA (2005), esse agrotóxico é de aplicação pré-emergente, do grupo químico das sulfonalinida triazolopirimidina e classe toxicológica III, ou seja muito perigoso. O diclosulam é muito usado na cultura da soja e o seu efeito residual é longo e pode prejudicar culturas em sucessão/rotação. Em um estudo sobre a persistência e fitotoxicidade de herbicidas aplicados na soja sobre o girassol em sucessão, verificou-se que a aplicação do diclosulam causou redução total do estande de girassol nas duas épocas de semeadura (BRIGHENTI *et al.*, 2002). A Fazenda Felicidade, ainda no ecossistema agrícola, destinou 70 ha ao plantio de soja e o maior consumo foi do inseticida organofosforado metamidofós. Nessa região, apesar de poucos hectares plantados, ocorreu o consumo de maior quantidade de agrotóxicos que a Fazenda Jampruca (tabela XI). A Fazenda Jampruca cultivou 112 ha de soja e o herbicida glifosato foi o mais utilizado.

5.2 Genotoxicidade

5.2.1 Pesquisa de micronúcleos em anfíbios

A frequência média de micronúcleos encontrada nos anfíbios coletados na área controle de 0,013% não difere estatisticamente daqueles animais coletados nas áreas agrícolas, que é de 0,069%, sendo $p= 0,0711$ o resultado da prova de Fisher, maior que o nível de significância, $\alpha= 0,05$, portanto esse dado apresentado considera que não há uma relação direta do uso de agrotóxicos com a presença de micronúcleos em células de anfíbios, o que implicaria em mutagenicidade e impacto ambiental. Apesar da diferença entre as médias ser grande, isto é 0,4 contra 2,1, observa-se na tabela XII que o desvio padrão foi mais alto do que as médias, o que

representa alta variabilidade interindividual nas freqüências de micronúcleos. As práticas agrícolas continuam em expansão e efeitos tardios, ou seja, crônicos, podem aparecer, o que alerta para a necessidade de se continuar um monitoramento com dados de campo para controle dos possíveis danos.

O número de células micronucleadas variou de 01 a 08 nos anfíbios estudados. MEIER, WERNING & TORSELLA (1999) e ZUNIGA-GONZÁLEZ *et al.*, (2000) descreveram estudos de mutagênese utilizando a técnica de micronúcleos com mamíferos, aves, répteis e outros animais silvestres em campo e os valores de células micronucleadas variaram entre 01 e 13 dentro de uma mesma espécie.

Segundo GRISOLIA (2005), as práticas agrícolas extensivas são altamente impactantes ao meio ambiente e diretamente relacionadas à redução da biodiversidade. Assim, o aumento na taxa de mutações elevaria a carga genética diminuindo o valor adaptativo e em consequência, eliminando os genótipos suscetíveis. Um dos exemplos desse processo é o aparecimento de animais com deformidades e o declínio das populações de anfíbios. Os agricultores que responderam ao questionário, desse estudo, observaram tal declínio. Mas não foi utilizada nenhuma avaliação, com métodos científicos, para verificar a taxa populacional desses animais. Na região estudada não é comum o aparecimento de animais com deformidades, tendo sido encontrado apenas um animal sem a presença de uma das patas, mas sem relação com aumento de células micronucleadas. Segundo AURICH *et al* (1998), sabe-se que os anfíbios têm um comportamento especial na ecologia, pois vivem em ambiente aquático e após a metamorfose migram para ambientes terrestres e movem-se em curto tempo por longas distâncias. Há dados na literatura de práticas agrícolas relacionadas à

migração de anfíbios. Além disso a reprodução (ambiente aquático) e a hibernação (ambiente terrestre) podem ser afetadas com o uso de pesticidas.

As formulações dos agrotóxicos são misturas complexas que incluem os ingredientes ativos, vários tipos de solvente, umidificantes, emulsificantes e aditivos. Além disso, dependendo do tipo de praga e época da cultura é comum o uso de formulações combinadas. Isso torna a exposição complexa e o biomonitoramento difícil de ser acompanhado. Os efeitos tóxicos dessas exposições complexas são desconhecidos e as informações sobre os ingredientes ativos insuficientes para avaliar tal mistura que pode representar um risco com efeitos adversos à saúde (FALCK *et al.*, 1999). Em relação a estudos genotóxicos, a determinação das alterações citogenéticas nos indivíduos expostos pode ser utilizada como marcador de efeito biológico (SPADOTTO *et al.*, 1996).

ARAÚJO *et al.* (2000), estudaram o impacto dos pesticidas na saúde e revelaram que os trabalhadores que lidam com esses compostos em lavouras de tomates necessitam de ações que visem à proteção da saúde dos mesmos e de medidas contra os danos para o meio ambiente. Não somente os agricultores, como a população em geral, desconhecem o potencial de contaminação produzido pelos pesticidas, sendo vítimas dessas contaminações, tanto nos lares, como no meio rural. É evidente, então, a necessidade de mais estudos, tanto sobre pesticidas no ambiente, como sobre seus efeitos sobre a saúde humana, para orientar os legisladores e órgãos fiscalizadores.

Em estudos para determinar a prevalência de micronúcleos em trabalhadores agrícolas expostos a agrotóxicos em Passo Fundo, RS, PACHECO & HACKE, (2002) observaram uma frequência duas vezes maior de micronúcleos em trabalhadores expostos do que em populações controle que trabalhavam em

escritório. O biomonitoramento citogenético realizado em células somáticas é considerado uma ferramenta importante para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de uma determinada exposição (KOIFMAN & HATAGIMA, 2003).

São poucos os estudos que comprovam o potencial de carcinogenicidade em seres humanos, pois os dados apresentados até hoje são, segundo NUNES E TAJARA (1998), insuficientes. A grande maioria desses estudos são realizados principalmente com ensaios de laboratório, em animais, tornando-se difícil avaliar esta relação, uma vez que, para o homem, sendo susceptível a outros tipos de contaminação podem existir alguns interferentes que mascaram o resultado das análises.

Além disso, muitos programas de monitoramento são efetuados com dezenas de compostos, o que aumenta o tempo e custo das análises, dificultando sua operação. Enfocar as classes de pesticidas mais empregadas e os compostos com riscos reais de contaminação (quantidades aplicadas, propriedades dos compostos, produção agrícola e condições climáticas) pode facilitar o monitoramento de áreas expostas aos pesticidas (LARA & BATISTA, 1992).

Esses estudos foram realizados em humanos (agricultores), mosquitos (*Aedes aegypti*, *Anopheles*) e em espécies de drosofilídeos (TERRIERE, 1984; KALISTE-KORHONEN *et al.*, 1998 citados por SOUZA-POLEZZI & BICUDO, 2004).

5.2.2 Pesquisa de variabilidade genética em drosofilídeos

Foi possível identificar uma região de atividade enzimática que apresentou variação em *D. simulans* e *Z. indianus*. Outras regiões apresentaram-se com atividade enzimática fraca e não foram consideradas nesse estudo. Foram observados 4 alelos mais característicos nomeados: A, B, C, D. PARKASH (1980),

estudou drosofilídeos da espécie *Zaprionus paravittiger* e verificou que ocorriam três zonas de atividade, sendo que uma apresentava variação e as outras duas, pouca ou nenhuma variação.

O alelo A foi o mais encontrado nas populações de *D. simulans* da área controle e da área agrícola e o alelo C foi o mais encontrado nas populações de *Z. indianus* em ambas áreas. O índice de heterozigosidade média (H_e) da área de proteção foi maior que o da área agrícola em ambas as populações. Assim, verifica-se que as populações da área de proteção estão mais adaptadas ao local que as populações do ecossistema agrícola, o qual sofre mudanças e impactos ambientais devido à ação antrópica de prática agrícola com o uso de agrotóxicos.

A heterozigosidade é aceita como sendo o mecanismo primário pelo qual a seleção natural mantém a variação em populações naturais. Estudos de BELFIORI & ANDERSON (2001), corroboram com esse fato, ao demonstrarem que em populações expostas a agrotóxicos houve perda de heterozigosidade, isto é, perda da diversidade genética nas espécies. A vantagem do heterozigoto pode ser seletiva para esses indivíduos, selecionando indivíduos menos suscetíveis a determinado contaminante.

Segundo FUTUYMA (1992), os diversos mecanismos de evolução incluem a seleção natural, que é responsável pelas adaptações dos organismos a diferentes ambientes. A sobrevivência ou reprodução superior de algumas variantes genéticas em comparação com outras, sob quaisquer condições ambientais que estejam prevalecendo no momento. Assim como os ambientes variam, também o fazem os agentes da seleção natural.

Uma série de investigações mostrou que o polimorfismo genético pode ser mantido em insetos que apresentem preferência por diferentes habitats

(TAYLOR, 1975 citado por ALBUQUERQUE & NAPP, 1981). TAYLOR & POWELL, (1977) descreveram populações de *D. persimilis* que separadas por uma distância de uns 100m, exibiram diferenças nas frequências de aloenzimas. Uma situação similar descrita por RICHMOND 1978, ocorreu com espécies de *D. affins* em uma área de 75x40m (ALBUQUERQUE & NAPP, 1981).

ALBUQUERQUE & NAPP (1981) analisaram a variabilidade genética de populações naturais de *Drosophila simulans*, em gel de eletroforese, para verificar a possibilidade da relação entre genótipo e ambiente que explicasse a manutenção da variação. Eles avaliaram as frequências alélicas de um locus da esterase-6, em machos adultos que foram coletados em bananeiras e outras árvores frutíferas, em diferentes regiões. Foi verificado um polimorfismo significativo entre as regiões, comparando-se as mesmas espécies de árvores. *D. simulans* é uma espécie com grande habilidade de colonização e mantém populações com grande número de indivíduos, o suficiente para prevenir trocas ao acaso. Além disso a ampla distribuição geográfica e os numerosos nichos explorados por esses drosofilídeos sugerem que alguns polimorfismos são necessários para uma significativa adaptação.

O padrão de bandas e a atividade das esterases em diferentes populações e espécies são bastante variáveis. Em uma população brasileira de *Z. indianus*, GALEGO *et al.* (2003) encontraram um alto grau de polimorfismo para esterases e constataram a existência de pelo menos seis locos codificadores: Est-1, Est-3, Est-4 e Est-6 que codificam α -esterases, e Est-3 e Est-5, que codificam β -esterases. O loco Est-3 apresentou quatro alelos (Est-3¹, Est-3², Est-3³, e Est-3⁴) e foi o mais polimórfico naquela população, o que o torna bom marcador genético para estudos envolvendo variação geográfica e/ou temporal (LAPENTA, 1998).

Diversos estudos bioquímicos mostram que as aloenzimas diferem em propriedades funcionais e que essas diferenças correspondem à prevalência de alelos distintos nas populações que vivem em ambientes variados e que estas variantes enzimáticas afetam o valor adaptativo, enquanto outros, ao contrário, indicam que variantes aloenzimáticas são seletivamente neutras (YAMAZAKI, 1984 citado por LAPENTA, 1998).

O risco de danos genéticos não depende apenas do potencial genotóxico dos agentes ambientais, mas também da capacidade individual de defesa contra efeitos adversos desses agentes (SRAM, 1998). Deve-se considerar o perfil metabólico dos organismos, pois alguns estudos têm evidenciado que as enzimas metabolizadoras de xenobióticos parecem estar associadas a uma maior ou menor suscetibilidade à exposição aos efeitos genotóxicos dos produtos. A presença de maior atividade das enzimas desintoxicadoras, por exemplo, protegeriam as células (WATSON *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de resistência genética aos inseticidas pode ser entendido por mecanismos qualitativos, quando o inseto possui variantes genéticas (alelos) que codificam enzimas de alta atividade detoxificadora, como esterases, oxidases e glutatona S-transferases. As variantes podem surgir por mutações espontâneas e espalhar-se na população, essas isoenzimas, que podem ser dominantes ou co-dominantes, degradam o agrotóxico antes que ele cause danos ao inseto levando a um aumento do potencial adaptativo (GRISOLIA, 2005).

Os drosofilídeos são alvos raros para os inseticidas, contudo algumas populações têm desenvolvido resistência a uma variedade de compostos químicos e esses alelos resistentes persistem em frequência alta. Insetos são utilizados para estudos dos mecanismos bioquímicos e genéticos que desenvolve a resistência a

inseticidas, incluindo estudos do sítio ativo e mudanças na conformação das moléculas, mutações pontuais e polimorfismo de enzimas (WILSON, 2001).

O uso continuado de inseticidas organofosforados tem propiciado em drosofilídeos e outros insetos, o surgimento de resistência a esses compostos. Mecanismos de resistência metabólica, mediados por esterases, têm evoluído em muitas espécies de insetos. No sistema nervoso do inseto, a acetilcolinesterase é uma enzima chave, uma vez que o sistema colinérgico é essencial para esses organismos. Os organofosforados e carbamatos ligam-se covalentemente ao sítio ativo dessa enzima, causando a morte do inseto (ALDRIGE, 1953 citado por LAPENTA, 1998).

Devido à inexistência de dados de qualquer natureza sobre o uso de agrotóxicos e contaminação na região, este estudo teve caráter exploratório. Embora permaneçam muitos pontos para serem esclarecidos, o presente trabalho levanta uma série de questões importantes que suscitam a continuidade dos estudos das esterases. Os resultados descritos revelam a importância de pesquisar os efeitos adversos dos agrotóxicos no ambiente e nos seres vivos. Faz-se necessário um aumento da produção científica nessa área, para haver um aprofundamento do tema que faz parte da realidade do nosso País, e que medidas voltadas para intervenção sanitária legal na prevenção dos efeitos maléficos associados à exposição ambiental aos agrotóxicos possam ser tomadas adequadamente.

Os pesticidas podem ser bastante úteis na produção agrícola, especialmente quando o clima favorece o desenvolvimento de pragas. Contudo, o seu uso deve ser orientado por profissionais da área, respeitando-se a legislação vigente e a saúde da população. Para esses fins, as pesquisas na área de agrotóxicos vêm caminhando na direção da obtenção de compostos cada vez

menos tóxicos para os seres vivos. Os agricultores estão propensos a aderir a um modelo de agricultura ambientalista e dessa maneira assimilar práticas conservacionistas e agroecológicas (SANCHES *et al.*, 2003).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo destaca a importância do uso de espécies nativas, coletadas *in loco*, para serem utilizadas como bioindicadores de danos ambientais acarretados por atividades antrópicas altamente impactantes. Alerta também sobre os cuidados metodológicos que devemos tomar para que os resultados observados realmente retratem a realidade sobre o que se passa no campo. A ecogenotoxicologia deve ser abordada multidisciplinarmente, utilizando-se concomitantemente várias metodologias, para se avaliar uma situação com mais segurança, uma vez que os resultados de genotoxicidade precisam ser apoiados por outras muitas informações.

A primeira abordagem dessa pesquisa foi a de traçar um perfil quantitativo e qualitativo dos principais agrotóxicos utilizados em uma região de agricultura extensiva, que está localizada adjacente a uma área de proteção ambiental. Constatou-se que o uso intenso de agrotóxicos de classes I, II e III proporciona um alto risco ambiental, especialmente para uma região de alta biodiversidade, que é o Parque Nacional de Chapada dos Guimarães, além do pantanal matogrossense.

A frequência média de micronúcleos encontrada nos anfíbios coletados na área controle de 0,013% não difere daqueles animais coletados nas áreas agrícolas, que é de 0,069%. Observou-se uma variabilidade interindividual muito grande no número de micronúcleos entre os exemplares coletados em ambos os ecossistemas, refletida nos altos valores do desvio padrão. Isso demonstra que o monitoramento biológico, usando espécies locais, dever ser conduzido em uma outra escala de amostragem, bem maior que a utilizada nesse estudo. Ou, por outro lado, que os anfíbios nesse estudo não acusaram efeitos genotóxicos. Outra indagação

que também fica é a seguinte: os agrotóxicos utilizados realmente atingiram os anfíbios?

O índice de heterozigosidade média encontrado no ecossistema da Chapada dos Guimarães foi maior do que no ecossistema agrícola em ambas as populações de drosofilídeos. Assim, pode-se verificar que o ecossistema agrícola pode exercer uma influência na estrutura genética de comunidades de drosofilídeos, possivelmente estreitando a base genética. Com esses dados, demonstra-se que os drosofilídeos podem ser usados como organismos sentinelas para avaliar os impactos ambientais causados por pesticidas, usados na agricultura.

7. CONCLUSÕES

- Os produtos mais comercializados em Campo Verde – MT, no ano de 2001 foram os herbicidas glifosato e o 2,4-D, além dos inseticidas endossulfam e metamidófos.
- Em relação a genotoxicidade, a frequência média de micronúcleos encontrada nos anfíbios coletados na área controle (0,013%) não diferiu dos animais coletados na área agrícola (0,069%). Observou-se grande variabilidade interindividual no número de micronúcleos entre os exemplares coletados em ambos os ecossistemas, refletida nos altos valores do desvio-padrão.
- O índice de heterozigosidade média encontrado no ecossistema da Chapada dos Guimarães mostrou-se maior do que no ecossistema agrícola, em ambas as populações de drosofilídeos, indicando influência do ecossistema agrícola na estrutura genética dessas comunidades, possivelmente estreitando a base genética. Tais dados evidenciam que os drosofilídeos podem ser usados como organismos sentinelas para avaliar impactos ambientais causados por pesticidas.

8. RECOMENDAÇÕES

- Ampliar o número de anfíbios já amostrados em ambas as áreas.
- Incluir uma outra espécie, como por exemplo de um réptil como as *Mabuias*, para dar mais consistência ao biomonitoramento usando espécies locais.
- Realizar um estudo semelhante após a inclusão do cultivo de alimentos transgênicos e comparar com os dados desse estudo.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS SEGUNDO A NBR – 6023/2002 (ABNT)

- 1 ACQUAVELLA, J., DOE, J., TOMENSON, J., CHESTER, G., COWELL, J., BLOEMEN, L. Epidemiologic studies of occupational pesticide exposure and cancer: regulatory risk assessments and biologic plausibility. **Ann. Epidemiol.** 13(1): 1-7, jan. 2003.
- 2 ALBUQUERQUE, C., M., R. de; NAPP, M. Genetic variability at the esterase-6 locus in natural populations of *Drosophila simulans* in relation to environmental heterogeneity. **Genetics** 98: 399-407. 1981.
- 3 ALDRIDGE, W. N. & REINER, E. Enzyme Inhibitors as Substrates, Elsevier/North Holland Publishing Company, Amsterdam 1972.
- 4 ALVES, B. V. **Resíduos de Pesticidas Organoclorados em Sedimentos da Bacia do rio Cuiabá, Mato Grosso** (Dissertação ao curso de pós – graduação no Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal do Mato Grosso). p. 70. 1998.
- 5 ANDREI, ORGANIZAÇÃO ANDREI EDITORA LTDA. **Compêndio de defensivos agrícolas**: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. São Paulo, SP. 6. Ed. 1999.
- 6 ANVISA (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Programa de análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos: relatório anual 04/06/2001-30/06/2002**. Brasília, 2002.
- 7 ANVISA, (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **SIA (Sistema de informações sobre agrotóxicos)**. Disponível na internet: www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_ingrediente.asp?iVarAux=1&CodIng=42 (acesso em julho de 2005).
- 8 ARAÚJO, A. C. P., NOGUEIRA, D. P., AUGUSTO, L. G.S Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate. **Rev. Saúde Pública**, vol.34, no.3, p.309-313.,Jun, 2000.
- 9 ASSESSORIA DE IMPRENSA. PREFEITURA DE CAMPO VERDE. Disponível na internet: <http://www.campoverde.mt.gov.br/index.php> (acesso em 24 de janeiro de 2006).
- 10 AUGUSTO, L. G. Da S., LIEBER, S. R., RUIZ, M. A., SOUZA, C. A. De. Micronucleus Monitoring to Asses Human Occupational Exposure to Organochlorides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 29:46-52. 1997.

- 11 AURICH, M. A., ZANDER, P., WERNER, A., ROTH, R. Developing agricultural land use strategies appropriate to nature conservation goals and environmental protection. **Landscape and Urban Planning**. 41 119-127. 1998.
- 12 AYRES, M.; AYRES, M. JÚNIOR, AYRES, D. L., SANTOS, A. de A. S. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém/PA: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília/DF: CNPq. 272 p. (Acompanha CDROM). 2000.
- 13 BELFIORE, N. M., ANDERSON, S. L. Effects of contaminants on Genetic Patterns in Aquatic organisms: a review. **Mutation Research**, 489: 97-122. 2001.
- 14 BENNER, S. E, LIPPMAN, S. M, WARGOVICH, J. Micronuclei, a biomarker for chemoprevention trials: results of a randomized study in oral pre-malignancy. **Int J Cancer** 59:457-9. 1994.
- 15 BLUMENSCHNEIN, M. A agricultura modernizada do cerrado e sua significância para o desenvolvimento sustentável na região do Pantanal. In: KOHLHEPP, G. **Mensch-Umwelt-Beziehungen in der Pantanal-Region von Mato Grosso, Brasilien**. Beiträge zur angewandten Umweltforschung- Tübinger Geogr. Studien 114. IB Zc 40 B, 107, p. 221-246, 1995.
- 16 BRASIL. Ministério da Agricultura. **Legislação federal de agrotóxicos e afins** – Brasília:, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal, 184 p. 1998.
- 17 BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo para Atenção Básica em Saúde do Trabalhador Brasília**, 1999.
- 18 BRIGHENTI, A. M., MORAES, V. J., OLIVEIRA JÚNIOR, R. S. DE, GAZZIERO, D. L. P., BARROSO, A. L. L., GOMES, J. A. Persistência e fitotoxicidade de herbicidas aplicados na soja sobre o girassol em sucessão. **Pesq. agropec. bras**, Abr, vol.37, no.4, p.559-565. 2002
- 19 BURKHART, J. G., GADNER, H. S. Non-Mammalian and environmental Sentinels in Human Health: Back to the Future? **Human and Ecological Risk Assessment**: vol. 3, no. 3, pp. 309-328. 1997.
- 20 BUZATTI, W. J. de S. Controle de plantas daninhas no sistema plantio direto na palha. In: PAULETTI, V.; SEGANFREDO, R. **Plantio direto**: atualização tecnológica. São Paulo: Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999. p. 97-111.
- 21 CAIRES, S. DE M. & CASTRO, J. G. D. Levantamento dos agrotóxicos usados por produtores rurais do município de Alta Floresta – Mato Grosso. **REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA**, Volume 2- Número 1 - 2º Semestre. 2002.

- 22 CAMPBELL, P. M., ROBIN, G. C. de Q., COURT, L. N., DORRIAN, S. J., RUSSEAL, R. J., OAKESHOTT, J. G. Developmental expression and gene/enzyme identifications in the alpha esterase gene cluster of *Drosophila melanogaster*. **Insect Molecular Biology**, 12 (5), 459-471. 2003.
- 23 CHARLES, M. J.; CUNNY, H. C.; WILSON, R. D.; IVETT, J. L.; MURLI, H.; BUS, J. S.; GOLLAPUDI, B. *In vivo* micronucleus assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. **Mutation Res.**, v 444 p. 227-234, 1999b.
- 24 CHARLES, M. J.; CUNNY, H. C.; WILSON, R. D.; LAWLOR, T. E.; BUS, J. S.; CIFONE, M. A.; FELLOWS, M.; GOLLAPUDI, B. Ames assay and unscheduled DNA synthesis assay on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. **Mutation Res.**, v. 444 p. 207-216, 1999a.
- 25 CUNHA, M. L. F. **Determinação de resíduos de Pesticidas em Sedimentos dos Principais rios do Pantanal Mato-Grossense por CG/EM**. Dissertação (Mestrado) – UFMT, Cuiabá. 2003.
- 26 CURL, C. L., FENSKE, R. A., KISSEL, J. C., SHIRAI, J. H., MOATE, T.F., GRIFFITH W., et al. Evaluation of take-home organophosphorus pesticide exposure among agricultural workers and their children. **Environ Health Perspect.** 110:A787–792. 2002.
- 27 D' ARCE, L. P. G., CÓLUS, I. M. DE S. Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis** 20:161-170. 2000.
- 28 DEGRANDE, P. E., **Guia prático de controle de pragas do algodoeiro**. Dourados, UFMS, 60p. 1998.
- 29 DEPLANE, K. S. **Pesticide usage in the United States: history, benefits, risks, and trends, 2000**. Disponível na internet: <http://www.ces.uga.edu/pubs/PDF/B1121.pdf> (acesso em 08 de janeiro de 2003).
- 30 DORES, E. F. G. C., DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: Vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no Ambiente Aquático. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 9, p. 1-18, 1999.
- 31 DORES, E. F. G. C. **Contaminação por Pesticidas das águas usada para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso**. 204p. Dissertação (Mestrado) – UFMT, Cuiabá. 2000.
- 32 DORES, E. F. G. C., CARBO, L., ABREU, A. B. G. de. Serum DDT in malaria vector control sprayers in Mato Grosso State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Apr, vol.19, no.2, p.429-437. 2003.

- 33 EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Impactos ambientais e sócio-econômicos no Pantanal**. Disponível na internet: <http://www.cpap.embrapa.br/impacto.html> (acesso em 16 de agosto de 2001).
- 34 ESSER, H. D., HEMINGWAY, R. J., KLEIN, W., SHARP, D. B., VONK, J. W., HOLLAND, P. T. Recommended approach to the evaluation of the environmental behaviour of pesticide. **Pure and Appl. Chem.**, v. 60, n. 6, p. 901-932, 1998.
- 35 EXTTOXNET, Extension toxicology network. **Movement of pesticide in the environment** (online). Disponível na internet: <http://pmep.cce.cornell.edu/profile/exttoxnet/TIB/movement.html> capturado em 05 de julho de 1998.
- 36 FALCK, G. C., HIRVONEN, A., SCARPATO R., SAARIKOSKI S.T., MIGLIORE L. & NORPPA, H. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. **Mut. Res.**, 17, 441(2): 225-237. 1999.
- 37 FERREIRA, J. C. V. **Mato Grosso e seus Municípios**. Editora da Secretaria de Estado da Cultura, 668p. 1997.
- 38 FOLHA ON LINE, 2005, disponível no endereço eletrônico: www1.folha.uol.com.br/folha/turismo/americano. (Consultado em 25 de maio de 2005).
- 39 FORGET, G. Pesticides and the Third World. **J Toxicol Environ Health**, Jan;32(1):11-31. 1991.
- 40 FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**, Soc. Brasil. Genét., Ribeirão Preto SP. 631p. 1992.
- 41 GALEGO, L. G. C. ; CARARETO, C. M. A. ; CERON, C. R. . Caracterização das esterases em *Zaprionus indianus*. In: 49o. Congresso Nacional de Genética, 2003, Águas de Lindóia, SP. CD-ROM de Resumos do 49o. Congresso Nacional de Genética, 2003.
- 42 GALLOPUD, B. B.; CHARLES, J. M.; LINScombe, V. ^a; DAY, S. J.; BUS, J. S. Evaluation of the genotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives in mammalian cell cultures. **Mutation Res.**, v. 444 p. 217-225, 1999.
- 43 GARCIA, J. E. **Introducción a los praguicidas**. São José, Costa Rica: Editora Estatal a Distância, p. 25-26, 1997.
- 44 GRISOLIA, C. K.; FERRARI, I. In vitro and in vivo studies demonstrate non-mutagenicity of the herbicide metolachlor. **Braz. J. Genet.** V. 20, n. 3. Ribeirão Preto, Sept. 1997.

- 45 GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. . VARIABILITY IN MICRONUCLEUS INDUCTION WITH DIFFERENT MUTAGENS APPLIED TO SEVERAL SPECIES OF FISH. **Genetics and Molecular Biology**, Brazil, v. 23, n. 1, p. 235-239, 2000.
- 46 GRISOLIA, C. K. ; PALHARES, D. . Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, Brazil, Ribeirao Preto, v. 25, p. 281-284, 2002.
- 47 GRISOLIA, C. K. . A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, Holanda, v. 518, p. 145-150, 2002.
- 48 GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Editora da Universidade de Brasília, 392 p. 2005.
- 49 GRZYBOWSKA, E., BUTKIEWICZ, D., MOTYKIEWICZ, G., CHORAZY, M. The effect of the genetic polymorphisms of CYP1A1,CYP2D6, GSTM1 and GSTP1 on aromatic DNA adduct levels in the population of healthy women. **Mutation Research**. Sep 20;469(2):271-7. 2000.
- 50 HAYASHI, M., TAKESHI, M., KODAMA, Y., TOSHIO, S., ISHIDAT JR, M. The Micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, 245: 245-249. 1990.
- 51 IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man**, Lyon. v. 15, 1985.
- 52 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal** [on line], São Paulo, 18 jun. 2004. Disponível: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=11> [Acesso em 18 jun. 2004].
- 53 KAROTAM, J. OAKESHOTT, J. G. Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. **Heredity**. Jul;71 (Pt 1):41-50. 1993.
- 54 KLEINJANS, J. C.S., SCHOOTEN, F. J. V. Ecogenotoxicology: The evolving field. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 11, 173-179. 2002
- 55 KOIFMAN, S.,HATAGIMA, A. Exposição aos agrotóxicos e Câncer Ambiental. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro. 384p. 2003
- 56 LAABS, V., AMELUNG, W., ZECH, W. Multi-residue analysis of corn and soybean pesticides in Brazilian oxisoils using gas chromatography and selective detection. **Journal of environmental quality**, v. 28 Bayreuth, Germany, p. 1778-1786, 1999.

- 57 LAPENTA, A.S. **Caracterização de espécies de *Drosophila* do "cluster" buzzatii com base nos padrões de esterases.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 1998.
- 58 LARA, W. H., BATISTA, G. C. Pesticidas. **Química Nova**, v. 2, n. 15, p. 161-165, 1992.
- 59 LI, A. P.; LONG, T. J. An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 10 n. 3 p. 537-546, 1988.
- 60 MEIER, J. R., WERNING, P., TORSELLA, J. Feasibility of Micronucleus Methods for Monitoring Genetic Damage in Two Feral Species of Small Mammals. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 33: 219-225. 1999.
- 61 MUÑOZ, N., HAYASHI, M., BANG, L. J. Effect of riboflavin , retinol and zinc on micronuclei of buccal mucosa and of esophagus: a randomized double-blind intervention study in China. **J Natl Cancer Inst**; 79:687-91. 1987.
- 62 myweb.uiowa.edu/ bballard/Dsimulans.htm. Phenotypic differences between *Drosophila simulans* and *D. melanogaster*. On line. Disponível: <http://www.myweb.uiowa.edu/bballard/Dsimulans.htm> [Acesso em jun. 2005].
- 63 NUNES, G. S. **Análise de inseticidas N-metilcarbamatos em amostras vegetais, empregando técnicas cromatográficas, imunoensaio ELISA e biossensores amperométrico.** Araraquara-SP (Tese de doutorado em química apresentada ao instituto de Química da Universidade Paulista "Julio de Mesquita Filho", UNESP, em Araraquara, SP). p. 2, 1999.
- 64 NUNES, M. V., TAJARA, E. H. Efeitos Tardios dos Praguicidas Organoclorados no homem. **Revista de Saúde Pública**, 32 (4): 372-383, 1998.
- 65 OAKESHOTT, J. G. VAN PAPENRECHT, E. A. BOYCE, T. M.; HEALY, M. J.; RUSSEL, R. J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica**.;90(2-3):239-68. Review. 1993.
- 66 OLIVEIRA, M.A.G. **Níveis de resíduos de praguicidas organoclorados no leite de mães de uma população de Cuiabá, Mato Grosso.** Dissertação (Mestrado) – ISC-UFMT, Cuiabá. 1997.
- 67 OLIVEIRA-SILVA, J. J., ALVES, S. R., MEYER, A., PEREZ, F, SARCINELLI, P. DE N., MATTOS, R. DE C. O. DA C., MOREIRA, J. C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. **Rev Saúde Pública**; 35 (2):130-135. 2001.
- 68 OPS (Organização Pan-americana da Saúde). **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Brasília, 1996.

- 69 PACHECO, A. O., HACKEL, C. Chromosome instability induced by agrochemicals among farm workers in Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 18(6): 1675-1683, nov.-dez. 2002.
- 70 PARKASH, R. Esterase polymorphism in a population of *Zaprionus paravittiger*. **Experientia** 36. 1164-1165. 1980.
- 71 PARKASH, R., [SHAMINA](#). Geographical differentiation of allozymic variability in natural Indian populations of *Drosophila melanogaster*. **Biochem Genet**; 32(1-2):63-73. 1994.
- 72 PARKINSON, A. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. **Toxicol Pathol**. Jan-Feb;24(1):48-57. Review. 1996.
- 73 PARO, Hortêncio. A história do Algodão em Mato Grosso. **Empaer - Empresa Mato-grossense de Pesquisa** [on line], Mato Grosso, 18 jun. 2004. Disponível: [http:// www.empaer.mt.gov.br](http://www.empaer.mt.gov.br) [Acesso em 18 jun. 2004].
- 74 PASTOR, S., GUTIÉRREZ, S., CREUS, A., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., MARCOS, R. Micronuclei in Peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. **Mutation Research**, 495: 147-156. 2001.
- 75 PERES, F. **É veneno ou é remédio? Os desafios da comunicação rural sobre agrotóxicos**. Dissertação (Mestrado), Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz. 1999.
- 76 PERES, F., MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro. 384p. 2003
- 77 QUIJANO, R. F. Risk assessment in a third-World reality: an endosulfan case history. **Int. J. Occup. Environ. Health**, v. 6 n. 4 p. 312-317, 2000.
- 78 RALPH, S.; PETRAS, M. Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. **Mutation Research**, 413, 235-250. 1998.
- 79 RAUSCHENBACH, I. Y.; LUKASHINA, N. S.; KOROCKIN, L. I. The genetics of esterases in *Drosophila*. VIII. The gene regulating the activity of JH-esterase in *D. virilis*. **Biochem Genet**. Feb;22(1-2):65-80. 1984.
- 80 REUBER, M. D. The role of toxicity in the carcinogenicity of endosulfan. **Sci. Total Environ.**, v. 20 p. 23-47, 1980.
- 81 RIEDER, A. **Indicadores de riscos de contaminação e de danos ao ambiente e a saúde humana por pesticidas às bordas do Alto Pantanal**. (Tese Doutorado) – UFMT, Cuiabá. 1999.

- 82 RITTER, W. F. Pesticide contamination of ground water in the United States – A review. **J. Environ. Sci. Health**, v. B25, n. 1-29, 1990.
- 83 ROQUE, M. R. de A., MELO, I. S. de. Isolamento e Caracterização de Bactérias Degradadoras do Herbicida Diuron. **Sci. agric.** vol.57 n.4. 2000.
- 84 [RUSSELL, R. J.](#), [ROBIN, G. C.](#), [KOSTAKOS, P.](#), [NEWCOMB, R. D.](#), [BOYCE, T. M.](#), [MEDVECZKY, K. M.](#), [OAKESHOTT, J. G.](#) Molecular Cloning of an alpha esterase Gene Cluster on Chromosome 3R of *Drosophila melanogaster* **Insect Biochemistry & Molecular Biology**. 26 (3): 235. 1996.
- 85 SANCHES, S. M., SILVA, C. H. T. de P. da, CAMPOS, S. X. De, VIEIRA, M. E. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 53-58, jan/dez. 2003.
- 86 SANTOS, S. P. **A química dos inseticidas**. Disponível na internet: <http://ewogyn.esoterica.pt/boletim/85/bl085art01.pdf>. (acesso em 16 de novembro de 2002).
- 87 SANTOS, M. A. Dos. Trabalhos de cursos e monografias: formatação básica. Universidade Federal do Mato Grosso. Instituto de Saúde Coletiva. Cuiabá. 58p. 2003
- 88 SENE F.M., VAL F.C., VILELA C.R. & RODRIGUES-PEREIRA M.A.Q. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* spp. within morpho-climatic domains of Brazil. **Pap. Avul. Dep. Zool.** Sec. Agric. 33:315-326. 1980
- 89 SEVERINO, N. Forma de Ocupação explica o uso indiscriminado. **Diário de Cuiabá**; Cuiabá, 06 fev. 2001.
- 90 [SILVA, N. M. da](#), [FANTINEL, C. da C.](#), [VALENTE, V. L.S.](#) *et al.* Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) in communities of drosophilids of Porto Alegre City, Southern of Brazil. **Neotrop. Entomol.**, May/June, vol.34, no.3, p.363-374. 2005.
- 91 SOUSA-POLEZZI, R. de C., BICUDO, H. E. M. de C. Effect of phenobarbital on inducing insecticide tolerance and esterase changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Genet. Mol. Biol.**, vol.27, no.2, p.275-283. 2004.
- 92 SPACKMAN, M. E.; OAKESHOTT, J. G.; SMYTH, K. A.; MEDVECZKY, K. M.; RUSSELL, R. J. A cluster of esterase genes on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster* includes homologues of esterase genes conferring insecticide resistance in *Lucilia cuprina*. **Biochem Genet.**, v. 32, n. 1/2, p. 39 – 62. Fev. 1994.
- 93 SPADOTTO, C.A. Uso de agrotóxicos no Brasil e riscos ambientais. In: ALAVAREZ, V. H.; FONTES, L. E. F.; FONTES, M. P. F. (Ed). **O solo nos**

grandes domínios morfoclimáticos e o desenvolvimento sustentado. Viçosa, MG: SBCS; UFV, DPS, p.855-865. 1996.

- 94 SRAM, R. J. Effect of Glutathione S-transferase M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and effects. **Environm. Health perspec.** 106 (supl. 1): 718-720. 1998.
- 95 STEIN, C.P., TEIXEIRA, E.P. & NOVO, J.P.S. Mosca do figo - *Zaprionus indianus*. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.iac.br/~cenfit/artigos/zaprionus>. Arquivo consultado em data: 30 de maio de 2005.
- 96 SWOFORD, D. L.; SELANDER, R. B. **Biosys**: a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7. Natural History Survey, Illinois, 1989.
- 97 TIDON, R., SENE, F. M. A trap retains and keeps *Drosophila* alive. **Drosophila Information Service** 67:1990.
- 98 TIDON, R., LEITE, D. F., LEÃO, B. F. D. Impact of the colonization of *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical region: 2 years after the invasion. **Biological Conservation**. 112:299-305. 2003.
- 99 UFMT. UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO. **Diagnóstico sócio-econômico do Estado de Mato Grosso**. V. 1. Abordagem de variáveis básicas. Cuiabá, 152p. 1998.
- 100 VIEIRA, S. L. P. **Resíduos de pesticidas organoclorados e organofosforados em tomate (*Lycopersicum esculentum* P. Miller) comercializados em Cuiabá, Mato Grosso**. 1999. Dissertação (Mestrado) – ISC – UFMT, Cuiabá.
- 101 WALKER, C. H. The Use of Biomarkers to Measure the Interactive Effects of Chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 40: 65-70. 1998.
- 102 WARE, G. W. **Pesticides-theory and application**. New York, W. Freeman & Company, 1983.
- 103 WATSON, M. A. et al. Human glutathione S-Transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. **Carcinogenesis**, 19(2): 275-280, 1999.
- 104 WILSON, T. G., Resistance of *Drosophila* to toxins. **Annual Review of Entomology**, vol. 46: 545-571. 2001.
- 105 WHO - WORLD HEALTH ORGANISATION - Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. **World Health Organization and United Nations Environmental Program**, Geneva. 1990.

- 106 WURGLER, F. E. & KRAMERS, P. G .N. Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). **Carcinogenesis**,7, 321-327. 1992.
- 107 ZUNIGA GONZALEZ, G., TORRES BUGARIN, O., LUNA AGUIRRE, J., GONZALEZ RODRIGUEZ, A., ZAMORA PEREZ, A., GOMEZ MEDA, B. C., VENTURA AGUILAR, A. J., RAMOS IBARRA, M. L., RAMOS MORA, A., ORTIZ, G. G., GALLEGOS ARREOLA, M. P. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. **Mutation Research**, 467: 99-103. 2000.

10 ANEXOS

ANEXO 1: Dados toxicológicos envolvendo aspectos bioquímicos e provas toxicológicas para a avaliação de agrotóxicos e afins (Portaria nº 03/ms/snvs, de 16 de janeiro de 1992):

- 1 - Dose letal 50 aguda - DL 50 - por via oral e dérmica, para animais de laboratório, para os produtos técnicos e produtos formulados.
- 2 - Concentração letal 50 inalatória - CL 50 - para produtos formulados: fumigantes, vaporizáveis, voláteis e pós com partículas de diâmetro igual ou menor que 15 micrometro, nas condições de uso.
- 3 - Lesões oculares para produtos formulados em provas realizadas em coelhos.
- 4 - Lesões cutâneas para o produto formulado.
- 5 - Sensibilidade cutânea para o produto formulado.
- 6 - comprovação, com testes em animais de laboratório, da ausência de potenciação dos efeitos tóxicos dos ingredientes ativos que compõem a mistura de agrotóxicos, através da avaliação das DL 50 oral e dérmica da mistura.
- 7 - Toxicidade dérmica sub-aguda, no mínimo 21 dias, quando houver risco de exposição humana não intencional através de contatos dérmicos repetidos, tais como por produtos fumigantes, vaporizáveis e volatilizáveis nas condições de emprego ou que venham oferecer riscos dessa natureza, a critério do órgão competente o Ministério da Saúde.
- 8 - Toxicidade a curto prazo, para produtos técnicos, compreendendo a alimentação de animais de laboratório, diariamente, com rações adicionadas de várias doses do agrotóxico ensaiado, por período de tempo nunca inferior a um décimo da vida média (90 dias para ratos e camundongos, 1 ano para cães), incluindo os dados sobre curva ponderal, consumo de alimentos, exame clínico, provas hematológicas, testes bioquímicos no sangue e urina, inclusive para detecção de possíveis efeitos hormonais, exames anatomopatológicos e histopatológicos abrangendo pelo menos espécies de animais, uma das quais não roedora.
- 9 - Toxicidade a longo prazo, para produtos técnicos, compreendendo a alimentação de animais de laboratório, diariamente, com rações adicionadas de várias doses do agrotóxico ensaiado, por período de tempo no mínimo equivalente à metade da vida média das espécies de animais empregados (18 meses para camundongos, 24 meses para ratos), incluindo observações semelhantes às efetuadas durante o ensaio de toxicidade a curto prazo e, além destas, de estudos sobre a ocorrência de possíveis efeitos carcinogênicos.
- 10 - Efeitos sobre a reprodução e prole, em três gerações sucessivas, para produto técnico.
- 11 - Metabolismo e vias de excreção bem como a meia vida biológica, do produto técnico, em animais de laboratório. Toxicidade dos metabólicos se forem diferentes nas plantas e animais.
- 12 - Possíveis efeitos teratogênicos com os produtos técnicos.
- 13 - Possíveis efeitos mutagênicos com os produtos técnicos, formulações e misturas.
- 14 - Possíveis efeitos neurotóxicos retardados, quando aplicável, com os produtos técnicos.
- 15 - Informações de ordem médica, para os produtos técnicos e informações a seguir:

- a) Dados clínicos e laboratoriais referentes a pessoas expostas, voluntária ou ocupacionalmente;
- b) Confirmação de diagnóstico em casos de intoxicação;
- c) Primeiros socorros, em casos de intoxicação;
- d) Medidas terapêuticas e antídotos;

16 - Sumário dos dados relacionados aos efeitos sobre o ambiente para os produtos técnicos e formulações a seguir:

- a) Toxicidade para peixes, organismos aquáticos inferiores, aves, abelhas e fauna silvestre;
- b) Acumulação na cadeia alimentar;
- c) Deslocamento no ambiente;
- d) Persistência e degradação no ambiente;
- e) Toxicidade do produto degradado.

17 - As provas e ensaios devem ser efetuados de acordo com as especificações publicadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), Programa Internacional de Segurança de Substâncias Químicas (IPCS/OMS), Agência Internacional de Pesquisas Sobre o Câncer (IARC/OMS), Centro Pan Americano de Ecologia Humana e Saúde (ECO/OPS), Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), Registro Internacional de Substâncias Potencialmente Tóxicas do Programa das Nações Unidas para Meio Ambiente (IRPTC/UNEP), Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Comunidade Econômica Européia (OECD/CEE) e Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA).

ANEXO 3: Quantidade de ingrediente ativo (IA) comercializado no município de Campo Verde, no ano de 2001, obtida através de levantamento a partir dos receiptuários agrônômicos fornecidos pela professora Eliana Freire Gaspar de Carvalho Soares, do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Quantidade de ingrediente ativo comercializado em Campo Verde no ano de 2001		
Prop_Municipio	Ing_Ativo	kg IA
Campo Verde	GLIFOSATE	107865,31
Campo Verde	ÓLEO MINERAL	80410,27
Campo Verde	CHLORPYRIFOS	52306,99
Campo Verde	2,4 D	49916,19
Campo Verde	ENDOSULFAN	42655,10
Campo Verde	CARBENDAZIN	25266,50
Campo Verde	METHAMIDOPHOS	22917,60
Campo Verde	DIURON	21208,16
Campo Verde	ÓLEO VEGETAL	19806,21
Campo Verde	BENFURACARB	17528,40
Campo Verde	CYANAZINE	11012,50
Campo Verde	MONOCROTOPHOS	9922,80
Campo Verde	ETHEFON	9604,24
Campo Verde	DIAFENTIURON	9159,10
Campo Verde	ATRAZINA	8330,30
Campo Verde	TRIFLURALINA	8095,50
Campo Verde	ENXOFRE	7588,80
Campo Verde	CARBOSULFAN	7322,80
Campo Verde	PROFENOFOS	7087,70
Campo Verde	ALACHLOR	5995,60
Campo Verde	FENTIN HYDROXIDE	5753,50
Campo Verde	ACETAMIPRID	5746,80
Campo Verde	PARAQUAT	5339,80
Campo Verde	METOLACHLOR	3995,20
Campo Verde	MSMA	3637,20
Campo Verde	CLORETO DE CLORMEQUAT	3463,70
Campo Verde	HALOXYFOP-METHYL	3175,32
Campo Verde	OXICLORETO DE COBRE	2767,71
Campo Verde	BENOMYL	2737,50
Campo Verde	MEPIQUAT	2711,50
Campo Verde	SETHOXYDIM	2708,48
Campo Verde	ACEPHATE	2168,63
Campo Verde	THIOPHANATE METHYL	2018,40
Campo Verde	CLOMAZONE	1998,00
Campo Verde	LACTOFEN	1769,90
Campo Verde	ACETOCHLOR	1764,00
Campo Verde	GLUFOSINATE	1710,60
Campo Verde	DIQUAT	1688,00
Campo Verde	METHOMYL	1658,51
Campo Verde	NONIL FENOXI POLI ETANOL	1524,50
Campo Verde	THIRAM	1497,50
Campo Verde	NONIL FENOL ETOXILADO	1430,60

Campo Verde	FENITROTHION	1403,20
Campo Verde	PYRITHIOBAC SODIUM	1398,95
Campo Verde	AZOXYSTROBIN	1335,90
Campo Verde	THIDIAZURON	1214,88
Campo Verde	SULFENTRAZONE	1200,00
Campo Verde	CYCLANILIDE	1195,80
Campo Verde	TEFLUBENZURON	1167,75
Campo Verde	CARBOFURAN	1137,48
Campo Verde	MANCOZEB	1071,84
Campo Verde	FOMESAFEN	981,93
Campo Verde	FLUAZIFOP-P-BUTIL	950,88
Campo Verde	ZETA-CYPERMETHRIN	909,90
Campo Verde	POLIOXIETILENO-ALQUIL-FENOL-ÉSTER	801,40
Campo Verde	BIFENTHRIN	747,24
Campo Verde	CIPERMETHRIN	720,08
Campo Verde	THIAMETHOXAM	713,30
Campo Verde	FLUMIOXAZIN	690,09
Campo Verde	PERMETRINA	689,22
Campo Verde	TRIAZOPHOS	682,25
Campo Verde	NONIL FENOL POLIETILENO GLICOL	594,89
Campo Verde	IMAZETHAPYR	458,98
Campo Verde	ALQUIL ÉSTER ETOXILADO DO ÁCIDO FOSFÓRICO	455,56
Campo Verde	DICLOSULAM	454,57
Campo Verde	CAPTAN	414,38
Campo Verde	PARATHION METHYL	412,80
Campo Verde	POLIETER POLIMETIL SILOXANO	399,00
Campo Verde	MISTURA DE ESTERES METÁLICOS, HIDROCARBONETOS AROMATICOS, TENSOATIL	392,79
Campo Verde	BENTAZONE	388,60
Campo Verde	CARBOXIN	383,45
Campo Verde	THIODICARB	381,25
Campo Verde	CLETHODIM	373,59
Campo Verde	AMETHRIN	342,00
Campo Verde	ALCOOL ISOPROPÍLICO	336,00
Campo Verde	PENDIMETHALIN	335,00
Campo Verde	SAL SODICO DIODECIL BENZENO SULFONICO	327,70
Campo Verde	CHLORIMURON ETHYL	311,50
Campo Verde	LUFENURON	297,05
Campo Verde	TRIFLUMURON	296,24
Campo Verde	FENTIN ACETATO	261,80
Campo Verde	METHYL BROMIDE	261,17
Campo Verde	NOVALURON	260,50
Campo Verde	ACIFLUORFEN	227,45
Campo Verde	PROCHLORAZ	225,00
Campo Verde	ALPHA-CYPERMETHRIN	216,70
Campo Verde	TEBUCONAZOLE	214,75
Campo Verde	COPOLÍMERO DE POLIÉTER E SILICONE	201,00
Campo Verde	CARFENTRAZONE ETHYL	194,80
Campo Verde	AQUIL FENOL POLIGLICOLETER	192,75
Campo Verde	IMAZAQUIN	172,68
Campo Verde	DIFLUBENZURON	167,00

Campo Verde	QUIZALOFOP-P-TEFURIL	160,80
Campo Verde	FENOXAPROP-P-ETHYL	157,79
Campo Verde	FOSFETO DE ALUMINIO	156,43
Campo Verde	SIMAZINA	145,00
Campo Verde	CHLORFLUAZURON	141,10
Campo Verde	TERBUFOS	133,50
Campo Verde	PICLORAM	88,16
Campo Verde	ALDICARB	87,00
Campo Verde	LAMBDA CYALOTHRIN	81,38
Campo Verde	DIFENOCONAZOLE	80,45
Campo Verde	ESFENVALERATE	76,61
Campo Verde	THIABENDAZOLE	72,98
Campo Verde	SPINOSAD	70,68
Campo Verde	RESINA SINTETICA EMULSIONADA	70,43
Campo Verde	TEPRALOXYDIM	70,00
Campo Verde	CHLORFENAPYR	68,64
Campo Verde	FLUMETSULAM	66,60
Campo Verde	QUIZALOFOP-P-ETHYL	66,45
Campo Verde	CLORANSULAM-METHYL	65,72
Campo Verde	PIRIMIPHOS-METHYL	62,00
Campo Verde	TOLYFLUANIDE	54,50
Campo Verde	BROMACIL	52,00
Campo Verde	DELTAMETHRIN	46,65
Campo Verde	THIACLOPRID	39,96
Campo Verde	FIPRONIL	38,98
Campo Verde	CHLOROTHALONIL	37,70
Campo Verde	BUTROXYDIM	36,75
Campo Verde	DIMETHENAMID	36,00
Campo Verde	INDOXACARB	31,80
Campo Verde	BETA CYFLUTHRIN	29,75
Campo Verde	IMIDACLOPRID	27,85
Campo Verde	TEBUFENOZIDE	24,00
Campo Verde	AGENTE TENSO-ATIVO ANIONICO	23,48
Campo Verde	FURATHIOCARB	22,00
Campo Verde	CYANAMIDE	21,84
Campo Verde	GLUFOSINATO DE AMONIO	19,20
Campo Verde	BACILUS THURINGIENSIS	18,96
Campo Verde	ABAMECTIN	18,63
Campo Verde	HEXAZINONE	18,63
Campo Verde	PROPARGITE	15,84
Campo Verde	PHENTHOATE	15,50
Campo Verde	MANEB	15,36
Campo Verde	OXASULFURON	15,15
Campo Verde	DIMETHOATE	13,20
Campo Verde	FLUMICLORAC-PENTYL	12,90
Campo Verde	TRICLOPYR ÉSTER	12,48
Campo Verde	SULFATO DE COBRE	10,25
Campo Verde	KASUGAMYCIN	9,65
Campo Verde	CARTAP	8,00
Campo Verde	SULFLURAMIDA	7,83
Campo Verde	ISOXAFLUTOLE	7,31

Campo Verde	MALATHION	6,33
Campo Verde	PENCYCURON	6,00
Campo Verde	OXIDO CUPROSO	5,60
Campo Verde	PROPICONAZOLE	3,00
Campo Verde	TRICHLORFON	3,00
Campo Verde	TETRADIFON	2,56
Campo Verde	TRIADIMEFON	2,50
Campo Verde	PROMETRYN	2,40
Campo Verde	PROPAQUIZAFOP	2,00
Campo Verde	CYMOXANIL	1,92
Campo Verde	DICOFOL	1,81
Campo Verde	PIRIMICARB	1,50
Campo Verde	METALAXYL-M	1,44
Campo Verde	DIAZINON	1,14
Campo Verde	FOLPET	1,00
Campo Verde	PROCYMIDONE	1,00
Campo Verde	OXYTETRACYCLINE	0,72
Campo Verde	METSULFURON-METHIL	0,68
Campo Verde	FENPROPATHRIN	0,48
Campo Verde	PROPAMOCARB	0,38
Campo Verde	PYRIDABEN	0,20
Campo Verde	FLUQUINCONAZOLE	0,13
Campo Verde	CYROMAZINE	0,06
Campo Verde	CYFLUTHRIN	0,00

ANEXO 4: Metodologias**GEL DE SEPARAÇÃO (25 mL)**

Gel de separação	10%
H ₂ O	10,5 MI
Acrilamida/Bis	8mL
Tampão do gel	6,25 ml
Persulfato (sol 2%)	0.4 mL
TEMED	25 µL

SOLUÇÃO DE ACRILAMIDA/BIS

- 30 g de Acrilamida
- 0.8 g Bis
- 100 mL de H₂O

Coar em papel de filtro

Guardar em frasco escuro na geladeira

Não usar após 20 dias.

TAMPÃO DO GEL

- 18,71 g de TRIS pH 8.8 para 100 ml de H₂O

Acerta-se o pH com HCl 6 M e completa-se para 100 mL de H₂O .

Este tampão tem concentração de 1.5 M.

TAMPÃO DE AMOSTRA

- 0.242 g TRIS para 0.1 M pH 6.8
- 2 mL de Glicerol
- 0,2 mL de Azul de Bromofenol a 0.01% (0.01 g/100 mL)
- Completar para 20 mL de H₂O

TAMPÃO DE CORRIDA

1,15 g TRIS

7.21 g de Glicina

1L de H₂O (a completar)

O pH dará em torno de 8.3. Não é medido isso.

COLORAÇÃO**A. TAMPÕES DE COLORAÇÃO**

FOSFATO A – 26.4g/l de Fosfato de Sódio Monobásico 0,17M pH 6.1

FOSFATO B- 56,65g/l de Fosfato de Sódio Dibásico 0.15M pH 6.1

B. SOLUÇÕES ESTOQUE

α -naftil esterase - 1g α -naftil diluído em 25 ml de acetona +25 ml de água destilada

SOLUÇÃO CORANTE

Em uma cuba de vidro adiciona-se: 75 ml de Fosfato A + 25 ml de Fosfato B + 3 ml de solução de α -esterase. Encuba-se o gel por 30 minutos a 35° C no escuro.

Após a encubação adicionar + 10 ml de álcool isopropílico, adicionados de 200 mg de corante RR Salt (filtrar em algodão). O gel revela-se em aproximadamente duas horas, sob agitação.

Após a coloração o gel é tratado com uma solução fixadora de ácido acético, álcool etílico comercial e água destilada na proporção de 2:1:8 durante 2 horas. Após esse procedimento o gel é fixado em glicerol 10% e seco em papel celofane.

CONSERVANTE DO GEL

- 75 mL de Ac. Acético
- 15 mL de Glicerol
- completar para 1 L de H₂O

SOLUÇÃO DESCOLORANTE

- 100 mL DE Ac, Acético
- 250 mL de Álcool Etilico
- 650 mL de H₂O