



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE E  
DESENVOLVIMENTO REGIONAL**

**AVALIAÇÃO DO EPITÉLIO NASAL E COMPONENTES DO SANGUE EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA  
ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO**

**FABIOLA DE AZEVEDO MELLO**

**AVALIAÇÃO DO EPITÉLIO NASAL E COMPONENTES DO SANGUE EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA  
ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO**

**FABIOLA DE AZEVEDO MELLO**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional - Área de concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Dr<sup>a</sup> Renata Calciolari Rossi e Silva  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Ana Paula Alves Favareto

615.904  
M527a

Mello, Fabiola de Azevedo.

Avaliação do epitélio nasal e componentes do sangue em modelos experimentais submetidos à exposição ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético / Fabiola de Azevedo Mello – Presidente Prudente, 2016.

68 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2016.

Bibliografia.

Orientadoras: Renata Calciolari Rossi e Silva, Ana Paula Alves Favareto

1. 2,4-D. 2. Hemograma. 3. Infiltrando Inflamatório. 4. Mastócitos. 5. Pulverização aérea. I. Título.

**FABIOLA DE AZEVEDO MELLO**

**AVALIAÇÃO DO EPITÉLIO NASAL E COMPONENTES DO SANGUE EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA  
ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional – Área de concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Dr<sup>a</sup> Renata Calciolari Rossi e Silva  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Ana Paula Alves Favareto

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Renata Calciolari Rossi e Silva  
Instituição: MMADRE - Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)  
Local: Presidente Prudente-SP

---

Prof. Dr. Marcus Vinícius Pimenta Rodrigues  
Instituição: MMADRE - Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)  
Local: Presidente Prudente-SP

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Susimary Aparecida Trevizan Padulla  
Instituição: Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente (UNESP)  
Local: Presidente Prudente-SP

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico aos meus pais, Angela Cristina de Azevedo Mello e Genival Guedes de Mello, que são os responsáveis por todas as minhas conquistas e vitórias. Obrigada por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos! Amo muito vocês!*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus, Nossa Senhora e ao meu querido Santo Expedito, por me abençoarem durante toda minha trajetória e sempre estarem em minhas orações.*

*Aos meus amados pais, Angela Cristina de Azevedo Mello e Genival Guedes de Mello, por todo apoio, amor, carinho, paciência e cuidado. Sempre me dando forças e dizendo a todo instante que eu deveria estudar cada vez mais. Acredito que sem eles, nada teria acontecido...*

*A minha amiga e querida orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Renata Calciolari Rossi e Silva! Todo o período ao lado dessa pessoa incrível foi especial e me fez crescer em todos os aspectos. Ela foi minha orientadora e acima de tudo, minha amiga. Amiga que quero guardar em meu coração e levar pra vida toda. Formamos uma dupla sem discussões e desentendimentos, acredito que isso foi coisa de Deus! Nunca vou esquecer-me de duas frases mais ditas por você durante esse trajeto: “Fica em paz minha amiga” e “Acalma seu coração Fá”. É professora, me faltam palavras pra descrever tudo o que vivemos nesses meses, mas saiba que você é muito especial para mim.*

*A minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Alves Favareto, por ter nos auxiliado durante todo o experimento, além das alunas Ana Laura Marion, Fernanda Jorge, Gisele Quinallia e Laura Marinelli. A Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup> Maira Rodrigues Uliana e Prof<sup>a</sup>. Dra. Rebeca Delatore Simões por terem “quebrado” a cabeça durante minha análise estatística, e também ao Prof. Dr. Edson Assunção Mareco que ajudou imensamente nessas análises.*

*Ao meu professor e ex-coordenador Dr. Marcus Vinícius Pimenta Rodrigues, por ter me apresentado a minha orientadora (Renata) e também por todo o auxílio e conselhos durante todos esses anos.*

*Gostaria de agradecer também a Prof<sup>a</sup>. Dra. Gisele Alborghetti Nai, por ter me ensinado muitas coisas durante seu experimento com ratos no ano passado e por ter me aceito como futura orientanda no doutorado (se Deus quiser serei aprovada). A Prof<sup>a</sup>. Dra. Susimary Padulla, por ter aceitado o convite para participar da minha banca de qualificação e defesa.*

*A minha vizinha Izaura Defendi de Azevedo, que mesmo não entendendo muito sobre o mestrado, sempre colocou meu nome em suas orações. Suas ligações semanais foram muito importantes para me dar forças e perceber o quanto me ama.*

*Ao meu noivo Leandro Roberto da Silva, que me apoiou durante todos esses meses, me dando forças para enfrentar as dificuldades e se orgulhando de minhas vitórias.*

*As minhas amigas que conquistei no mestrado Cíntia Evangelista e Juliana Scatolon, que me apoiaram e se preocuparam durante toda a minha trajetória. Obrigada por me deixarem fazer parte de suas vidas e espero que nunca me esqueçam de mim, meus amores.*

*Também as minhas amigas Alessandra Cristina da Silva, Elizabeth Alves de Oliveira, Kennely Viana e Larissa Barreto Barbosa Alonso, que também estiveram ao meu lado, sempre se preocupando e não medindo esforços para me verem feliz! Amigas, formamos um grupo abençoado por Deus e sempre agradeço à Ele por vocês existirem.*

*Gostaria de agradecer também a Prof<sup>a</sup>. Dra. Cecília Braga Laposy, por sempre estar disponível para nos auxiliar e tirar nossas dúvidas; ao Bruno Suave (técnico do Laboratório de Odontologia da UNOESTE) e ao Heliard Rodrigues (aluno do Mestrado em Ciência Animal) por terem me ajudado durante a captura das imagens das lâminas.*

*Agradeço a todos os docentes do Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional (MMADRE), as funcionárias Joyce Carvalho de Andrade (secretária do MMADRE e Ciências da Saúde), Keid Ribeiro Kruger (secretária dos mestrados em Agronomia e Ciência Animal) e a Idalina de Oliveira Lima (secretária dos Mestrados em Educação e Odontologia).*

*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”. (Simone de Beauvoir)*



## RESUMO

### **Avaliação do Epitélio Nasal e Componentes do Sangue em Modelos Experimentais Submetidos a Exposição ao Herbicida Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético**

**Introdução:** O aumento da produção de cana-de-açúcar em conjunto com a utilização de herbicidas, como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) traz diversos agravos à saúde humana. Estudos que avaliam as alterações decorrentes do uso desse herbicida no hemograma e nas células da mucosa nasal são de grande importância, pois as informações fornecidas podem ser utilizadas com o intuito de ajudar na compreensão da interação dessa substância com o organismo humano.

**Objetivo:** Analisar os componentes do sangue e infiltrado inflamatório em modelos experimentais submetidos à nebulização ao herbicida 2,4-D, em diferentes intervalos de tempo e concentrações. **Metodologia:** Foram utilizados 80 camundongos *Swiss machos*, divididos em quatro grupos (n=20): salina, baixa ( $3,71 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare), média ( $6,19 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare) e alta concentração ( $9,28 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare). Todos os animais foram expostos às nebulizações preconizadas para cada grupo por 15 minutos, em diferentes intervalos de tempo: 24, 48, 72 e 192 horas. A coleta das amostras de sangue foi através de punção intracardíaca e após a eutanásia, o focinho de cada animal foi retirado para a quantificação de mastócitos, através da coloração de azul de toluidina e análise do infiltrado inflamatório, pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). Para a análise de normalidade foi utilizado o pacote estatístico Shapiro-Wilk e para a análise estatística dos dados, utilizamos o teste Two-way Anova, considerando estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram  $p < 0,05$ . **Resultados:** Todos os animais do grupo baixa concentração apresentaram microcitose e hipocromia no intervalo de 72 horas; eosinofilia e linfocitose no intervalo de 48 horas. Foi verificada neutrofilia no grupo alta concentração no intervalo de 192 horas. A contagem de mastócitos apresentou valores significativamente aumentados no grupo alta concentração, no intervalo de tempo de 48 horas, quando comparado ao de 24 horas. **Conclusão:** Em conclusão observamos que, apesar das alterações nos valores hematológicos, o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético não pode ser considerado dose e tempo-dependentes, mas pode provocar reações alérgicas.

**Palavras-chave:** 2,4-D, Hemograma, Infiltrado inflamatório, Mastócitos e Pulverização aérea.

## ABSTRACT

### Evaluation of nasal epithelium and blood components in experimental models submitted to exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide

**Introduction:** Increased sugarcane production among the rise in use of herbicides, such as the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), might causes several harm for health. Studies that evaluate the alterations due to the use of this herbicide in the hemogram and in the cells of the nasal mucosa are very important, since the information provided helps in understanding the interactions of substances as the 2,4-D with the human organism. **Objective:** To analyze blood count components and inflammatory infiltrate in experimental models submitted to nebulization with 2,4-D herbicide, in different time intervals and concentrations. **Method:** Eighty male Swiss mice were divided into four groups (n = 20): saline, low ( $3,71 \times 10^{-3}$  grams of active ingredient per hectare), medium ( $6,19 \times 10^{-3}$  grams of active ingredient per hectare) and high concentrations ( $9,28 \times 10^{-3}$  grams of active ingredient per hectare). All animals were exposed to the nebulization predefined for each group for 15 minutes during different time intervals: 24, 48, 72 and 192 hours. Blood samples were taken by intracardiac puncture and after euthanasia, the muzzle of each animal was removed for mast cell quantification through toluidine blue staining and analysis of the inflammatory infiltrate by Hematoxylin-Eosin staining (HE). Analysis of normality was conduced using the statistical package Shapiro-Wilk, and for statistical analysis of data Two-way Anova test was performed, considering statistically significant results with  $p < 0.05$ . **Results:** All animals in the low concentration group presented microcytosis and hypochromia within 72 hours; Eosinophilia and lymphocytosis within 48 hours. Neutrophilia was observed in the high concentration group over the 192 hour interval. The mast cell count showed significantly increased values in the high concentration group, in the time interval of 48 hours, when compared to the 24 hour period. **Conclusion:** In conclusion, we observed that in spite of changes in haematological values, the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide can not be considered dose-dependent and time-dependent herbicide, but it might provoke allergic reactions.

**Keywords:** 2,4-D, Hemogram, Inflammatory infiltrate, Mast cells and Aerial spraying.

## **LISTA DE SIGLAS**

- 2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente
- IgE – Imunoglobulina E
- NHL – Linfoma não-Hodgkin
- PROÁLCOOL - Programa Nacional do Alcool
- SINITOX - Sistema Nacional de Intoxicações Toxicológicas

## SUMÁRIO

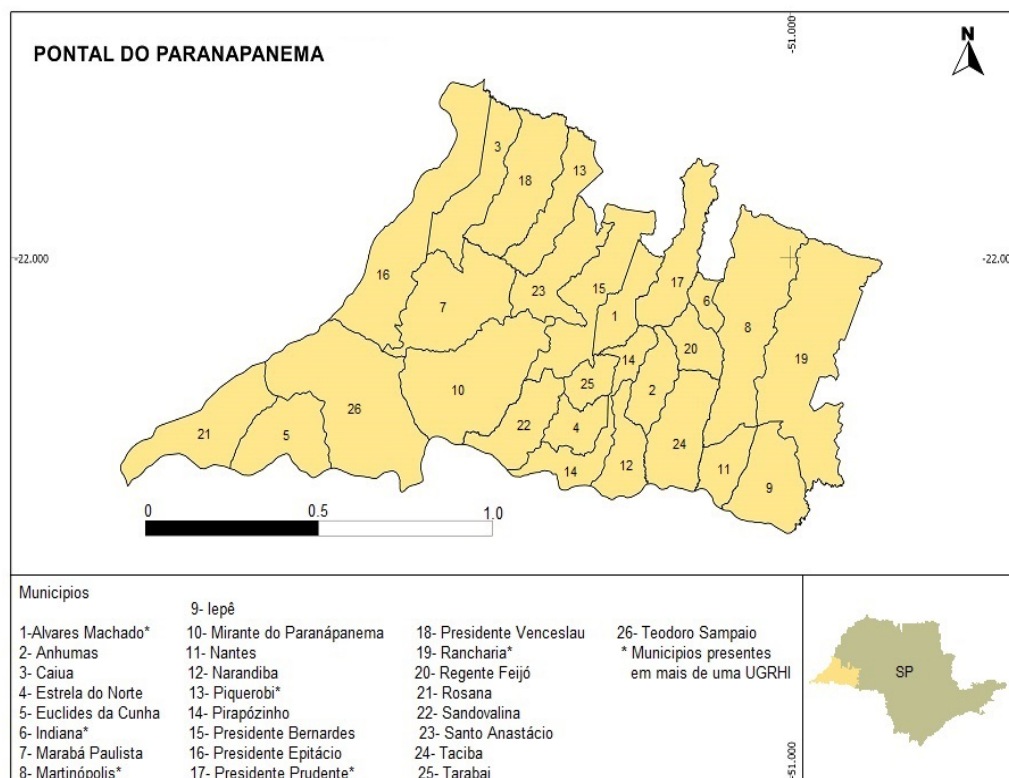
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Cana-de-açúcar no Pontal do Paranapanema.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2</b>	<b>Contaminação do solo e dos recursos hídricos.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3</b>	<b>Pulverização aérea.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4</b>	<b>Herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético.....</b>	<b>15</b>
1.4.1	Efeitos causados a saúde humana.....	16
1.4.2	Características do sistema respiratório e sua relação com a poluição ambiental.....	17
1.4.3	Toxicidade aguda e crônica.....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1	Objetivo Geral.....	24
2.2	Objetivos Específicos.....	24
<b>3</b>	<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES FINAIS.....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
	<b>ANEXO - NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

### 1.1 Cana-de-açúcar no Pontal do Paranapanema

A região do Pontal do Paranapanema localiza-se no extremo oeste do Estado de São Paulo, fazendo divisa com os estados do Paraná e Mato Grosso do Sul, banhado pelos rios Paranapanema e Paraná (FIRETTI *et al.* 2012). Seu território abrange uma área de 18.441,60 Km<sup>2</sup>, com 538.766 habitantes, formado por 32 municípios (FIGURA 1) (LEÃO, 2015; FIRETTI *et al.* 2012).

FIGURA 1 - Municípios do Pontal do Paranapanema.



Fonte: (Elaborado e cedido por Juliana Domingues Scatolon, 2016).

O crescimento da cultura de cana-de-açúcar na região tornou-se significativo quando o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) passou a financiar a implantação de destilarias no Pontal do Paranapanema. Com o auxílio, diversos municípios destacaram-se em relação ao plantio voltado para a produção de etanol, sendo uma das principais fontes de emprego e renda na região (FERRANTE; BARONE, 2011). O Estado de São Paulo foi o maior produtor de cana-de-açúcar na safra de 2012 e 2013, totalizando 56% de toda a produção do país (WISSMAN *et al.* 2014).

Em conjunto com a cultura da cana, é verificado o aumento significativo da utilização de herbicidas e o Estado de São Paulo destacou-se no ano de 2006 como o maior consumidor de defensivos agrícolas do país. O Quadro 1 destaca os cinco ingredientes ativos mais vendidos no Brasil no ano de 2012.

QUADRO 1 – Descrição dos cinco ingredientes ativos mais vendidos no Brasil no ano de 2012.

<b>Ingrediente Ativo</b>	<b>Toneladas</b>
Glifosato e seus sais	187.777,18
Óleo Mineral	36.962,20
2,4-D	32.163,99
Atrazina	27.139,56
Óleo Vegetal	15.615,22

Fonte: FRAGA *et al.* 2016 (Adaptado).

Com a finalidade de atender a demanda no setor agrícola, diversos produtos são desenvolvidos com o intuito de aumentar e melhorar a produção, além de diminuir e/ou eliminar agentes que interferem no desenvolvimento da produção deste setor (plantas daninhas, pragas e etc), sendo os herbicidas um dos principais produtos que se enquadram nessa questão. Essas substâncias, alteram a fauna e flora, as águas superficiais, o lençol freático e os organismos vivos, causando riscos à saúde humana (DE OLIVEIRA; FAVARETO; ANTUNES, 2013).

## **1.2 Contaminação do solo e dos recursos hídricos**

A água e o solo são recursos naturais e essenciais para que haja a sobrevivência de todo o Planeta. A produção de alimentos depende desses recursos, porém a utilização de diversas e modernas técnicas nos sistemas de produção provocou a inserção de uma imensa variedade de substâncias sintéticas no meio ambiente (STEFFEN; STEFFEN; ANTONIOLLI, 2011).

A atividade humana introduz no ecossistema compostos xenobióticos, ou seja, compostos de origem química que são estranhos ao organismo e que têm a capacidade de realizar o controle de pragas, plantas daninhas e fungos indesejáveis presentes na cultura agrícola, possibilitando o aumento das áreas para o cultivo, além da produção de alimentos (MONQUERO *et al.* 2008).

O solo consegue absorver quantidades significativas de contaminantes sem apresentar grandes alterações. No entanto, com o passar dos anos, as transformações sofridas por ele tornaram-se irreversíveis, na maioria dos casos, e os danos causados ao ambiente mostram-se de difícil recuperação.

No momento em que uma partícula de herbicida é aplicada no meio ambiente, ela atinge o solo, independentemente da maneira como foi aplicada (pulverização aérea ou diretamente no solo) (STEFFEN; STEFFEN; ANTONIOLLI, 2011). Aproximadamente 50% de todo o produto sofre diferentes processos químicos, físicos e biológicos, que determinam seu comportamento, além de serem dispersos para outros compartimentos presentes no ecossistema, como a água e a atmosfera (Quadro 2) (MARTINS *et al.* 2012).

QUADRO 2 - Descrição das perdas totais máximas de herbicidas.

<b>Processos</b>	<b>Perdas totais máximas (%)</b>	<b>Média das perdas (%)</b>
Volatilização	10 a 90	40 a 80
Lixiviação	0 a 4	1
Escoamento superficial	0 a 10	5
Absorção pelas plantas	1 a 10	2 a 5

Fonte: MANCUSO; NEGRISOLI; PERIM, 2011.

Essas substâncias podem ser depositadas no solo por meio do uso de água contaminada na aplicação dos defensivos agrícolas, manejo direto do herbicida para o controle de plantas daninhas ou por contaminação quando em contato com embalagens dos defensivos que não foram devidamente descartadas durante a tríplice lavagem (STEFFEN; STEFFEN; ANTONIOLLI, 2011; MANCUSO; NEGRISOLI; PERIM, 2011).

Existem diferentes formas nas quais esses compostos podem ser encontrados no ambiente aquático: escoamento superficial, lixiviação e através de sua evaporação para a atmosfera, contaminando os recursos hídricos por meio da precipitação (CATTANEO, 2009).

O escoamento superficial propicia a contaminação das águas superficiais, devido ao transporte do herbicida absorvido às partículas do solo erodido ou em

solução. A lixiviação resulta da contaminação das águas subterrâneas através do transporte dos defensivos agrícolas junto com a água que alimenta os rios (MARTINS *et al.* 2012). Além disso, toda contaminação pode prejudicar a saúde humana de maneira direta, ainda mais quando os recursos são utilizados como fonte de água potável para a comunidade.

Alguns tipos de herbicidas, quando presentes no meio ambiente ou ao atingirem o ambiente aquático, oferecem riscos às espécies de animais ali presentes, devido a sua toxicidade e capacidade de bioacumular-se ao longo de toda a cadeia alimentar (MILHOME *et al.* 2009).

Em um estudo feito por Marchesan *et al.* (2010) através do monitoramento das águas da bacia hidrográfica dos rios Vacacaí-Mirim e Vacacaí, localizados na região Central do Estado do Rio Grande do Sul, pode-se observar que o herbicida clomazona têm maior incidência nas amostras que foram pesquisadas, podendo estar relacionado a sua persistência no meio ambiente e sua elevada taxa de solubilidade nas águas.

Diante do quadro apresentado, identificar e avaliar os riscos ambientais e à saúde, tornam-se importantes meios de contribuição no controle e prevenção da exposição de toda sociedade a resíduos tóxicos.

### **1.3 Pulverização aérea**

O Brasil destaca-se em relação à produção agrícola de algodão, alimentos, madeira e celulose. Seu modelo vincula-se fortemente ao uso de defensivos agrícolas e, por isso, é considerado um tipo de agricultura que se concentra em um modelo de desenvolvimento voltado a ganhos em sua produção (FERREIRA, 2015). Diante desse cenário, os impactos causados ao meio ambiente e a saúde humana tornaram-se uma verdadeira ameaça à qualidade de vida de todas as gerações.

De acordo com Pignati, Oliveira e Silva (2014), na safra de 2012 pulverizou-se, no Brasil, aproximadamente 1,05 bilhões de litros de herbicidas, inseticidas e fungicidas, em uma área de 95 milhões de hectares de lavouras nos cultivos de cana-de-açúcar, milho, algodão, soja, café e hortaliças.

O objetivo da técnica de pulverização aérea é administrar a quantidade correta do composto no alvo desejado, com excelente eficácia e de maneira econômica, sem que haja contaminação ambiental. Um dos fatores que ocasionam



na perda de defensivos agrícolas é o fenômeno conhecido como deriva, ou seja, são os desvios de trajetória sofridos pelas gotas dos herbicidas em decorrência da velocidade dos ventos. Este fator deve ser levado em consideração durante as aplicações, já que age diretamente sobre as gotas, alterando a direção do seu deslocamento em relação ao alvo que se deseja atingir (DE ALVAREGA *et al.* 2014; MOTA, 2011).

Esse tipo de fenômeno não agrada os proprietários das terras, pois causam prejuízos financeiros em áreas adjacentes, contaminando os alimentos, recursos hídricos, o ar, além dos efeitos causados à saúde da população e das criações de animais (COSTA *et al.* 2012).

A exposição aos herbicidas configura um grave problema de saúde pública. Os trabalhadores rurais necessitam, frequentemente, de proteção e de cuidados relacionados à saúde, além de informações básicas sobre os riscos relacionados ao uso desses compostos. As concentrações incorretas do produto e a não indicação para a cultura alvo desejada, são alguns dos principais fatores que determinam uma maior exposição causando, conseqüentemente, dano à saúde (DA SILVA AUGUSTO, 2012).

#### **1.4 Herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético**

A utilização dos agrotóxicos deu-se durante a Segunda Guerra Mundial e foram utilizados como armas químicas ocorrendo, posteriormente, a síntese e expansão de diversos compostos químicos. Sua utilização, no Brasil, foi em meados da década de 1960 e utilizado no combate de vetores existentes nas plantações (DA COSTA LEITE; TORRES, 2008).

O uso de herbicidas de amplo espectro é comum no manejo de plantas daninhas, sendo um sistema de operação, que se for bem realizado, proporcionará melhor controle, evitando que as plantas causem problemas futuros (SILVA *et al.* 2011). Esses defensivos são capazes de “selecionar” populações de vegetais, onde o termo “seleção” refere-se ao modo de atuação dessas substâncias, causando morte de suas espécies (DE OLIVEIRA, 2011).

Os herbicidas ácidos fazem parte de uma importante classe de pesticidas, cuja finalidade é combater ervas daninhas, dos quais o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) destaca-se devido sua grande utilização em culturas de cana-de-açúcar, cereais, controle florestal e de pomares (AMARANTE JUNIOR;

SANTOS; NUNES, 2003). Esse herbicida pode ser comercializado na forma de derivados como, por exemplo, aminas, ésteres e sais. De acordo com Cerdeira *et al.* (2002) seu tempo de meia-vida é em torno de 7 a 16 dias, quando presente no solo, dependendo dos micro-organismos, pois são os responsáveis por sua degradação. Sua velocidade de degradação torna-se acelerada com o aumento de nutrientes, carbono orgânico dissolvido e sedimento, quando presente em ambientes aquáticos e seu tempo de meia-vida varia entre uma e várias semanas.

O herbicida 2,4-D pertence à família dos clorofenoxiacéticos, cuja fórmula química é  $C_8H_6Cl_2O_3$ . Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é classificado como um herbicida hormonal do grupo fenoxiacético (AMARANTE JUNIOR *et al.* 2002) e por ser uma auxina sintética, provoca diversos distúrbios como, por exemplo, crescimento anormal dos tecidos, morte do sistema radicular, obstrução do floema, inibindo o crescimento das ervas daninhas (MACHI *et al.* 2014; AMARANTE JUNIOR; SANTOS; NUNES, 2003).

De acordo com a Resolução nº 396 de 03 de Abril de 2008, do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), determina-se que o limite máximo do herbicida 2,4-D na água destinada ao consumo humano deve ser de 0,03 ppm (BRASIL, 2008). Uma vez que esses defensivos circulam em vários e diferentes ambientes do planeta, há uma preocupação em monitorar seu destino no meio ambiente e criar técnicas que propiciem sua remediação.

#### **1.4.1 Efeitos causados a saúde humana**

São descritas na literatura diversas patologias e/ou alterações no organismo humano em decorrência da exposição aos agrotóxicos (BURNS; BEARD; CARTMILL, 2001; ALARANJA; ROSS; BONNER, 2013). De acordo com Bener *et al.* (1999) em um estudo realizado com agricultores expostos à defensivos agrícolas, foi possível observar sinais e sintomas dérmicos e respiratórios tais como, irritação cutânea e nasal, asma, pneumonia, além do aumento nos níveis de Imunoglobulina E (IgE) sérica total.

O estudo de MacBride *et al.* (2013) mostrou maior incidência de leucemia linfóide crônica em veteranos neozelandeses que participaram da Guerra do Vietnã e que foram expostos ao “Agente Laranja”, quando comparados a população em geral.

Há estudos que demonstram que o herbicida 2,4-D não é genotóxico e que não há evidências de carcinogenicidade em animais de laboratório (CHARLES *et al.* 1999; GOLLAPUDI, 1999). No entanto, a carcinogenicidade do 2,4-D em seres humanos tem sido bastante discutida desde o estudo de caso-controle do linfoma não-Hodgkin (NHL) precoce, associado ao uso de herbicidas por agricultores (HOAR *et al.* 1986).

Foi verificado no estudo de Compston *et al.* (1999) que os trabalhadores expostos cronicamente aos defensivos agrícolas organofosforados, apresentaram falha no desenvolvimento ósseo, tanto a nível celular quanto tecidual.

O efeito do herbicida glifosato sobre a atividade enzimática também foi avaliado em estudos *in vivo*. Através da análise dos resultados, foi possível observar diversas alterações (inibições e elevações da atividade de algumas enzimas) ocorridas no fígado, cérebro e coração de ratas prenhas (DARUICHI, ZURULMIK; GIMENEZ, 2001).

Em estudo apresentado por Beard *et al.* (2003) com trabalhadores rurais expostos aos agrotóxicos, foi observado o desenvolvimento de leucemia mieloide aguda. No estudo de Stalone e Beseler (2002) os agricultores apresentaram sintomas de depressão diante da exposição aos organofosforados.

#### **1.4.2 Características do sistema respiratório e sua relação com a poluição ambiental**

O sistema respiratório abrange os pulmões e uma conexão de tubos capazes de comunicarem o parênquima pulmonar com o ambiente externo. Sua função primária é a de propiciar a entrada de oxigênio e saída de dióxido de carbono do corpo humano, sendo dividido de acordo com sua estrutura em sistema respiratório superior e inferior. O superior compreende o nariz, cavidades nasais, seios paranasais e nasofaringe, já a porção inferior engloba a laringe, traquéia, brônquios e pulmões (DA SILVA *et al.* 2012).

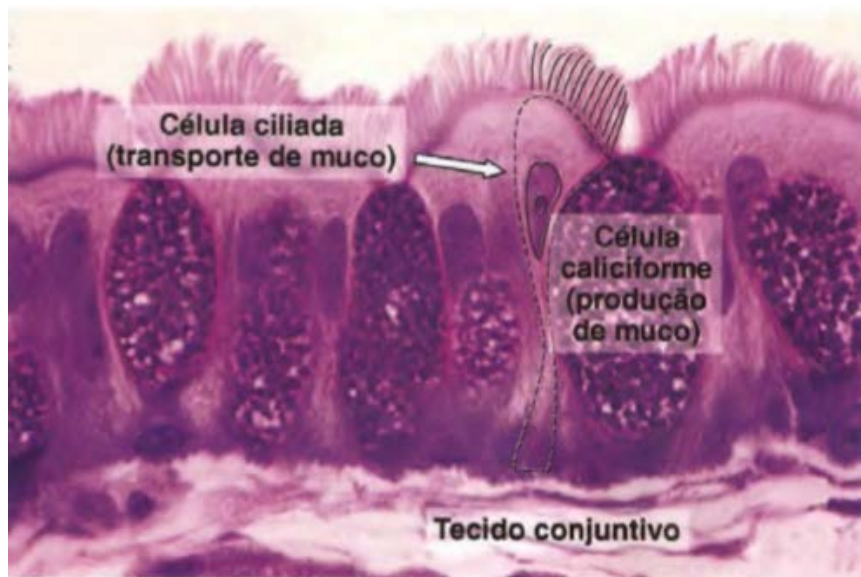
De acordo com o aspecto funcional, o sistema respiratório divide-se em porção condutora, cuja função é limpar, umedecer e aquecer todo o ar inspirado, protegendo o revestimento dos alvéolos pulmonares. Essa porção compreende as fossas nasais, nasofaringe, laringe, traquéia, brônquios e bronquíolos. Para que suas funções sejam executadas, a parte condutora reveste-se por um epitélio respiratório (especializado), que apresenta glândulas serosas e mucosas, além de

uma rede vascular sanguínea. Já a porção respiratória abrange as porções terminais da árvore brônquica, onde ocorrem as trocas gasosas (alvéolos) (BERTASSOLI *et al.* 2013).

As fossas nasais são revestidas por uma mucosa com estruturas diferentes, tais como o vestíbulo, que corresponde ao segmento inicial da cavidade e que se comunica com o meio externo através das narinas. Sua mucosa é composta por epitélio plano estratificado não queratinizado, além de tecido conjuntivo denso. A primeira barreira contra a entrada de partículas grosseiras são as glândulas cutâneas e os pêlos (JUNQUEIRA *et al.* 2008).

A mucosa da área respiratória reveste quase todas as vias respiratórias, sendo constituída por um epitélio pseudoestratificado colunar ciliado, com diversas células caliciformes (Figura 2). Esse epitélio é constituído por seis diferentes tipos celulares e o mais abundante é a célula colunar ciliada, que se encontra distribuída por todo o trato respiratório e que apresenta a capacidade de movimentar o muco através da ação de cílios. Cada uma dessas células possui aproximadamente 300 cílios em sua superfície apical. As células caliciformes apresentam-se em segundo lugar, responsáveis pela síntese de secreção mucosa. Em sua porção apical, existem diversas gotículas com muco rico em polissacarídeos (BARBOSA; DE OLIVEIRA SANTOS, 2003).

FIGURA 2 - Principais componentes do epitélio respiratório (pseudoestratificado com células caliciformes). Pararosanilina e azul-de-toluidina.



Fonte: JUNQUEIRA *et al.*, 2008.

Ainda de acordo com Barbosa e De Oliveira Santos (2003), o outro tipo de célula colunar é chamada de célula em escova ou *brush cell*, sendo composta por inúmeros microvilos localizados em sua região apical, associados com terminações nervosas. Classificam-se em dois diferentes tipos: um deles apresenta características citológicas de uma célula imatura, já o outro tipo apresenta, em sua base, expansões dendríticas, considerado como receptor sensorial. As células pequenas e arredondadas são chamadas de basais, que não se estendem até a superfície do epitélio, mas apoiam-se na lâmina basal. Estas células tem a capacidade de se multiplicarem frequentemente por mitose. Desta forma, originam os outros tipos celulares presentes no epitélio respiratório. Já as serosas, apresentam microvilos e relacionam-se com a secreção de um fluido seroso de composição não conhecida. Por último, encontra-se a célula granular, que é endócrina e atua como efetora na integração das secreções mucosa e serosa, sendo parecida com a célula basal.

Na superfície da parede lateral da cavidade nasal são encontrados três relevos, chamados de cornetos ou conchas. O epitélio encontra-se mais elevado e com maior número de células caliciformes na porção inicial das vias aéreas. O muco, que é sintetizado pelas células caliciformes e glândulas, tem a função de prender microrganismos e partículas que se encontram inertes, deslocando-se ao longo de

toda superfície do epitélio, seguindo em direção à faringe, através do batimento ciliar sincronizado (MARCHESAN; MARCHESAN, 1998). Durante a passagem do ar pelas fossas nasais, o mesmo é aquecido, filtrado e umedecido, onde o plexo venoso torna-se um elemento importantíssimo para que ocorra o aquecimento.

Os seios paranasais compreendem os seios maxilares, frontais, etmoidais e esfenoidais, revestido por epitélio tipo respiratório, sendo baixo e com poucas células caliciformes. É um dos principais sítios anatômicos acometidos por processos alérgicos, traumas, processos infecciosos e hemorragias. Todo o muco produzido nas cavidades acaba sendo drenado para as fossas nasais. Neles a lâmina própria apresenta pequenas e poucas glândulas (ROSA *et al.* 2015; JUNQUEIRA *et al.* 2008).

Posterior à cavidade nasal encontra-se a nasofaringe, ou seja, a primeira porção da faringe. Seu epitélio é do tipo respiratório, sendo substituído por um epitélio plano estratificado no local onde a faringe entra em contato com o palato mole (BREDA *et al.* 2008).

As doenças respiratórias crônicas acometem todo o sistema respiratório e são caracterizadas por uma condição inflamatória e que podem ser ocasionadas por bactérias, vírus, fungos e substâncias químicas presentes no ambiente, causando asma e fibrose dos pulmões, além de hepatopatias tóxicas crônicas, por exemplo (RIGOTTO *et al.* 2013). De acordo com Martins *et al.* (2015) a exposição a essas substâncias causam cansaço aos indivíduos e dificuldades na respiração, apresentando quadro clínico agudo.

Mamane *et al.* (2015) afirma que os trabalhadores responsáveis por aplicarem os defensivos agrícolas nas culturas podem apresentar deficiência no sistema respiratório e ainda de acordo com o autor, a exposição ocupacional a essas substâncias pode provocar sibilos, bronquite crônica e asma alérgica.

#### **1.4.3 Toxicidade aguda e crônica**

O Brasil ainda é conhecido por apresentar uma economia baseada na agricultura, cujo potencial é voltado para o desenvolvimento da indústria de adubos e defensivos agrícolas para as lavouras (KORBES *et al.* 2010). Com o crescimento da demanda nesse setor, os produtores aumentaram significativamente sua produção e reduziram as perdas nas safras. Isso se deve ao uso desenfreado e

indiscriminado de agrotóxicos, colocando em risco a saúde dos indivíduos que ficam expostos a essas substâncias.

Os agrotóxicos classificam-se conforme sua composição e finalidade, ou seja, são classificados como acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, nematicidas, rodenticidas e moluscicidas. Os herbicidas representam 45% do valor total de agrotóxicos comercializados no país (ISMAEL *et al.* 2015). No Brasil, em 2009, foram notificados aproximadamente 11.641 casos de intoxicação aguda devido ao uso de agrotóxicos na agricultura, segundo o Sistema Nacional de Intoxicações Toxicológicas (SINITOX) (CORDEIRO, 2014).

De acordo com a ANVISA o 2,4-D classifica-se como Classe I, ou seja, é Extremamente Tóxico (Quadro 3), baseando-se nos efeitos agudos que o composto é capaz de produzir após uma única exposição, em animais de laboratório.

QUADRO 3 - Classificação dos defensivos agrícolas de acordo com os efeitos causados à saúde humana.

<b>Classe toxicológica</b>	<b>Toxicidade</b>	<b>DL<sub>50</sub> (mg / kg)</b>	<b>Faixa colorida</b>
<b>I</b>	Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelho
<b>II</b>	Altamente tóxico	5 < DL <sub>50</sub> ≤ 50	Amarelo
<b>III</b>	Moderadamente tóxico	50 < DL <sub>50</sub> ≤ 500	Azul
<b>IV</b>	Pouco tóxico	DL <sub>50</sub> > 5000 mg kg <sup>-1</sup>	Verde

Fonte: ANVISA, 2016.

A exposição aos herbicidas ocorre por diferentes vias. A via inalatória (por meio da respiração) e dérmica (pele), são vias que propiciam o transporte do herbicida para a corrente sanguínea, além de serem as vias de exposição mais

comuns em indivíduos que trabalham com esse tipo de defensivo agrícola (CARMO, 2007). Também fazem parte desse grupo pessoas que se localizam próximas as áreas onde ocorre a pulverização da substância e/ou tenham contato com água, objetos e alimentos contaminados. Outra forma de contaminação que também deve ser destacada é a oral, relacionada a ingestão de alimentos e/ou água também contaminados. O embrião e o feto, ainda em formação, através da placenta, podem entrar em contato com o defensivo, caso a mãe tenha sido exposta, antes ou durante a gestação (FRIEDRICH, 2014).

Os efeitos causados aos seres humanos devido à exposição aos herbicidas dividem-se em dois diferentes grupos e relacionam-se com a frequência de exposição. Os efeitos agudos manifestam-se, geralmente, nas primeiras 24 horas após a exposição única e em grandes quantidades da substância. A exposição por meio da pulverização e tentativas de suicídio são exemplos desse tipo de efeito. A exposição contínua e em baixas doses geram efeitos crônicos, que surgem após semanas, meses ou até anos após a exposição (AMARANTE JUNIOR *et al.* 2002).

De acordo com Friedrich (2014) dependendo da via de absorção que o defensivo percorre, ele pode ser metabolizado de maneiras e/ou velocidades diferentes, formando produtos diferentes que podem ser mais danosos ou não, dependendo de sua concentração, idade do indivíduo e presença de outros contaminantes.

A exposição prolongada ao herbicida pode provocar enfisema pulmonar, traqueíte crônica, pneumofibrose e asma brônquica (DE FARIAS MASCARENHAS; PESSOA, 2013).

Associando os fatores anteriormente apresentados e as imprudências por parte do homem na utilização e manipulação inadequada dos herbicidas, esses fatores podem trazer impactos ao meio ambiente e também aos indivíduos. Em relação a esse contexto, destaca-se o herbicida 2,4-D, sendo muito utilizado na cultura de cana-de-açúcar, podendo contribuir para agravos na saúde humana. Estudos demonstram que a exposição a esse herbicida causa toxicidade no sistema reprodutor, desregulação endócrina, câncer, irritação ocular e dérmica, além de efeitos neurotóxicos (AMARANTE JUNIOR; SANTOS; NUNES, 2003; FRIEDRICH, 2014; SILVA *et al.* 2011). Mesmo sendo de grande importância, são escassos os estudos que avaliem as alterações decorrentes do uso do herbicida 2,4-D no hemograma e nas células da mucosa nasal, já que as informações fornecidas



podem ser utilizadas com o intuito de ajudar na compreensão da interação dessa substância no organismo humano.

Neste contexto, a hipótese do estudo é de que os modelos experimentais expostos a diferentes concentrações ao herbicida 2,4-D apresentam alterações nos componentes sanguíneos e no infiltrado inflamatório da mucosa nasal.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar os componentes do sangue e infiltrado inflamatório em modelos experimentais submetidos à exposição ao herbicida 2,4-D, em diferentes intervalos de tempo e concentrações.

### **2.2 Objetivos Específicos**

#### **Em diferentes intervalos de tempo e concentrações:**

- ✓ Analisar os componentes do sangue, através do hemograma, em camundongos que foram submetidos à exposição ao herbicida 2,4-D;
- ✓ Analisar o infiltrado inflamatório dos animais que foram submetidos à exposição ao herbicida 2,4-D, utilizando-se da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE);
- ✓ Analisar, de forma semiquantitativa, os mastócitos presentes na lâmina própria do epitélio nasal dos camundongos expostos ao herbicida 2,4-D, utilizando-se da coloração de Azul de toluidina.

### **3 ARTIGO 1**

O presente trabalho deu origem ao artigo “AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO”, que será submetido ao periódico *Anais da Academia Brasileira de Ciências*.

## **Avaliação dos componentes sanguíneos de camundongos submetidos à exposição ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético**

FABIOLA DE A. MELLO<sup>1</sup>, GISELE QUINALLIA<sup>1</sup>, ANA L. MARION<sup>2</sup>, FERNANDA C. JORGE<sup>2</sup>, LAURA M. MARINELLI<sup>2</sup>, ANA K.M. SALGE<sup>3</sup>, CECÍLIA B. LAPOSY<sup>4</sup>, EDSON A. MARECO<sup>5</sup>, ANA PAULA A. FAVARETO<sup>5</sup> and RENATA C.R. SILVA<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Pós-graduação Strictu Sensu em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, Km 572, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, Km 572, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Enfermagem, Doutorado em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás, Rua 227, setor universitário, 74605080, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>4</sup>Docente do Programa de Pós Graduação Strictu Sensu em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, Km 572, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil.

<sup>5</sup>Docentes do Programa de Pós-graduação Strictu Sensu em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, Km 572, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil.

Paravras-chave: 2,4-D, Alterações hematológicas, Defensivos agrícolas e Processo inflamatório.

### **Avaliação do hemograma de camundongos expostos ao 2,4-D**

Seção Acadêmica: Ciências da Saúde

Autor correspondente: Fabiola de Azevedo Mello

Endereço: Rua Carlos Chezine, 151, casa 03

Telefone: (18) 991340870

E-mail: fabiola-azevedo@hotmail.com

**Abstract**

The 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide is an acid used to combat weeds in various types of agricultural crops. However, the improper use of it might have negative impact on human health. Hematological parameters reflect changes undergone by the body and quickly changes due to the use of pesticides. The objective of this study was to analyze the blood components of mice submitted to nebulization of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide at different time intervals and concentrations. Eighty male Swiss mice were divided into four groups (n = 20): saline, low, medium and high concentrations. All animals were exposed to the nebulization predefined for each group for 15 minutes during different time intervals: 24, 48, 72 and 192 hours. Blood sample was collected by intracardiac puncture and the material was subsequently processed in a haematological analyzer. All animals in the low concentration group presented microcytosis and hypochromia within 72 hours; Eosinophilia and lymphocytosis within 48 hours. Neutrophilia was observed in the high concentration group over the 192 hour interval. In conclusion we observed that in spite of hematological values alteration, the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid can not be considered a dose and time-dependent herbicide.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o elevado crescimento demográfico forçou o aumento da produção de alimentos e utilização intensa de defensivos agrícolas, visando o alto índice de produção. A descoberta do potencial de algumas substâncias em relação ao controle de pragas, plantas daninhas e fungos indesejáveis na agricultura, possibilitou o aumento das áreas para o cultivo, além da produção de alimentos (Monquero et al. 2008). Diante desse cenário, os impactos causados ao meio ambiente e a saúde humana tornaram-se uma verdadeira ameaça à qualidade de vida de todas as gerações.

O herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é utilizado no controle de ervas daninhas e por ser uma auxina sintética, provoca distúrbios nos vegetais, inibindo o crescimento das plantas (Machi et al. 2014, Amarante Junior et al. 2003).

O exame hematológico é utilizado para fins analíticos e seus parâmetros são capazes de refletirem as alterações sofridas pelo corpo e por responderem, de maneira rápida, as mudanças em decorrência da utilização de defensivos agrícolas (Atamanalp et al. 2002). Por isso, estudos que avaliem as alterações decorrentes do uso do herbicida 2,4-D, no hemograma, são de grande importância, pois os resultados obtidos podem ser utilizados para ajudarem na compreensão da interação dessa substância química com o organismo humano.

Com base nesses aspectos, o objetivo do estudo foi analisar as possíveis alterações hematológicas de camundongos submetidos à exposição ao herbicida ácido 2,4-D, em diferentes intervalos de tempo e concentrações.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### ASPECTOS DE NATUREZA ÉTICA

O estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 2563.

### CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA E PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Para a realização dos experimentos foram utilizados 80 camundongos *Swiss* adultos machos (30-45g), fornecidos pelo Biotério Central da instituição de origem, alojados em gaiolas plásticas coletivas (5 animais por gaiola) medindo 30x16x19 centímetros (cm), a temperatura média de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07:00 as 19:00 horas (período claro) e 19:00 as 07:00 horas (período escuro). Todos os animais receberam ração padrão (Primor®) e água *ad libitum*.

Para a realização dos experimentos, os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=20). Para todos os grupos, os animais foram expostos à nebulização por 15 minutos, em diferentes intervalos de tempo: 24, 48, 72 e 192 horas, assim distribuídos:

- GS: Grupo Salina, expostos à nebulização com solução de cloreto de sódio (NaCl);
- GBC: Grupo Baixa Concentração de 2,4-D, expostos à nebulização ao herbicida com  $3,71 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha);
- GMC: Grupo Média Concentração de 2,4-D, expostos à nebulização ao herbicida com  $6,19 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha);

- GAC: Grupo Alta Concentração de 2,4-D, expostos à nebulização ao herbicida com  $9,28 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha).

Todas as concentrações preconizadas para a nebulização do herbicida 2,4-D foram baseadas na bula do defensivo agrícola 2,4-D® (Nortox, Paraná, Brasil) e adaptadas ao tamanho das caixas onde os animais foram expostos. O protocolo de experimentação contou com duas caixas (32x 24x 32 cm) cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star®, onde as diferentes concentrações do herbicida estabelecidas para cada grupo, foram diluídas em 10 ml de NaCl 0,9% (Figura 1).

No primeiro dia de exposição, 80 camundongos foram submetidos à nebulização com a substância preconizada para cada grupo (salina ou herbicida), Após 24 horas, 20 animais foram anestesiados, intraperitonealmente, com Tiopental Sódico na dose de 100 mg/Kg por peso do animal, para que fosse possível a coleta de sangue. Após 48 horas, 20 animais, que receberam a segunda nebulização, foram anestesiados para a coleta sanguínea. Os outros 20 animais que receberam a terceira e última nebulização, após 72 horas, também foram anestesiados e submetidos às coletas. Finalmente, após 192 horas, os 20 animais que restaram, também foram anestesiados para a coleta de sangue. Logo após o término das coletas, todos os camundongos foram eutanasiados.

#### *COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE*

A coleta da amostra de sangue de cada animal foi de 2 mL através da punção intracardíaca, para a confecção do hemograma. Tanto as plaquetas, quanto as séries vermelha e branca foram processadas em analisador hematológico modelo



POCH-100iV DIFF (Sysmex do Brasil Indústria e Comércio LTDA®, Curitiba/PR-Brasil).

### *ANÁLISE ESTATÍSTICA*

Inicialmente, verificou-se a normalidade da distribuição dos valores. Para a análise de normalidade foi utilizado o pacote estatístico Shapiro-Wilk disponível no programa R (versão 3.2.3). Para a análise estatística dos dados, considerou-se a presença de dois fatores (Tempo x Concentração). Neste sentido, foi utilizado o teste estatístico de análise de variância de dois fatores (Two-way Anova), disponível no programa estatístico Graphpad Prism (Versão 5.0). Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram  $p < 0,05$ .

### **RESULTADOS**

Durante o desenvolvimento do estudo, o mesmo apresentou limitações em sua primeira coleta de sangue. Os animais do grupo salina expostos a nebulização ao NaCl no intervalo de tempo de 24 horas vieram à óbito após a administração do anestésico, tornando impossível a retirada de sangue, já que a coleta deve ser realizada apenas com o animal vivo. Sendo assim, para a avaliação dos componentes sanguíneos, os grupos GBC, GMC e GAC expostos a diferentes concentrações do herbicida, no intervalo de tempo de 24 horas, foram retirados do estudo para que a análise estatística não fosse prejudicada.

De acordo com o tempo de exposição ao 2,4-D, a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) obtida no estudo demonstrou valor significativamente maior no GBC no intervalo de tempo de 192 horas, quando comparado ao de 48 horas (Figura 2).

Em relação à concentração preconizada para cada grupo, a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) apresentou valor significativamente maior no GBC no intervalo de tempo de 72 horas, quando comparado ao de 48 horas (Figura 3). O Volume Corpuscular Médio (VCM) apresentou valor significativamente maior no intervalo de tempo de 72 horas quando comparado ao de 48 horas (Figura 4).

Em relação ao leucograma, os eosinófilos apresentaram valores significativamente maiores no GBC no intervalo de tempo de 48 horas, quando comparado aos intervalos de 72 horas e 192 horas (Figura 5). Os linfócitos apresentaram valores significativamente maiores no intervalo de tempo de 48 horas, quando comparado ao de 192 horas (Figura 6). E o outro componente sanguíneo que também apresentou valores significativamente maiores foram os neutrófilos, no GAC no intervalo de tempo de 192 horas, quando comparado ao de 48 horas (Figura 7).

## **DISCUSSÃO**

Em relação ao GBC do componente sanguíneo CHCM, a exposição ao herbicida durante 192 horas aumentou significativamente quando comparado ao grupo de 48 horas, mas quando comparado ao seu valor padrão, o grupo de 192 horas apresentou CHCM diminuído. Os valores do componente HCM foram significativamente maiores no GBC no intervalo de tempo de 72 horas, quando comparado ao de 48 horas, mas quando comparado ao seu valor padrão, o grupo exposto há 72 horas ao herbicida apresentou HCM diminuído, caracterizando uma hipocromia.

De acordo com Abbassy e Mossa (2012), essa diminuição pode estar relacionada à instabilidade maior dessas células e/ou diminuição de sua produção,

devido ao efeito tóxico causado pelo uso do herbicida nas membranas das células ou até mesmo na medula óssea, levando também a diminuição da hemoglobina.

A hipocromia também foi observada no estudo de Ghaffar et al. (2014). De acordo com os autores, os valores diminuídos de hemoglobina podem estar relacionados à diminuição de sua produção ou da ligação do inseticida em estudo, com o ferro, acarretando na diminuição do tamanho dos eritrócitos e uma menor produção, pela medula óssea, do grupo heme. Outra hipótese também sugerida pelos autores é a de que podem ter ocorrido hemorragias intracelulares e/ou aumento da destruição dessas células.

Em relação ao GBC do componente sanguíneo VCM, a exposição ao herbicida no intervalo de tempo de 72 horas aumentou significativamente quando comparado ao grupo exposto de 48 horas, mas quando comparado ao seu valor padrão, o mesmo apresentou declínio, caracterizando uma microcitose. Essa redução demonstra que houve uma síntese menor de hemoglobina nos eritrócitos e como resultados, são produzidas células menores (Benedetti e Silva., Dados não publicados).

A queda significativa dos componentes sanguíneos HCM e VCM são indicativos de uma hipocromia e microcitose, encontradas principalmente em Anemias Ferroprivas e em Doenças Crônicas (De Carvalho et al. 2006). Samiran-Monal et al. (2009) realizaram um estudo de investigação em relação ao perfil hematológico de ratos que foram submetidos a administração oral ao inseticida acetamiprid e sugerem que a hipocromia e microcitose apresentada, se deve a indução devido ao uso do defensivo agrícola.

Foi observada no GBC no intervalo de tempo de 48 horas uma eosinofilia absoluta que, de acordo com Kiesecker (2002) pode estar relacionada a uma reação

de defesa antitóxica do organismo dos modelos experimentais perante a exposição ao herbicida. Magalhas et al. (2015) relatam que a eosinofilia pode ocorrer em decorrência de uma reação de hipersensibilidade diante da exposição ao defensivo agrícola. Esse tipo de exposição associada à eosinofilia pode relacionar-se também ao surgimento de alergias na pele, explica De Farias (dados não publicados). Ainda de acordo com o autor, outras causas que se associam ao aumento significativo dos eosinófilos no sangue não devem ser descartadas.

O aumento significativo dos linfócitos (linfocitose) no GBC pode estar relacionado a uma compensação realizada pelos tecidos linfoides devido a destruição dos linfócitos circulantes diante da exposição ao 2,4-D (Kumar et al. 2016).

Os neutrófilos apresentaram, no GAC, valores significativamente maiores no intervalo de tempo de 192 horas, quando comparado ao de 48 horas. Essas células são lançadas na corrente sanguínea através da resposta do organismo a um agente estranho, cuja finalidade é levar mediadores de defesa do hospedeiro como, por exemplo, proteínas plasmáticas, caracterizando um processo inflamatório (Ikpesu 2013). O autor afirma que esse tipo de célula é capaz de apresentar alterações devido às modificações sofridas pelo meio ambiente em decorrência de sua sensibilidade e são os primeiros leucócitos a realizarem fagocitose diante de infecções e inflamações.

Em conclusão observamos que, apesar das alterações nos valores hematológicos, o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético não pode ser considerado dose e tempo-dependentes.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela taxa de estudo de Fabiola de Azevedo Mello e também a Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).

**Resumo**

O herbicida 2,4-diclorofenoxiacético é um ácido utilizado no combate de ervas daninhas em vários tipos de culturas agrícolas. No entanto, seu uso inadequado pode causar impactos à saúde humana. Os parâmetros hematológicos refletem as alterações sofridas pelo corpo e respondem rapidamente às mudanças em decorrência da utilização dos defensivos agrícolas. O objetivo deste estudo foi analisar os componentes do sangue de camundongos submetidos à nebulização do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético, em diferentes intervalos de tempo e concentrações. Foram utilizados 80 camundongos *Swiss* machos divididos em quatro grupos (n=20): salina, baixa, média e alta concentração. Todos os animais foram expostos às nebulizações preconizadas para cada grupo por 15 minutos, em diferentes intervalos de tempo: 24, 48, 72 e 192 horas. A coleta de sangue foi através de punção intracardiaca e, posteriormente o material foi processado em analisador hematológico. Todos os animais do grupo baixa concentração apresentaram microcitose e hipocromia no intervalo de 72 horas; eosinofilia e linfocitose no intervalo de 48 horas. Foi verificada neutrofilia no grupo alta concentração no intervalo de 192 horas. Em conclusão observamos que, apesar das alterações nos valores hematológicos, o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético não pode ser considerado dose e tempo-dependentes.

**Palavras-chave:** 2,4-D, Alterações hematológicas, Defensivos agrícolas e Processo inflamatório.

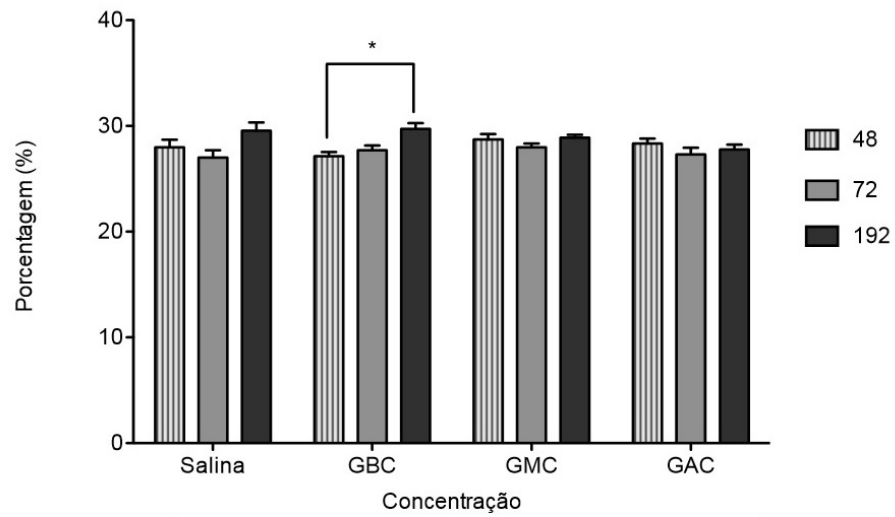
## REFERÊNCIAS

- ABBASSY MA, MOSSA AH. 2012. Haemato-biochemical effects of formulated and technical cypermethrin and deltamethrin insecticides in male rats. *J Pharmacol Toxicol*, 7: 312-21.
- AMARANTE JUNIOR OP, SANTOS TD, NUNES GS. 2003. Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D). *Quím. Nova*, 26: 223-229.
- ATAMANALP M, YANIK T, HALILOGLU I, ARAS S. 2002. Alterations in the hematological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to cypermethrin. *IJA*. 54: 99-103.
- DE CARVALHO MC, BARACAT ECE, SGARBIERI VC. 2006. Anemia ferropriva e anemia de doença crônica: distúrbios do metabolismo de ferro. *Segur. Alim. Nutr*, 13: 54-63.
- GHAFFAR, A, SANA A, RIAZ H, TANVEER H, MARYAM S, SOBIA N, SANA A. 2014. Clinicohematological disparities induced by triazophos (organophosphate) in Japanese quail. *Pak. Vet. J*, 34: 257-259.
- IKPESU TO. 2013. Recovery mechanism in fishes with reference to recuperation of haemathological parameters in *clarias gariepinus* aberrated by herbicide paraquat dichloride. *Bulletin of Pharmaceutical and Medical Sciences (BOPAMS)*, 1: 27-35.
- KIESECKER JM. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature?. *Proc Natl Acad Sci*, 99: 9900-9904.
- KUMAR P, GUPTA YKumar, PANDEY D. 2016. Effect of pesticides 2, 4-on hematological parameters of *channa punctatus*. *International Journal of Biological Research*, 4: 245-248.
- MACHI AR, FERRARI L, MENDES A, ARTHUR V. 2014. Efeitos da radiação gama (60Co) sobre o herbicida 2, 4-D no controle de trapoeraba (*Commelina virginica*. L). *Rev. Verde* 9: 258-262.
- MAGALHÃES HKN, SANTOS LFL, LEITE AKRM, RIBEIRO LC, COUTINHO BP. 2015. Intoxicação por ivermectina em gato-Relato de caso. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 9: 69-77.
- MONQUERO PA, AMARAL LR, BINHA DP, SILVA AC, SILVA PV. 2008. Potencial de lixiviação de herbicidas no solo submetidos a diferentes simulações de precipitação. *Planta Daninha* 26: 403-409.
- SAMIRAN-MONDAL RC, GHOSH MM, GHOSH CK. 2009. In-vivo sub-acute oral acetamiprid toxicity on hematological indices in *Rattus norvegicus*. *Environ Ecol Stat*, 27: 1767-1769.

## ANEXO 1

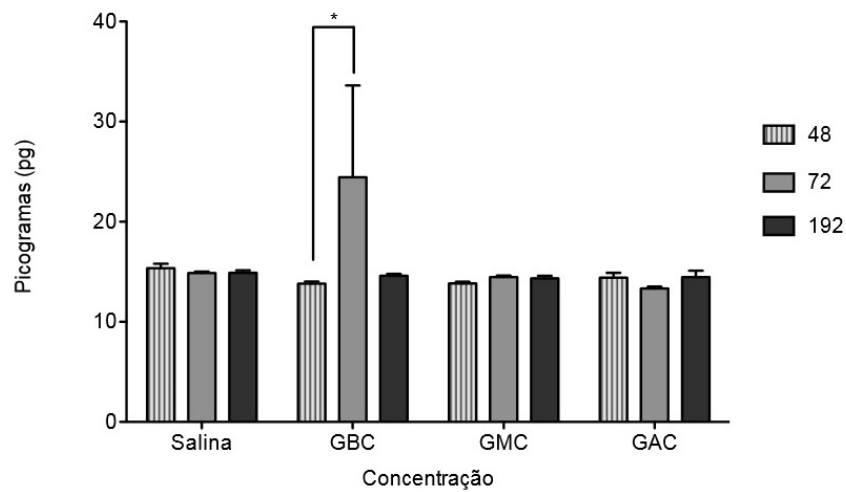


**Figura 1** – Protocolo de exposição ao herbicida 2,4-D

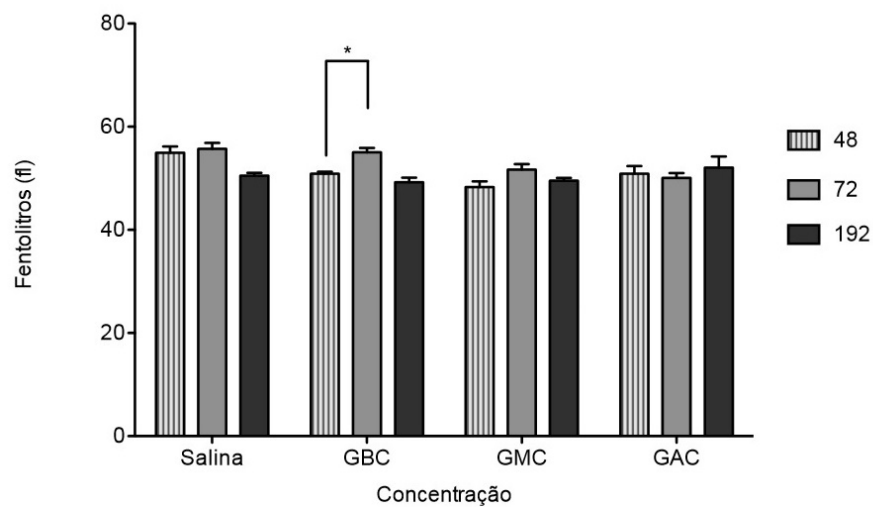


**Figura 2** – Valores de CHCM (%) de acordo com o tempo de exposição ao NaCl e ao herbicida 2,4-D em diferentes tempos de exposição

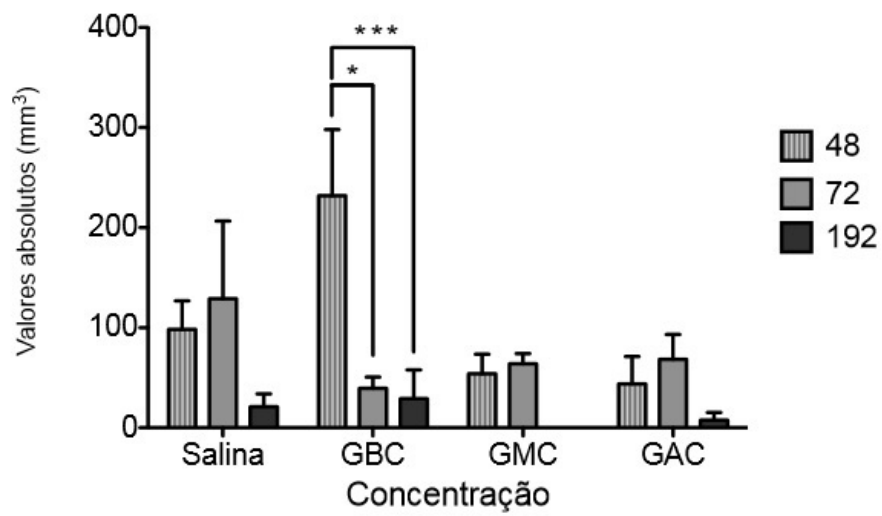




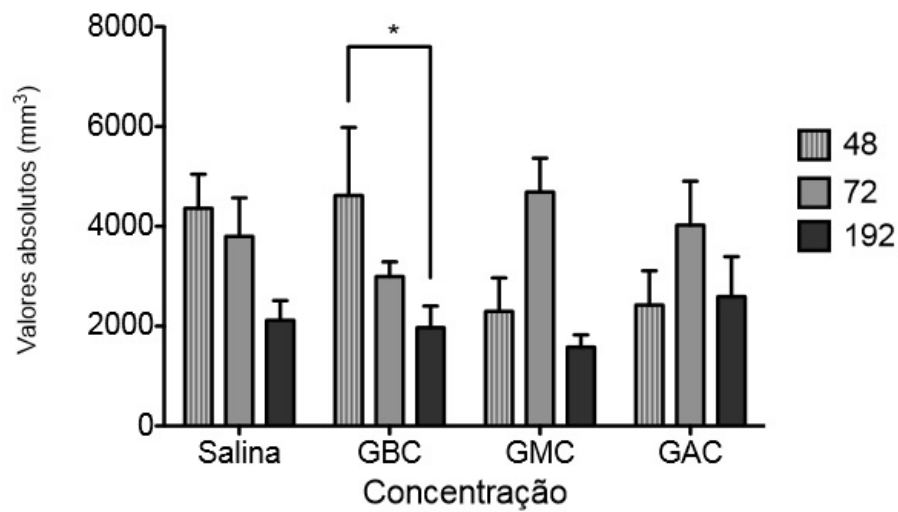
**Figura 3** - Valores de HCM (em picogramas) de acordo com a concentração de NaCl e do herbicida 2,4-D em diferentes tempos de exposição



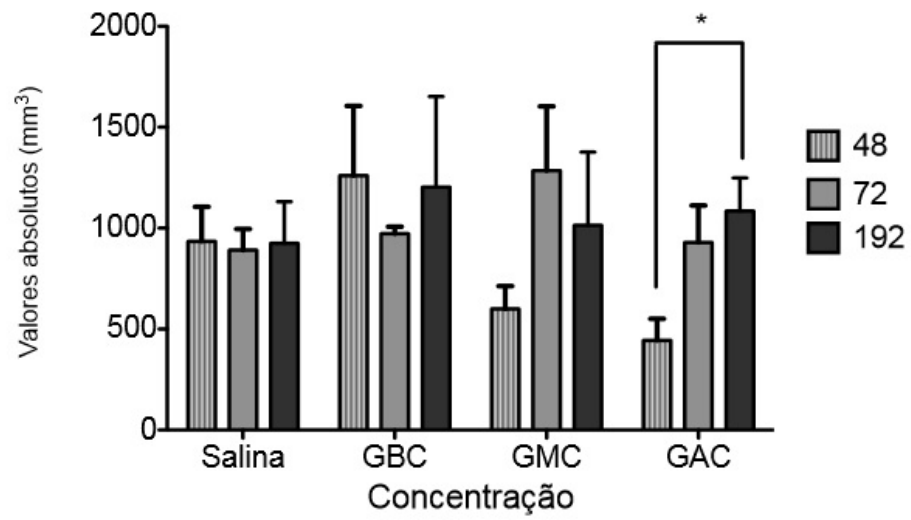
**Figura 4** – Valores de VCM (em fentolitros) de acordo com a concentração de NaCl e do herbicida 2,4-D em diferentes tempos de exposição



**Figura 5** – Valores absolutos de eosinófilos de acordo com a concentração de NaCl e do herbicida em diferentes tempos de exposição



**Figura 6** – Valores absolutos de linfócitos de acordo com a concentração de NaCl e do herbicida em diferentes tempos de exposição



**Figura 7** – Valores absolutos de neutrófilos de acordo com a concentração de NaCl e do herbicida em diferentes tempos de exposição

#### **4 ARTIGO 2**

O presente trabalho deu origem ao artigo “AVALIAÇÃO DO EPITÉLIO NASAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO”, que será submetido ao periódico *Clinics*.

**Avaliação do epitélio nasal de camundongos submetidos à exposição ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético**

Fabiola de A. Mello<sup>I</sup>, Gisele Quinallia<sup>I</sup>, Ana L. Marion<sup>II</sup>, Fernanda C. Jorge<sup>II</sup>, Laura M. Marinelli<sup>II</sup>, Ana K.M. Salge<sup>III</sup>, Edson A. Mareco<sup>I</sup>, Ana P.A. Favareto<sup>I</sup> and Renata C.R. Silva<sup>I</sup>

<sup>I</sup>Universidade do Oeste Paulista, Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Presidente Prudente/SP, Brasil. <sup>II</sup> Universidade do Oeste Paulista, Faculdade de Medicina, Presidente Prudente/SP, Brasil. <sup>III</sup> Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Enfermagem, Goiânia/GO, Brasil.

## RESUMO

**OBJETIVO:** O objetivo do estudo foi analisar o infiltrado inflamatório dos camundongos submetidos à nebulização ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético, em diferentes intervalos de tempo e concentrações.

**MÉTODOS:** Foram utilizados 80 camundongos *Swiss* machos divididos em quatro grupos (n=20): salina, baixa, média e alta concentração. Todos os animais foram expostos às nebulizações preconizadas para cada grupo por 15 minutos, em diferentes intervalos de tempo: 24, 48, 72 e 192 horas. O protocolo de exposição contou com duas caixas ligadas a um nebulizador ultrassônico e o focinho de cada animal foi retirado, após a eutanásia, para a análise histológica.

**RESULTADOS:** A contagem de mastócitos apresentou valores significativamente aumentados no grupo alta concentração, no intervalo de tempo de 48 horas, quando comparado ao de 24 horas.

**CONCLUSÃO:** A exposição ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético pode estar relacionada ao surgimento de reações alérgicas.

**Palavras-chave:** 2,4-D, Defensivos agrícolas, Infiltrado Inflamatório e Mastócitos.

## **INTRODUÇÃO**

O aumento das áreas agrícolas sem o planejamento territorial adequado fez com que os impactos causados ao meio ambiente, devido ao uso desenfreado dos herbicidas, também aumentassem, causando intoxicações nos indivíduos, além de alterações em seu sistema respiratório (1). Os defensivos agrícolas são capazes de provocar danos e irritações nas vias aéreas, tornando-as sensíveis diante de agentes que causam alergias e inflamações (2).

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi o primeiro herbicida seletivo desenvolvido no ano de 1940 e por ser uma auxina sintética, provoca distúrbios nos vegetais. Os diferentes modos de utilização do herbicida permitem que ele possa estar presente em diversas matrizes como o ar, a água e o solo, contaminando diretamente as pessoas que residem próximas às áreas onde a substância é pulverizada (3).

O objetivo do estudo foi analisar o infiltrado inflamatório dos camundongos submetidos à nebulização ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), em diferentes intervalos de tempo e concentrações.

## **MÉTODOS**

### **Aspectos de natureza ética**

O estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 2563.

### **Caracterização da amostra e protocolo de exposição ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético**

Para a realização dos experimentos foram utilizados 80 camundongos *Swiss* adultos machos (30-45g), fornecidos pelo Biotério Central da instituição de origem, alojados em gaiolas plásticas coletivas (5 animais por gaiola) medindo 30x16x19 centímetros (cm), a temperatura média de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07:00 as 19:00 horas (período claro) e 19:00 as 07:00 horas (período escuro). Todos os animais receberam ração padrão (Primor®) e água *ad libitum*.

Para a realização dos experimentos, os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=20). Para todos os grupos, os animais foram expostos à nebulização por 15 minutos, em diferentes intervalos de tempo: 24, 48, 72 e 192 horas, assim distribuídos:

- GS: Grupo Salina, expostos à nebulização com solução de cloreto de sódio (NaCl);
- GBC: Grupo Baixa Concentração de 2,4-D, expostos à nebulização ao herbicida com  $3,71 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha);
- GMC: Grupo Média Concentração de 2,4-D, expostos à nebulização ao herbicida com  $6,19 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha);
- GAC: Grupo Alta Concentração de 2,4-D, expostos à nebulização ao herbicida com  $9,28 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha).

Todas as concentrações preconizadas para a nebulização do herbicida 2,4-D foram baseadas na bula do defensivo agrícola 2,4-D® (Nortox, Paraná, Brasil) e adaptadas ao tamanho das caixas onde os animais foram expostos. O protocolo de experimentação contou com duas caixas (32 x 24 x 32 cm) cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star®, onde as diferentes



concentrações do herbicida estabelecidas para cada grupo, foram diluídas em 10 ml de NaCl 0,9% (Figura 1).



**Figura 1** – Protocolo de exposição ao herbicida 2,4-D

No primeiro dia de exposição, 80 camundongos foram submetidos à nebulização com a substância preconizada para cada grupo (salina ou herbicida). Após 24 horas, 20 animais foram anestesiados, intraperitonealmente, com Tiopental Sódico na dose de 100 mg/Kg por peso do animal e foram eutanasiados para a coleta do epitélio nasal. Após 48 horas, 20 animais, que receberam a segunda nebulização, foram anestesiados e eutanasiados. Os outros 20 animais que receberam a terceira e última nebulização, após 72 horas, também foram anestesiados e eutanasiados. Finalmente, após 192 horas, os 20 animais que restaram, também foram anestesiados e eutanasiados.

## **Coleta e Análise do epitélio nasal**

Após a eutanásia dos animais, o focinho de cada camundongo foi retirado para a realização da análise histológica, posteriormente, fixados em formaldeído a 10% e em seguida emblocados em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo eletrônico na espessura de 5µm e corados por Hematoxilina-Eosina (HE) para a quantificação dos leucócitos totais, onde as células coram-se de roxo e o citoplasma em rosa. Para a quantificação dos mastócitos, foi utilizada a coloração de Azul de toluidina, corando as células na cor azul.

Após a confecção das lâminas, foram capturadas imagens em microscópio com câmera acoplada (Leica ICC50 HD) para que fossem analisadas morfometricamente as imagens obtidas. Utilizou-se o software Image Pro Plus® para quantificar os mastócitos que estivessem na lâmina própria, em toda extensão do corte. Para a avaliação do infiltrado inflamatório foi utilizado o método semiquantitativo proposto por Carnieli et al. (4). Este sistema classifica o infiltrado inflamatório em score de 1 a 3, sendo: 1 (áreas de inflamação ocasionais); 2 (inflamação em maioria das áreas, cercadas por uma camada fina de células) e 3 (maioria das áreas inflamadas circundadas por uma camada grossa de células). As lâminas contendo os cortes histológicos foram cegadas para que os examinadores não soubessem o grupo analisado e, desta forma, emitissem falsos resultados.

## **Análise estatística**

Inicialmente, verificou-se a normalidade da distribuição dos valores. Para a análise de normalidade foi utilizado o pacote estatístico Shapiro-Wilk disponível no programa R (versão 3.2.3). Para a análise estatística dos dados, considerou-se a presença de dois fatores (Tempo x Concentração). Neste sentido, foi utilizado o

teste estatístico de análise de variância de dois fatores (Two-way Anova), disponível no programa estatístico Graphpad Prism (Versão 5.0). Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

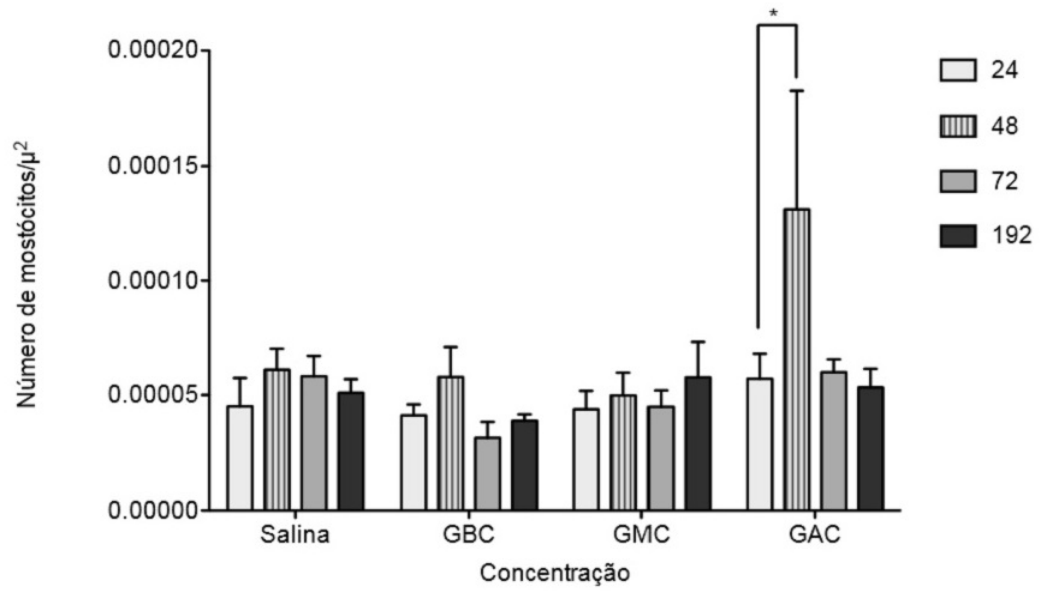
A Tabela 1 apresenta a média e o desvio padrão (DP) do peso corpóreo dos camundongos submetidos à nebulização ao NaCl e ao herbicida 2,4-D, em diferentes concentrações e tempos de exposição. Não houve diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 1** - Comparação do peso corpóreo, média e desvio padrão dos modelos experimentais submetidos à exposição ao NaCl e ao o herbicida 2,4-D.

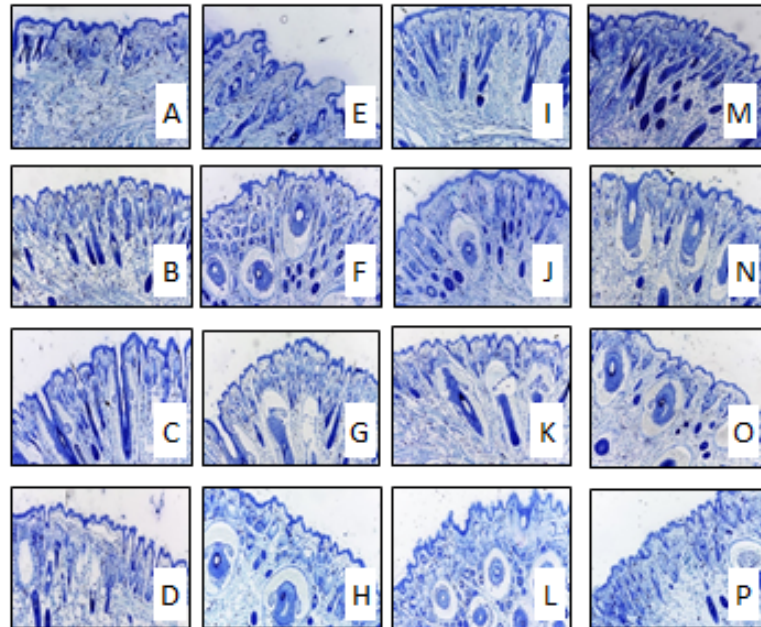
	24h		48h		72h		192h	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP
<b>Salina</b>	36,3±5,5	37,1±5,9	32,2±3,4	32,9±3,3	32,1±5,8	34,6±5,0	40,0±6,1	44,1±4,6
<b>GBC</b>	38,0±7,0	39,1±7,2	37,9±3,1	39,9±3,0	42,3±3,2	44,4±3,5	41,5±1,9	44,9±2,1
<b>GMC</b>	42,3± 4,5	43,5±4,2	42,0±1,5	43,9±2,2	41,9±5,0	43,3±5,0	40,4±6,1	42,2±4,8
<b>GAC</b>	39,0±7,1	39,4±7,0	34,0±5,0	35,3±5,6	39,7±3,6	42,2±3,2	39,6±2,3	41,8±2,1

No presente estudo, não foram verificadas diferenças significantes em relação a avaliação do infiltrado inflamatório e a área da mucosa nasal dos camundongos. A média de mastócitos presentes na mucosa dos animais apresentou valores aumentados ( $p < 0,05$ ) no Grupo Alta Concentração no intervalo de tempo de 48 horas, quando comparado ao de 24 horas (Figura 3 e 4).

**Figura 3** – Média de mastócitos presentes na mucosa nasal dos camundongos submetidos à nebulização ao NaCl e ao herbicida 2,4-D.



**Figura 4** – Cortes histológicos da mucosa nasal, para quantificação de mastócitos, em camundongos submetidos à nebulização ao NaCl e ao herbicida ácido 2,4-D.



Cortes histológicos da mucosa nasal. Em (A, B, C e D) GS exposto ao NaCl nos intervalos de 24 48, 72 e 192 horas, respectivamente (Azul de toluidina, 100x); em (F, G, e H) GBC exposto ao herbicida 2,4-D nos intervalos de 24 48, 72 e 192 horas, respectivamente (Azul de toluidina, 100x); em (I, J, K e L) GMC exposto ao herbicida 2,4-D nos intervalos de 24 48, 72 e 192 horas, respectivamente (Azul de toluidina, 100x) e em (M, N, O e P) GAC exposto ao herbicida 2,4-D nos intervalos de 24 48, 72 e 192 horas, respectivamente (Azul de toluidina, 100x).

## **DISCUSSÃO**

O peso corpóreo dos camundongos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, isso se deve ao curto período de exposição ao herbicida, que impossibilitou a alteração do metabolismo dos animais. Nosso estudo está de acordo com o achados encontrados por Uundeger et al. (5), que submeteram ratos a uma exposição durante 28 dias a dois organofosforados e observou a diminuição do peso corpóreo dos animais. De acordo com os autores, a diminuição pode estar relacionada ao tempo de exposição e ao aumento das doses dos defensivos agrícolas.

O aumento do número de mastócitos apresentou significância no GAC no intervalo de tempo de 48 horas, quando comparado ao de 24 horas. Nosso estudo corrobora com os achados de outros autores, que afirmam que o uso de defensivos agrícolas é um dos fatores responsáveis por desencadear o aumento de mastócitos (mastocitose) (6,7).

Em conclusão, os resultados mostram que a exposição ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético pode estar relacionada ao surgimento de reações alérgicas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela taxa de estudo de Fabiola de Azevedo Mello e também a Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).

## **REFERÊNCIAS**

1. Mascarenhas TKS, Pessoa YSR. Aspectos que potencializam a contaminação do trabalhador rural com agrotóxicos: uma revisão integrativa. Trab. & Edu. 2013;22(2): 87-103.

2. Hernández AF, Parrón T, Alarcón, R. Pesticides and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011;11(2):90-6.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. 2014. Monografia 2,4-D. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>. Acesso em: 20/11/2016.
4. Carnieli DS, Yoshioka, Silva LF, Lanças T, Arantes FM, Perini A, et al. Inflammation and remodeling in infantile, juvenile, and adult allergic sensitized mice. *Pediatr Pulmonol*. 2011;4(7):650-65.
5. Uudeger U, Institoris L, Siroki O, Nehéz M, Dési I. Simultaneous geno-and immunotoxicological investigations for early detection of organophosphate toxicity in rats. *Ecotoxicol. Environ*. 2000; 45(1): 43-8.
6. El Lateef HA. Review article: Mast cell activation disease. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol*. 2014; 11(2): 53-62.
7. Sato T, Taguchi M, Nagase H, Kito H, Niikawa M. Augmentation of allergic reactions by several pesticides. *Toxicology*. 1998; 126(1): 41-53.

## **5 CONCLUSÕES FINAIS**

O uso intenso de herbicidas na agricultura tem provocado contaminação do solo e dos recursos hídricos, além de comprometer a saúde humana. Os dados apresentados revelam que o aumento da dose e o tempo de exposição ao herbicida 2,4-diclorofenoxiacético não são dependentes, já que a maioria das alterações foram observadas no GBC e nos intervalos de tempo de 48 horas e 72 horas. No entanto, sob altas concentrações do herbicida, é possível encontrar uma grande quantidade de mastócitos, o que representa a ação do organismo nos mecanismos de defesa contra a entrada de agentes patológicos químicos nas vias aéreas inferiores.



## REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Portaria nº 03 de 16 de janeiro de 1992**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bdea3b804745780e857bd53fbc4c6735/D27++24-D.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 07 jun. 2016.
- ALAVANJA, M. C. R.; ROSS, M. K.; BONNER, M. R. Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n. 2, p. 120-142, 2013.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Revisão das propriedades, usos e legislação do Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D). **Cad. Pesq**, São Luís, v. 13, n. 1, p. 60-70, jan./jun. 2002.
- AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; NUNES, G. S. Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 223-229, ja./ago. 2003.
- BARBOSA, P. M. K.; DE OLIVEIRA SANTOS, B. M. Alterações morfológicas em traquéias de pacientes intubados em função do tempo de intubação. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 11, n. 6, p. 727-733, 2003.
- BEARD, J. et al. Health impacts of exposure pesticide in a cohort of outdoor workers. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 5, p. 724-730. 2003.
- BENER, A. et al. Respiratory symptoms, skin disorders and serum IgE levels in farm workers. **Allergy Immunology**, v. 31, n. 2, p. 52-56. 1999.
- BERTASSOLI, B. M. et al. Morphology of the trachea and larynx of opossums (*Didelphis sp.*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 222-229, abr./jun. 2013.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 396, de 03 Abril de 2008**. Disponível em: [http://www.mma.gov.br/port/conama/legislacao/CONAMA\\_RES\\_CONS\\_2008\\_396.pdf](http://www.mma.gov.br/port/conama/legislacao/CONAMA_RES_CONS_2008_396.pdf). Acesso em: 07 de jun. 2016.
- BREDA, E. et al. Nasopharyngeal carcinoma study: introduction and multidisciplinary perspective. **Acta Médica Portuguesa**, v. 21, n. 3, p. 273-84, jun./nov. 2008.
- BURNS, C. J.; BEARD, K. K.; CARTMILL, J. B. Mortality in chemical workers potentially exposed to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) 1945–94: an update. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 58, n. 1, p. 24-30, 2001.
- CARMO, E. D. **Avaliação da ação sistêmica de extrato liofilizado de *Pfaffia glomerata* na carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em pele de camundongos hairless**. 2007. 109 f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia. Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos-SP.

CATTANEO, R. **Parâmetros metabólicos e histológicos de Jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos à formulação comercial do herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D)**. 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Tóxica). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS.

CERDEIRA, A. L. et al. Metodologia analítica de resíduo do herbicida 2, 4-D (ácido 2, 4-diclorofenoxiacético) em amostras de água em área de cultivo de cana-de-açúcar. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 12, n. 1, p. 99-110, jan./dez. 2002.

CHARLES, J. M. et al. In vivo micronucleus assays on 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 444, n. 1, p. 227-234, 1999.

COMPSTON, J. E. et al. Reduced bone formation after exposure to organophosphates. **Lancet**, v. 354, n. 9192, p. 1791-1792, 1999.

CORDEIRO, T. A. **O que você precisa saber sobre a água de João Pessoa.**, João Pessoa: Ideia, 2014.

COSTA, A. G. F. et al. Effect of nozzles and pressures on spray drift of glyphosate + 2,4-D in field conditions. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 11, n. 1, p. 62-70, jan./abr. 2012.

DA COSTA LEITE, K.; TORRES, M. B. R. O uso de agrotóxicos pelos trabalhadores rurais do assentamento catingueira Baraúna-RN. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 3, n. 4, p. 06-28. 2008.

DARUICH, J.; ZURULMIK, F.; GIMENEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. **Environmental Research Section**, n. 85, p. 226-231. 2001.

DA SILVA AUGUSTO, L. G. Vulnerabilidades de trabalhadores rurais frente ao uso de agrotóxicos na produção de hortaliças em região do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, São Paulo, v. 37, n. 125, p. 89-98, jan./mai. 2012.

DA SILVA, L. C. S. et al. Arquitetura da árvore brônquica no sagui-de-tufo-preto: um modelo animal experimental para lesões do sistema respiratório. **Archives of Veterinary Science**, São Paulo, v. 17, n. 4, 2012.

DE ALVARENGA, C. B. et al. Effect of the water vapor pressure deficit in the air on hydropneumatic spraying of artificial targets. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 182-93, jan./fev. 2014.

DE FARIAS MASCARENHA, T. K. S.; PESSOA, Y. S. R. . Aspectos que potencializam a contaminação do trabalhador rural com agrotóxicos: uma revisão integrativa. **Trabalho & Educação**, v. 22, n. 2, p. 87-103, mai./ago. 2013.

DE OLIVEIRA, J. R. S. Introdução ao controle químico. **Biologia e manejo de plantas daninhas**, p. 125-140, 2011.

DE OLIVEIRA, T.; FAVARETO, A. P. A.; ANTUNES, P. Alexandra. Agrotóxicos: levantamento dos mais utilizados no oeste paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, p. 375-90. 2013.

FERRANTE, V. L. S. B.; BARONE, L. A. Parcerias com a cana-de-açúcar: tensões e contradições no desenvolvimento das experiências de assentamentos rurais em São Paulo. **Sociologias**, Porto Alegre, v. 15, n. 26, p. 262-305, jan./abr. 2011.

FERREIRA, M. L. P. C. A pulverização aérea de agrotóxicos no Brasil: cenário atual e desafios. **Revista de Direito Sanitário**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 18-45, nov./fev. 2015.

FIRETTI, R. et al. Análise de variáveis estratégicas para o desenvolvimento da agropecuária da região do Pontal do Paranapanema. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Piracicaba, v. 50, n. 1, p. 141-156, jan./mar. 2012.

FRAGA, W. G. et al. Identificação dos Principais Ingredientes Ativos em Agrotóxicos Ilegais Apreendidos pela Polícia Federal do Brasil e Quantificação do Metsulfurometilico e Tebuconazol. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n 3, p. 561-75, jan. 2016.

FRIEDRICH, K. **Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2, 4-D**. 44 f. 2014. Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ.

GOLLAPUDI, B. B. et al. Evaluation of the genotoxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives in mammalian cell cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 444, n. 1, p. 217-225, 1999.

HOAR, S. K. et al. Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and soft-tissue sarcoma. **Jama**, v. 256, n. 9, p. 1141-1147, 1986.

ISMAEL, L. L. et al. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: preocupação ambiental e de saúde para população paraibana. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 10, n. 3, p. 24-29, jul./set. 2015.

JUNQUEIRA, L. C. U. et al. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KORBES, D. et al. Alterações no sistema vestibulococlear decorrentes da exposição ao agrotóxico: revisão de literatura. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v. 15, n. 1, p. 146-152, 2010.

LEÃO, M. M. **Saúde e qualidade de vida de adolescentes de um assentamento rural no Pontal do Paranapanema-SP**. 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Odontologia Preventiva e Social) - Faculdade de Odontologia. Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

MACHI, A. R. et al. Efeitos da radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) sobre o herbicida 2, 4-D no controle de trapoeraba (*Commelina virginica*. L). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 9, n. 3, p. 258-262, jul./set. 2014.

MANAME, A. et al. Occupational exposure to pesticides and respiratory health. **European Respiratory Review**, v. 24, n. 136, p. 306-319, 2015.

MANCUSO, M. A. C.; NEGRISOLI, E.; PERIM, L. Efeito residual de herbicidas no solo ("Carryover"). **Revista Brasileira de Herbicidas**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 151-164, mai./ago. 2011.

MARCHESAN, I. Q.; MARCHESAN, I. Q. Avaliação e terapia dos problemas da respiração. **Marchesan IQ. Fundamentos em fonoaudiologia: aspectos clínicos da motricidade oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 23-36, 1998.

MARCHESAN, E. et al. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1053-1059, nov./mar. 2010.

MARTINS, L. F. D. et al. Risco de contaminação das águas de superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.10, p. 1715-21, out. 2012.

MARTINS, M. K. S. et al. Exposição ocupacional aos agrotóxicos: um estudo transversal. **Revinter Revista de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 5, n. 3, p. 7-22, out. 2015.

MCBRIDE, D. et al. The mortality and cancer experience of New Zealand Vietnam war veterans: a cohort study. **BMJ open**, v. 3, n. 9, p. e003379, 2013.

MILHOME, M. A. L. et al. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 363-372, jun./set. 2009.

MONQUERO, P. A. et al. Potencial de lixiviação de herbicidas no solo submetidos a diferentes simulações de precipitação. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 403-409, 2008.

MOTA, A. A. B. **Quantificação do ar incluído e espectro de gotas de pontas de pulverização em aplicações com adjuvantes**. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

PIGNATI, W.; OLIVEIRA, N. P.; SILVA, A. M. C. Surveillance on pesticides: quantification of use and prediction of impact on health, work and the environment for Brazilian municipalities. **Ciência & Saúde Coletiva**, Cuiabá, v. 19, n. 12, p. 4669-4678, 2014.

RIGOTTO, R. M. et al. Tendências de agravos crônicos à saúde associados a agrotóxicos em região de fruticultura no Ceará, Brasil. **Rev Bras Epidemiol**, v. 16, n. 3, p. 763-773, abr./jun. 2013.

ROSA, M. F. F. et al. Avaliação Radiológica Convencional dos Seios Paranasais. **Cadernos Brasileiros de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 3, p. 45-52. 2015.

SILVA, F. M. L. et al. Atividade residual de 2, 4-D sobre a emergência de soja em solos com texturas distintas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 10, n. 1, p. 29-36, jan./abr. 2011.

STALONE, L.; BESELER, C. Pesticide poisoning and depressive symptoms among farm residents. **Annals of Epidemiology**, v. 12, n. 6, p. 389-334. 2002.

STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 15, n. 1, p. 15-21, jan./jun. 2011.

WISSMANN, M. A. et al. Evolução do cultivo da cana-de-açúcar na região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Desenvolvimento Regional**, v. 2, n. 1, p. 95-117, out. 2014. Disponível em: <[http://gorila.furb.br/ojs/index.php/rbdr/article/view/4165/pdf\\_19](http://gorila.furb.br/ojs/index.php/rbdr/article/view/4165/pdf_19)>. Acesso em: 01 nov. 2016.

## ANEXO – NORMAS DE PUBLICAÇÃO

### NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS



**ISSN 0001-3765 printed version**  
**ISSN 1678-2690 online version**

The journal *Anais da Academia Brasileira de Ciências* from 2012 onwards only considers online submissions. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, please visit the new, improved online submission website at <https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>. Please read these instructions carefully and follow them strictly. In this way you will help ensure that the review and publication of your paper are as efficient and quick as possible. The editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions. Papers must be clearly and concisely written in English.

#### **Aim and editorial policy**

All submitted manuscripts should contain original research not previously published and not under consideration for publication elsewhere. The primary criterion for acceptance is scientific quality. Papers should avoid excessive use of abbreviations or jargon, and should be intelligible to as wide an audience as possible. Particular attention should be paid to the Abstract, Introduction, and Discussion sections, which should clearly draw attention to the novelty and significance of the data reported. Failure to do this may result in delays in publication or rejection of the paper. Articles accepted for publication become property of the journal.

Texts can be published as a review, a full paper (article) or as a short communication. Issues appear in March, June, September and December.

#### **Types of Papers**

##### **Reviews**

Reviews are published by invitation only. However, a proposal for a Review may be submitted in the form of a brief letter to the Editor at any time. The letter should state the topics and authors of the proposed review, and should state why the topic is of particular interest to the field.

##### **Articles**

Whenever possible the articles should be subdivided into the following parts: 1. Front Page; 2. Abstract (written on a separate page, 200 words or less, no abbreviations); 3. Introduction; 4. Materials and Methods; 5. Results; 6. Discussion; 7. Acknowledgments, if applicable; 8. References. Articles from some areas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6). Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals.

## **Short communications**

Short communications aim to report on research which has progressed to the stage when it is considered that results should be divulged rapidly to other workers in the field. A short communication should also have an Abstract and should not exceed 1,500 words. Tables and Figures may be included but the text length should be proportionally reduced. Manuscripts submitted as articles but found to fit these specifications will be published as short communications upon the author's agreement.

After the first screening, the articles will be evaluated by at least two reviewers, them being from educational and/or national and international research institutions, with proven scientific production. After due corrections and possible suggestions, the paper may be accepted or rejected, considering the reviews received.

We use the integrated Crossref Similarity Check program to detect plagiarism.

There are no APC and submission charges in the AABC.

## **Preparation of manuscripts**

All parts of the manuscript should be double-spaced throughout. After acceptance, no changes will be made in the manuscript so that proofs require only corrections of typographical errors. The authors should send their manuscript in electronic version only.

### **Length of manuscript**

While papers may be of any length required for the concise presentation and discussion of the data, succinct and carefully prepared papers are favored both in terms of impact as well as in readability.

### **Tables and Illustrations**

Only high-quality illustrations will be accepted. All illustrations will be considered figures including drawings, graphs, maps, photographs as well as tables with more than 12 columns or more than 24 lines (**maximum of 5 figures free of charge**). Their tentative placement in the text should be indicated.

### **Digitalized figures**

Figures should be sent according to the following specifications: 1. Drawings and illustrations should be in format EPS (PostScript) or AI (Adobe Illustrator) and never be inserted in text; 2. Images or figures in grayscale should be in format TIF and never be inserted in text; 3. Each figure should be saved in a separate file; 4. Figures should be submitted at high quality (minimum resolution of 300dpi) at the size they are to appear in the journal, i.e., 8 cm (one column) or 16.5 cm (two columns) wide, with maximal height for each **figure and respective legend smaller than or equal to 22 cm**. The legends to the figures should be sent double-spaced on a separate page. Each linear dimension of the smallest characters and symbols should not be less than 2 mm after reduction; 5. Manuscripts on Mathematics, Physics or Chemistry may be typesetted in , or . The TEX, PDF and BIB files should be sent, and EPS files if there are any figures; 6. Manuscripts without mathematical formulae may be sent in RTF, DOC or DOCX.

### **Front page**

The front page of the manuscript should present the following items: 1. Title of the article (the title should be short, specific, and informative); 2. Full name(s) of the author(s); 3. Full professional address of each author (institution, street, number, zip code, city/county, state if applicable, country, etc.); 4. Key words (four to six in alphabetical order); 5. Running title (up to 50 characters); 6. Academy Section (one out of our 10 areas) to which the content of the work belongs; 7. Name and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be provided.

### Acknowledgments

These should be included at the end of the text. Personal acknowledgments should precede those of institutions or agencies. Footnotes should be avoided; when necessary they must be numbered. Acknowledgments to grants and scholarships, and of indebtedness to colleagues as well as mention to the origin of an article (e.g. thesis) should be added to the Acknowledgments section.

### Abbreviations

Abbreviations should be defined at their first occurrence in the text, except for official, standard abbreviations. Units and their symbols should conform to those approved by the ABNT or by the Bureau International des Poids et Mesures (SI).

### References

Authors are responsible for the accuracy of the References. Published articles and those in press may be included. Personal communications (Smith, personal communication) must be authorized in writing by those involved. References to thesis, meeting abstracts (not published in indexed journals) and manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (Smith et al., unpublished data) and should NOT be included in the list of references.

The references should be cited in the text as, for example, 'Smith 2004', 'Smith and Wesson 2005' or, for three or more authors, 'Smith et al. 2006'. Two or more papers by the same author(s) in the same year should be distinguished by letters, e.g. 'Smith 2004a', 'Smith 2004b' etc. Letters should also distinguish papers by three or more authors with identical first author and year of publication. References should be listed according to the alphabetical order of the first author, always in the order SURNAME XY in which X and Y are initials. If there are more than ten authors, use et al. after the first author. References must contain the title of the article. Names of the journals should be abbreviated. For the correct abbreviations, refer to lists of the major databases in which the journal is indexed or consult the World List of Scientific Periodicals. The abbreviation to be used for the Anais da Academia Brasileira de Ciências is An Acad Bras Cienc. The following examples are to be considered as guidelines for the References.

### REFERENCES

- Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.
- Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Deland-Sheer E, Giuffrida R And Cesaro P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.
- Knowles RG and Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.
- Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

- |  |            |             |                 |
|--|------------|-------------|-----------------|
| <i>Books</i>   | <i>and</i> | <i>book</i> | <i>chapters</i> |
| Davies M. 1947. An outline of the development of Science. <i>Thinker's Library</i> , n. 120. London: Watts, 214 p.   |            |             |                 |
| Prehn RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. <i>Proceedings ...</i> , Philadelphia: J. B. Lippincott, p. 97-104.   |            |             |                 |
| Uytenbogaardt W And Burke EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.   |            |             |                 |
| Woody Rw. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), <i>Peptides, polypeptides and proteins</i> , New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350. |            |             |                 |



*Other**publications*

International Kimberlite Conference, 5, 1991. Araxá, Brazil. Proceedings... Rio de Janeiro: CPRM, 1994, 495 p.  
Siatycki J. 1985. Dynamics of Classical Fields. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 1985, 55 p. Preprint no. 600.

## NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA CLINICS



ISSN 1980-5322 versão online

Atualizado 2016/04/08

### Scope and editorial policy

**CLINICS** publishes peer-reviewed articles of interest to clinicians and researchers in the medical sciences. **CLINICS** is registered with **PubMed Central** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/795/>) and **SciELO** (<http://www.scielo.br/clinics>) and complies with the policies of funding agencies which request or require deposition of the published articles that they fund into publicly available databases. **CLINICS** supports the position of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trial registration. Visit <http://www.icmje.org/> for further details and <http://www.who.int/ictrp/network/en/> for the WHO's list of approved registries.

**Please make sure to submit your manuscript in the exact format that is described below. Failure to do so will cause the submission to be returned to you during the preliminary examination by the Editorial Office.**

- Manuscripts involving human subjects or the use of laboratory animals must clearly state adherence to appropriate guidelines and approval of protocols by their institutional review boards. Photographs that may identify patients or other human participants of studies shall be acceptable only when a legally valid consent form is signed by the participating patient, other human participant, or his/her legally constituted representative.
- Authors are strongly advised to use abbreviations sparingly whenever possible to avoid jargon and improve the readability of the manuscript. All abbreviations must be defined the first time that they are used. Only terms or expressions that are used at least 5 times throughout the text should be abbreviated. Never use abbreviations that spell common English words, such as FUN, PIN, SCORE, and SUN.
- **PROFESSIONAL ENGLISH REVISION**
- Prior to submission to **CLINICS** all manuscripts must undergo professional English revision. Upon submission an officially certified document issued by the language revision company or language reviewer, confirming that the manuscript has been revised must be uploaded as a complementary file.
- **CLINICS** highly recommends the company American Journal Experts (AJE). We have been working with AJE for many years, and are very satisfied with the quality of their work. We are pleased to inform you that we have negotiated a special fee for our authors. Please submit your manuscript to AJE through their website (<https://www.aje.com>). If you have any doubts please contact them

directly by email ([support@aje.com](mailto:support@aje.com)). Our 20% discount code is **CLINICS2016**. Premium Editing is mandatory for CLINICS.

- Our Editorial Policies for accepted manuscripts are listed below:
- Manuscripts that have already been revised by AJE: As soon as the manuscript is accepted for publication, the authors must send it to AJE again for a final revision. This revision is included in the initial fee, there is no extra cost.
- Manuscripts that have been revised by another company, other than AJE: As soon as the manuscript is accepted for publication, the authors must send it to AJE for a final revision (Premium Editing).

During the evaluation, process manuscripts undergo modifications, so a final revision is obligatory for all manuscripts approved for publication.

## **PUBLICATION FEES**

**CLINICS** uses a business model whereby expenses are partly recovered by charging the authors, or research sponsors, a publication fee for each published article. We have updated our 2016 prices, effective for articles submitted from 05/01/2016 onwards, as follows: original articles, review articles and rapid communications: **US\$ 1,500.00 (International authors)** and **R\$ 1.500,00 (Brazilian authors)**. There are no charges for Invited reviews, editorials and letters to the editors. **Waiver Policy:** Most institutions and funding agencies have set up funding sources to cover Article Publication Costs. Unfortunately **CLINICS** cannot grant fee waivers due to its 2016 policies.

## **SUBMISSION**

A copyright transfer form, signed by all authors, must be uploaded as a complementary file as soon as the manuscript is submitted. When the authors are satisfied that the manuscript complies with the journal format, our site should be accessed using the website [www.clinics.org.br](http://www.clinics.org.br). The system will guide authors through the manuscript submission process and will prompt authors to input information into specific fields as they are submitting their manuscript. The editorial office and authors will be automatically notified of the submission. Progress of the manuscript through the Editorial Office's procedures will be available to authors at all times. [Click here to download the Copyright Transfer Form.](#)

## **PEER**

Manuscripts are reviewed by at least two expert consultants. Accepted manuscripts are edited to comply with the journal's format, remove redundancies, and improve clarity and understanding without altering meaning. The edited text will be presented to authors for approval.

## **REVIEW**

## **Manuscript Categories**

**ORIGINAL STUDY:** Complete original studies should be submitted in this category. Three sections are offered: basic, clinical, and surgical research. Original studies must conform to the following format:

### **Title page**

- Title (up to 250 characters);
- Running title (up to 40 characters, letters and spaces);
- Full address of corresponding author only;

- Authors' names (without titles or degrees). *Authors should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Such participation must be declared in this section of the manuscript.*
- Any financial or other relationships that may lead to a conflict of interest must be disclosed.

## Manuscript

- **Abstract:** Abstracts are limited to 250 words and structured into objectives, method, results, and conclusions. Citations or abbreviations (except internationally recognized abbreviations, such as weights, measures, and physical or chemical abbreviations) are not permitted. Authors are strongly encouraged not to display numerical statistical information but to merely state what is significantly different (or not) between the described parameters.
- **Keywords:** For keywords, 3-6 items from the Medical Subject Headings (MeSh) should be used.
- **Introduction:** The introduction should set the purpose of the study, provide a brief summary (not a review) of previous relevant studies, and state the new advances in the current investigation. The introduction should not include data or conclusions from the work being reported. A final sentence summarizing the novel finding to be presented is permissible.
- **Materials and Methods:** This section should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques only need to be referenced. Previously published methods may be briefly described following the reference.
- **Ethics:** When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, which was revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's guide, a national research council's guide, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.
- **Results:** The results section should be a concise account of the new information that was discovered, with the least personal judgment. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations but briefly describe what these data comprise.
- **Discussion:** The discussion should include the significance of the new information and relevance of the new findings in light of existing knowledge. Only unavoidable citations should be included. Citation to review articles are not encouraged in this section.
- **Acknowledgements:** This section should be short, concise, and restricted to acknowledgements that are necessary.
- **References in text: CLINICS** adopts the Vancouver format. Cite references in the text using Arabic numerals in the order of appearance, within parentheses, (1) after the previous word, with spacing as in this example: "Diabetes (2), hypertension (3,4) and alcoholism (5-9) are complex medical problems (10)." Under exceptional circumstances, authors' names may appear in text: Single author: "Einstein (11) proposed a new theory ...", Two authors: "Watson and Crick (12) reported on the structure of ...", or Three or more authors: "Smith et al. (13) described ..."
- **Reference List:** Only citations that appear in the text should be referenced. References must be restricted to directly relevant published works, papers, or abstracts. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work that is accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct textcitation. Usually the total number of references should not exceed 35. For up

to 6 authors, list all authors. For more than 6 authors, list first 6 authors followed by "et al".

- **Tables and Figures:** **Tables:** Should be constructed using the table feature in your word processor or using a spreadsheet program such as Excel. The tables should be numbered in order of appearance in the text, using Arabic numerals. Each table should have a title and an explanatory legend, if necessary. All tables must be referenced and succinctly described in the text. Under no circumstances should a table repeat data that are presented in an illustration. Statistical measures of variation (i.e., standard deviation or standard error) should be identified, and decimal places in tabular data should be restricted to those with mathematical and statistical significance. **Figures:** Photographs, illustrations, charts, drawings, line graphs, etc. are all defined as figures. Number figures consecutively using Arabic numerals in order of appearance. Figure legend(s) should be descriptive and should allow examination of the figure without reference to text. Images must be of professional quality and uploaded as \*.tiff files. Generally, figures will be reduced to fit one column of text. The actual magnification of all photomicrographs should be provided, preferably by placing a scale bar on the print. Line graphs and charts should never be sent as \*.jpeg illustrations. We recommend preparing line graphs and charts as Excel® files and copying these files into a Word \*.doc sheet.

**REVIEW ARTICLES:** Review articles should cover themes that are relevant to medical practice. Spontaneously submitted reviews are welcome; however, potential authors should bear in mind that they are expected to have expertise in the reviewed field. The sections should be arranged as follows:

- Title page: As described in the Original Study section.
- Manuscript: Abstract, keywords and text should be arranged to cover the subject that is being reviewed. If appropriate, the method of reference collection should be described. The use of headings, subheadings, and paragraph titles is encouraged to improve clarity. Abbreviations, acknowledgments, tables and figures should be formatted as described in the Original Study section. The number of references is at the discretion of the authors. No publication fee discount is allowed for spontaneously submitted review articles that are accepted for publication.

#### **RAPID COMMUNICATIONS:**

- Title page: As described in the Original Study section.
- Manuscript: Rapid communications are limited to 1,500 words, not including the reference list, abstract and keywords. Authors should format rapid communications based on the subject at hand. Abstracts are limited to 250 words and structured into objectives, method, results, and conclusions. Citations or abbreviations (except internationally recognized abbreviations, such as weights, measures, and physical or chemical abbreviations) are not permitted. For keywords, 3-6 items from the Medical Subject Headings (MeSh) should be used.

**LETTERS TO THE EDITOR:** Letters to the editor expressing comments or dissenting opinions concerning articles that have been recently published in **CLINICS** are published at the discretion of the editor. A letter is a single section containing untitled text concerning the article under discussion, followed by references. No publication fee is charged for this class of manuscripts.

**EDITORIAL:** Editorials should cover broad aspects of medical or biological sciences. Such manuscripts are not submitted to peer review and are published at the discretion of the editor. No publication fee is charged for this class of manuscripts.

**COMMENTARY:** A commentary is an invited text with respect to an article that is being published by **CLINICS**. No publication fee is charged for this class of manuscripts.

**INVITED REVIEW:** These reviews are by invitation only and follow the format proposed for general reviews. No publication fee is charged for this class of manuscripts.

**SPECIAL ISSUE ARTICLE:** Special issue articles are by invitation only and follow a specific format that is set by the editor in charge of the collection.

**Currently CLINICS does not accept: case reports, technical notes, retrospective studies, translations and validations of questionnaires, and articles referring to first demonstration in Brazil.**