



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

DANIEL JOSÉ PIMENTEL BONFIM

**DANO HEPÁTICO, RENAL E PANCREÁTICO ASSOCIADO À EXPOSIÇÃO
CRÔNICA VIA INALATÓRIA E VIA ORAL AO ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO
(2,4-D)**

Presidente Prudente SP
2019

DANIEL JOSÉ PIMENTEL BONFIM

**DANO HEPÁTICO, RENAL E PANCREÁTICO ASSOCIADO À EXPOSIÇÃO
CRÔNICA VIA INALATÓRIA E VIA ORAL AO ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO
(2,4-D)**

Tese apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor – Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal – Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Gisele Alborghetti Nai

636.089
B713d

Bonfim, Daniel José Pimentel.
Dano hepático, renal e pancreático associado à
exposição crônica via inalatória e via oral ao ácido
diclorofenóxiacético (2,4-D) / Daniel José Pimentel
Bonfim. – Presidente Prudente, 2019.
63 f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)
- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientador: Gisele Alborghetti Nai.

1. Agroquímico. 2. Exposição Ocupacional. 3.
Exposição Dietética. 4. Estado Pré-diabético. 5. Modelos
Animais. I. Título.

Catálogo na fonte: Karla Barbosa – CRB 8/37050

DANIEL JOSÉ PIMENTEL BONFIM

**DANO HEPÁTICO, RENAL E PANCREÁTICO ASSOCIADO À EXPOSIÇÃO
CRÔNICA VIA INALATÓRIA E VIA ORAL AO ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO
(2,4-D)**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 04 de novembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE
Presidente Prudente-SP

Prof.^a Dr.^a Karina Maria Basso de Oliveira
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL
Londrina - PR

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho
Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - FCT/UNESP
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Fernando Antonio Pino Anjolette
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

A Deus pela oportunidade recebida.

A toda minha família pelo grande incentivo, por prestar todo o apoio e me oferecer todo alicerce necessário para que alcançasse mais um degrau rumo ao saber e ao conhecimento.

A todos os meus amigos conquistados ao longo dessa jornada que espero sejam para toda a vida.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a Professora Dra. Gisele Alborghetti Nai, por sempre se colocar ao meu inteiro dispor, prestando todos os esclarecimentos e orientando as dúvidas surgidas, as quais foram imprescindíveis para que reunisse condições de concluí-la.

A todos que direta ou indiretamente me auxiliaram com informações e ideias para a realização do presente trabalho.

“Há um ditado chinês que diz que:

.....se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando um pão, ao se encontrarem, eles trocam os pães; cada um vai embora com um. Porém, se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando uma ideia, ao se encontrarem, trocam as ideias; cada um vai embora com duas.

Quem sabe, é esse mesmo o sentido do nosso fazer: repartir ideias, para todos terem pão...”

Cortella

RESUMO

Dano hepático, renal e pancreático associado à exposição crônica via inalatória e via oral ao ácido diclorofenóxiacético (2,4-D)

O ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) é um dos herbicidas mais utilizados no mundo. Alguns estudos mostram alterações hepáticas e renais em animais associadas à exposição por curto período de tempo ao 2,4-D. **Objetivo:** Avaliar o possível efeito tóxico da exposição crônica por via oral e inalatória do herbicida 2,4-D para fígado, rim e pâncreas. **Material e métodos:** Utilizaram-se 80 ratos Wistar albinos, machos, adultos, divididos em oito grupos (n=10): I0: nebulização com água destilada; O0: ração nebulizada com água destilada; I3: nebulização com $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) de 2,4-D; O3: ração nebulizada com $3,71 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha de 2,4-D; I6: nebulização com $6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha; O6: ração nebulizada com $6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha de 2,4-D; I9: nebulização com $9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha de 2,4-D; O9: ração nebulizada com $9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha de 2,4-D. Os animais foram expostos durante 6 meses. Amostras de sangue foram coletadas para avaliar a função hepática e renal, e fígado, rim, baço e pâncreas para análise histopatológica. **Resultados:** Houve diferença significativa na dosagem de ALT (alanino aminotransferase) entre os grupos ($p = 0,002$). Os grupos expostos ao 2,4-D por via oral apresentaram maior incidência de esteatose e os grupos expostos a altas doses apresentaram mais inflamação hepática ($p = 0,001$). Todos os animais do grupo I9 e O9 apresentaram degeneração hidrópica tubular ($p=0,0001$). 42,4% dos animais expostos ao 2,4-D apresentaram atrofia das ilhotas de Langerhans ($p=0,006$). **Conclusão:** A simulação da exposição crônica ambiental ao herbicida 2,4-D, tanto por via oral e quanto inalatória, acarretou em alterações histopatológicas hepáticas, renais e pancreáticas.

Palavras-chave: Agroquímico. Exposição Ocupacional. Exposição Dietética. Estado Pré-Diabético. Modelos Animais.

ABSTRACT

Hepatic, renal and pancreatic damage associated with chronic exposure to oral and inhaled 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)

Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is one of the most widely used herbicides in the world. Some studies show hepatic and renal changes in animals associated with short-term exposure to 2,4-D. **Objective:** To evaluate the possible toxic effect of chronic exposure of 2,4-D herbicide to liver, kidney and pancreas. **Material and methods:** Eighty male albino Wistar rats were divided into eight groups (n = 10): I0: nebulization with distilled water; O0: nebulized feed with distilled water; I3: nebulization with 3.71×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.a.i. / ha) of 2,4-D; O3: nebulized feed with 3.71×10^{-3} g.a.i./ha of 2,4-D; I6: nebulization with 6.19×10^{-3} g.a.i./ha; O6: nebulized feed with 6.19×10^{-3} g.a.i. /ha of 2,4-D; I9: nebulization with 9.28×10^{-3} g.a.i. /ha of 2,4-D; O9: nebulized feed with 9.28×10^{-3} g.a.i. /ha of 2,4-D. The animals were exposed for 6 months. Blood samples were collected to evaluate liver and renal function, and liver, kidney, spleen and pancreas for histopathological analysis. **Results:** There was a significant difference in ALT (alanine aminotransferase) between groups ($p = 0.002$). The groups exposed to oral 2,4-D had a higher incidence of steatosis and the groups exposed to high doses had more hepatic inflammation ($p = 0.001$). All animals in group I9 and O9 presented tubular hydropic degeneration ($p = 0.0001$). 42.4% of the animals exposed to 2,4-D showed atrophy of the Langerhans islets ($p = 0.006$). **Conclusion:** The simulation of the chronic environmental exposure to the herbicide 2,4-D, by oral or inhalation route, resulted in histopathological alterations in liver, kidney and pancreas.

Key-words: Agrochemical. Occupational Exposure. Dietary Exposure. Prediabetic State. Models Animal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resultados da concentração sérica de ALT (alaninoaminotransferase) (mediana e interquartis) por grupo estudado (n=79).....	33
Figura 2 - Frequência de esteatose e inflamação hepáticas por grupo de estudo (n=79).....	34
Figura 3 - Fotomicroscopia do fígado.....	35
Figura 4 - Número de NORs contados nos hepatócitos por grupo de estudo (mediana e interquartis) (n=79).....	36
Figura 5 - Fotomicroscopia do rim.....	38
Figura 6 - Número de NORs contados nas células dos túbulos renais por grupo de estudo (mediana e interquartis) (n=79).....	39
Figura 7 - Fotomicroscopia do pâncreas.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência de inflamação intersticial e alteração tubular renal nos grupos de estudo (n=79).....	37
Tabela 2 - Incidência de atrofia das ilhotas de Langerhans nos grupos de estudo (n=79).....	40

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1	Agrotóxicos: definição e classificação.....	12
1.2	Herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4D)	13
1.3	Toxicidade do herbicida 2,4-D em diferentes organismos.....	14
1.4	Toxicidade do herbicida 2,4-D em mamíferos.....	17
2	REFERÊNCIAS	20
3	OBJETIVO	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	ARTIGO	25
	ANEXOS	48
	ANEXO A - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)	48
	ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA A QUAL O ARTIGO SERÁ SUBMETIDO	49

1 REVISÃO DA LITERATURA

Os agrotóxicos são agentes constituídos por uma grande variedade de compostos químicos ou biológicos, desenvolvidos para eliminar, combater, repelir ou controlar pragas. Estes compostos podem causar danos à saúde do homem, além de serem importantes contaminantes ambientais (BURIOLA; OLIVEIRA, 2013).

A intensificação do uso de agrotóxicos nas últimas décadas e os efeitos danosos desses agentes químicos no homem e no ambiente fez com que vários países regulamentassem seu uso e sua produção, com o objetivo de minimizar as consequências danosas nos ecossistemas. Para tanto, cada país instituiu comissões ou comitês multidisciplinares e organizações com características administrativas legais para avaliar o nível de periculosidade e os riscos que esses produtos impõem ao homem e ao ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Acredita-se que os maiores impactos no ambiente e, na saúde humana decorrem principalmente de contaminações, poluições e intoxicações pelo uso abusivo de agrotóxicos (THEOPHILO *et al.*, 2014).

Os clorofenoxiácidos constituem importante classe de herbicidas, apresentando normalmente um longo tempo de atividade residual em solos e águas, persistindo por vários meses devido à sua baixa atividade microbiológica (SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 1994), sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) um membro desta classe; tal composto é altamente seletivo, sistêmico e pré ou pós-emergente (TOMLIN, 1994).

1.1 Agrotóxicos: definição e classificação

A Lei Federal n.º 7.802 de 11/07/89, regulamentada através do Decreto 98.816, no seu Artigo 2º, Inciso I, define o termo “agrotóxicos” da seguinte maneira:

Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (BRASIL, 1989).

Os agrotóxicos podem ser classificados em classes, que são: Inseticidas (organofosforados, carbamatos, organoclorados e piretróides), fungicidas (etileno-bis-ditiocarbamatos, trifenil estânico, captan, hexaclorobenzeno), herbicidas (paraquat, glifosato, pentaclorofenol, derivados do ácido fenoxiacético e dinitrofenóis), raticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas e fumigantes (TRAPÉ, 1993).

Os agrotóxicos são classificados, também, segundo sua toxicidade em extremamente tóxicos, altamente tóxicos, medianamente tóxicos, pouco tóxicos e muito pouco tóxicos (TRAPÉ, 1993).

1.2 Herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4D)

Os altos índices de produção agrícola alcançados pelo Brasil demandam o uso intenso de agrotóxicos, de variadas composições químicas. Com constante abertura de novas fronteiras, a agricultura intensiva praticada no país vem batendo recordes de produção que, paralelamente, refletem num crescente volume de agrotóxicos comercializados em território brasileiro. Segundo estatísticas, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo e o grupo dos herbicidas é o mais comercializado mundialmente. No Brasil, 127 mil toneladas desse grupo foram comercializadas em 2009, sendo os ingredientes ativos glifosato e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) os mais comercializados oficialmente (MACEDO NETO FROEHNER; MACHADO, 2012).

Primeiro herbicida seletivo desenvolvido ainda nos anos 1940, o ácido diclorofenoxiacético, 2,4-D ($C_8H_6Cl_2O_3$) é largamente utilizado para aplicação na pré ou pós-emergência de plantas infestantes em cultivos de trigo, soja, milho, arroz, cana-de-açúcar e pastagens (MACEDO NETO FROEHNER; MACHADO, 2012). A dose letal (DL50) oral do 2,4-D é de 370 mg/kg (em coelhos) e por via dérmica é de 1400 mg/kg (em camundongos) (VIEIRA *et al.*, 1999).

Os herbicidas ácidos são uma importante classe de agrotóxicos, dos quais se destaca o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), por sua ampla utilização em todo o mundo. Este composto tem sido usado no controle de uma variedade de ervas daninhas, em culturas de cereais, cana-de-açúcar, pomares e em controle florestal. Não é recente a larga aplicação do 2,4-D, pertencente à classe dos ácidos fenoxiacéticos. Desde a guerra do Vietnã, quando foi usado pela força aérea norte-

americana como agente desfolhante, junto com o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) e o pentaclorofenol (PCF), formando o “agente laranja”, o 2,4-D vem substituindo a capina manual e mecânica, diminuindo a mão de obra e resultando no aumento da produtividade agrícola (AMARANTE JÚNIOR, SANTOS; NUNES, 1999; McBRIDE *et al.*, 2013).

A atividade herbicida do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é mediada por uma auxina com capacidade de alterar a síntese proteica normal e a divisão celular, meristemas de folhas e de plantas (STEVENS; BRECKENRIDGE, 2001).

1.3 Toxicidade do herbicida 2,4-D em diferentes organismos

Os agrotóxicos podem ser utilizados como um bom modelo para o estudo da ecotoxicologia, pois contaminam atmosfera, água e terra, são persistentes no meio ambiente, entram nas cadeias ecológicas e provocam efeitos tóxicos adversos que atingem desde uma bactéria até o homem. A avaliação do impacto do uso de agrotóxicos sobre organismos não alvos é feita por diferentes testes. São considerados organismos representativos para estes diferentes testes, pequenos mamíferos e pássaros, microrganismos de solo, insetos polinizadores (abelhas e vespas) e organismos aquáticos (peixes, zooplâncton, fitoplâncton e microcrustáceos) (GRISOLIA, 2005).

Para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade, bioensaios com plantas têm sido considerados em vários casos mais apropriados, principalmente quanto à abordagem ética. Desta forma, muitos vegetais superiores são frequentemente, utilizados para o monitoramento de poluentes ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009; FONTANETTI, SOUZA; CHRISTOFOLETTI, 2011).

O uso de herbicidas nos campos agrícolas acarreta problemas de saúde devido à persistência ambiental e um aumento na concentração dos agrotóxicos durante a passagem através da cadeia alimentar. O alimento é a principal via para a exposição da população humana a estes produtos químicos e, alguns tipos de peixe e marisco têm sido reconhecidos como principais vetores para a transferência destes contaminantes para os seres humanos (ATEEQ *et al.*, 2002).

O 2,4-D pode causar diversas alterações metabólicas e necrose tecidual em organismos não alvos, incluindo membros importantes da cadeia alimentar (GALLAGHER; DI GIULIO, 1991). O 2,4-D é rapidamente absorvido através do trato

gastrointestinal após exposição oral, os resíduos deste agroquímico podem ser observados em níveis plasmáticos 10 minutos a 24 horas após a exposição, dependendo da dose e da forma química do 2,4-D (KNOPP; SCHILLER, 1992).

A absorção do 2,4-D éster é relatada como mais lenta que as formas de sal e ácido, porém, a taxa de excreção das diferentes formas químicas é similar (KNOPP; SCHILLER, 1992).

Em testes de laboratório utilizando *Eisenia foetida* (Annelidae), o 2,4-D demonstrou efeitos graves sobre o desenvolvimento e a reprodução. Os efeitos tóxicos observados após exposição dos animais em solos contaminados com 2,4-D foram muito mais severos do que os observados na exposição ao herbicida glifosato, na mesma concentração (CORREIA; MOREIRA, 2010).

Hoy (1985) realizou experimentos expondo espécimes de *Scytonotus simplex* (milípede) expostos a três diferentes doses de 2,4-D, aplicados de três maneiras ao solo (aplicado uniformemente no substrato, aplicado em metade do substrato e adicionado à metade do alimento fornecido) e a grupo controle. Durante o experimento, foi observado que até o 10º dia de experimento, não houve mortalidade no grupo controle e que nos demais grupos, a mortalidade começou nos dois primeiros dias de experimento e aumentou progressivamente durante os primeiros 10 dias. Comparações entre os três métodos de administração de 2,4-D sugerem que esta espécie de milípedes evita superfícies tratadas com 2,4-D. Este trabalho sugere que a distribuição espacial dos resíduos de 2,4-D no campo pode influenciar o efeito do herbicida neste grupo animal. Uma distribuição uniforme, contaminando uma grande porção de terra parece ser mais prejudicial do que uma distribuição irregular.

Resultados obtidos em pesquisas indicam que o 2,4-D afeta o cérebro e a atividade da enzima acetilcolinesterase dos músculos e alguns parâmetros metabólicos do sangue e tecidos de *Leporinus obtusidens* (Piau Verdadeiro), provavelmente devido ao estresse gerado pela toxicidade do herbicida (CATTANEO *et al.*, 2008).

Sarikaya e Yilmaz (2003) também descreveram o herbicida 2,4-D como sendo altamente tóxico para os peixes, tendo efeitos muito nocivos para os seres humanos e animais, uma vez que, se acumula nos tecidos e provoca envenenamento agudo (WHO, 1984).

Ateeq *et al.* (2002), utilizando análises histopatológicas das gônadas e o tecido hepático de peixes da espécie *Clarias batrachus* para análise da fragmentação do DNA confirmaram o efeito genotóxico do 2,4-D. Nas análises histopatológicas dos ovários, este herbicida induziu a apoptose, confirmada pela presença de ovócitos atrésicos, cariólise, hipertrofia e vacuolização, além de deformidades mitocondriais, citoplasma eletrondenso, dano da membrana plasmática, vacuolização e heterocromatinização. Nos testículos, os túbulos eram relativamente menores em tamanho e continham principalmente espermátides. Algumas células nos túbulos seminíferos mostraram necrose caracterizada por dissolução do núcleo e da membrana nuclear. Células de Leydig apresentaram hipertrofia, que pode ser uma resposta ao aumento da demanda funcional.

Cattaneo *et al.* (2008) relataram que durante o período de exposição ao herbicida 2,4-D, os peixes da espécie *Rhamdia quelen* apresentaram algumas alterações de comportamento como letargia e natação errática. A análise histopatológica do fígado apresentou alterações, após o período de exposição, como arranjo anormal dos cordões hepáticos, ruptura da membrana celular e vacuolização dos hepatócitos.

Em estudos com bulbos de cebola e 2,4 D, foi observado que a concentração de 45 μM reduziu a atividade mitótica, que foi três vezes menor que o controle, já a concentração de 450 μM estimulou a divisão celular e aumentou o número de aberrações cromossômicas. O tipo mais frequente de alteração foram os micronúcleos, detectados nas duas concentrações (PAVLICA; PAPES; NAGY, 1991). Outro estudo, também com bulbos de cebola submetidos a soluções de diversas concentrações de 2,4-D apresentaram, nas doses 25-100 ppm, alterações marcantes tanto sobre o crescimento geral como na forma das células, além de um índice mitótico próximo de zero (ATEEQ *et al.*, 2002).

Estudos que avaliaram a genotoxicidade do 2,4-D em plantas transgênicas (*Arabidopsis thaliana*) demonstraram que o aumento da concentração do herbicida de 0-3 e 0-30 $\mu\text{g/l}$ levou ao aumento da frequência de recombinações A \rightarrow G quando comparadas com o grupo controle. O aumento para 100 e 300 $\mu\text{g/l}$ na concentração de 2,4-D no meio levou à diminuição na frequência de recombinação. Assim, de uma forma geral, o 2,4-D teve forte efeito sobre a recombinação nas menores concentrações testadas, no entanto, esta tendência não foi observada nas concentrações mais elevadas (FILKOWSKI *et al.*, 2003).

Em estudo sobre os efeitos citogenéticos do 2,4-D em solução de 50% em água (1-2 L/ha) em *Hordeum vulgare* (cevada), observou-se que a dose mínima produziu um aumento de quase duas vezes na ocorrência de aberrações citogenéticas. Mesmo sendo este aumento significativo, esta ocorrência não se mostrou dose dependente, pois mesmo com a duplicação na dose do herbicida, a frequência de células aberrantes pouco mudou (GERAS'KIN *et al.*, 2005).

Em estudos com trigo, o 2,4-D reduziu o índice mitótico, sendo este parâmetro dose dependente. Na variedade HUW 468 foi observada a maior frequência de células anormais na concentração de 1200 ppm do herbicida. A indução de anormalidades cromossômicas também se mostrou dose dependente em todos os tratamentos. As aberrações cromossômicas mais comuns encontradas foram aderência e pontes, mas também foi observada multipolaridade, além de atraso cromossômico em resposta à dose máxima de herbicida em todas as variedades (KUMAR *et al.*, 2010).

Resultados do estudo que avaliou a genotoxicidade do 2,4-D em mudas de feijão, usando os “ensaios cometa” e RAPD (Amplificação Randômica do DNA Polimórfico) indicaram que a GTS (Estabilidade do Modelo Genômico) e o crescimento das raízes foram reduzidos nos tratamentos em relação ao controle negativo. O aumento da proteína solúvel total foi observado nas mudas expostas ao 2,4-D, enquanto que foi reduzida quando exposta ao controle positivo. Foram observados também que os valores de danos ao DNA, no “ensaio do cometa”, foram substancialmente mais elevados do que os controles negativos, em todos os grupos de tratamento. Os padrões de RAPD também apresentaram diferenças significativas entre o controle negativo e as mudas tratadas, como desaparecimento de uma banda normal e/ou aparecimento de uma banda adicional. Em resumo, o número de bandas aumentou com o aumento da concentração do herbicida, mostrando assim um efeito dose-dependente (CENKCI *et al.*, 2010).

1.4 Toxicidade do herbicida 2,4-D em mamíferos

O 2,4-D pode ser absorvido, ou seja, penetrar nos organismos através da respiração (via inalatória), da pele (via dérmica), da ingestão de água ou de alimentos contaminados, incluindo o leite materno (via oral), ou por via transplacentária. Além disso, as pessoas podem ser expostas ao 2,4-D em

diferentes momentos da vida, como intra-útero, lactação, infância, adolescência, fase adulta e senescência (FRIEDRICH, 2014). A exposição de seres humanos e animais ocorre por meio de ar, água potável, solo e gênero alimentício ou durante a produção do herbicida. O 2,4-D pode produzir uma város efeitos adversos sobre a saúde, tais como embriotoxicidade, teratogenicidade e neurotoxicidade de animais e seres humanos, devido à geração de radicais livres (VENKOV *et al.*, 2000; BARNEKOW *et al.*, 2000; MADRIGAL-BUJAJIDAR, HERNANDEZ-CERUELO; CHAMORRO, 2001).

A ingestão, respiração ou contato dérmico com agrotóxicos da classe dos ácidos fenoxiacéticos, como o 2,4-D, pode causar diversos efeitos a saúde, tais como perda de apetite, enjoo, vômito e câncer (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

A literatura sobre o herbicida 2,4-D após 2001 é ampla e mostra estudos avaliando câncer, genotoxicidade, toxicidade reprodutiva e neurotoxicidade (BURNS *et al.*, 2011; FRIEDRICH, 2014).

Em um estudo que utilizou ratos para verificar a toxicidade do 2,4-D, os animais intoxicados, pelo método de gavagem, apresentaram alterações acentuadas no tecido hepático. Após quatro semanas de tratamento, os animais submetidos a 15 mg/kg de 2,4-D, apresentaram os cordões de hepatócitos rompidos. Observaram, também, necrose focal, vacuolização de hepatócitos e vasodilatação. Estas alterações foram mais acentuadas após a exposição com uma dose de 75 mg/kg. A área de necrose foi mais frequente nesta concentração, além de observarem o aumento da carga de glicogênio. O tratamento de 150 mg/kg de 2,4-D apresentou outras alterações histopatológicas como núcleos picnóticos, congestão dos hepatócitos, aumento significativo das células apoptóticas, vacuolização de alguns hepatócitos e perda da forma poliédrica habitual. Os cordões de hepatócitos também estavam interrompidos em muitas áreas, concluindo que o 2,4-D provoca hepatotoxicidade subaguda (TAYEB *et al.*, 2010).

A exposição intencional não ocupacional ao ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) resultou em hepatite aguda (LADOU; HARRISON, 2016). A Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (Adapar) desenvolveu uma lista de restrições de uso do agrotóxico citado, afirmando que a exposição crônica a esse agente pode levar a hepatotoxicidade e cirrose (ADAPAR, 2016). A Agência citada relatou elevações nas enzimas lactato desidrogenase, AST (aspartato aminotransferase) e

ALT (alanino aminotransferase), após exposição aguda ao agente (BRASIL, 2016), mostrando dano hepático associado a exposição aguda a este agente.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária sugere que, embora existam poucos estudos de toxicidade que avaliem o potencial nefrotóxico de uma substância, o Forato (2,4-D, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, alacloro, atrazina, cianazina, dicamba, glifosato, pendimetalina, trifluralina) provocou alguns efeitos em animais de laboratório (ANVISA, 2014). O Tordon, herbicida que contém em sua composição o 2,4-D, foi considerado extremamente tóxico levando à nefrotoxicidade em humanos, com potencial de periculosidade ambiental III, com restrições para o seu uso, conforme lista de agrotóxicos do Estado do Paraná (CLASSIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE PERICULOSIDADE AMBIENTAL DE AGROTÓXICOS - CPPAA, 2016).

A fim de investigar os efeitos do 2,4-D sobre a morfologia e função testicular, cabras anãs foram submetidas a três diferentes tratamentos com o herbicida. Os resultados encontrados apresentam alterações do túbulo seminífero, tais como hiperemia e edema do estroma, e a membrana basal separada da fibromuscular circundante. Foi observada uma redução no número de células de Sertoli, sendo que as alterações vasculares do estroma intertubular foram presentes em todos os grupos tratados, caracterizando uma perda na efetividade da reprodução do animal. Sendo assim, a exposição ao ácido 2,4-D afetou negativamente os níveis de esperma dos indivíduos, podendo implicar numa possível disfunção espermática para os seres humanos e outras espécies que podem sofrer exposição a esta substância tóxica ambiental quando aplicado em terrenos agrícolas (OBIDIKE *et al.*, 2012).

Alguns estudos anteriores indicaram que o sistema nervoso central é um órgão-alvo para os efeitos tóxicos do ácido diclorofenoxiacético em diferentes espécies animais (BRUSCO *et al.*, 1997).

Muitos estudos do tipo caso-controle tem descrito relação de linfoma e leucemia com a exposição a herbicidas da classe fenoxi, e alguns conseguiram estimar o risco relativo para a relação entre exposição ocupacional ao 2,4-D e Linfomas não Hodgkin (LNH) (IARC, 2015).

O 2,4-D é um dos herbicidas mais utilizados no Brasil e mundo. Porém, ainda existem evidências inadequadas ou insuficientes para determinar a associação entre a exposição ao 2,4-D e alterações em diversos órgãos e sistemas.

2 REFERÊNCIAS

ADAPAR. **Restrições ao uso do 2,4D, constantes na lista de agrotóxicos do Paraná.** 2016. Disponível em:

<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/24damina806ge nbra.pdf>. Acesso em 02 out. 2018.

AMARANTE JÚNIOR, 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). **Quim. Nova**, v. 26, n. 2, p. 223-229, 2003.

ANVISA. **Monografia 2,4-D.** 2014. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bdea3b804745780e857bd53fbc4c6735/D27++24-D.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 out. 2018.

ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, W.; WASSEM AHMAD. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, v. 518, p. 135-144, 2002.

BARNEKOW, D. E.; HAMBURG, A. W.; PUVANESARAJAH, V.; GUO, M.

Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in laying hens and lactating goats. **J Agric Food Chem**, v. 49, n. 1, p. 156-163, 2000.

BRASIL. Congresso Nacional. **Lei n.º 7.802, de 11 de julho de 1989.** Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF, 11 de julho de 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm. Acesso em: 22 jul. 2019.

BRUSCO, A. P.; SAAVEDRA J.; GARCIA, G.; TAGLIFERRO, P.; DUFFARD, A. M.; DUFFARD, R. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid through lactation induces astroghos sm rat brain. **Mol Chem Neuropathol**, v. 30, p. 175-18, 1997.

BURIOLA, A. A.; OLIVEIRA, M. L. F. Famílias de agricultores convivendo com praguicidas clandestinos no estado do Paraná – Brasil. **Ciencia y Enfermerla**, v. 19, n. 1, p. 37-47, 2013.

BURNS, C.; BODNER, K.; SWAEN, G.; COLLINS, J.; BEARD, K.; LEE, M. Cancer incidence of 2,4-D production workers. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 8, p. 3579-3590, 2011.

CATTANEO, R.; LORO, V. L.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, F. A.; LUZ, L.; MIRON, D. S.; FONSECA, M. B.; MORAES, B. S.; CLASEN, B. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of

2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, p. 133-137, 2008.

CENKCI, S.; YILDIZ, M.; CIGERCI, I. H.; BOZDAG, A.; TERZI, H.; TERZI, E. S. A. Evaluation of 2,4-D and dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1558-1564, 2010.

CLASSIFICAÇÃO do Potencial de Periculosidade Ambiental de Agrotóxicos - CPPAA. 2016. Disponível em: <http://docplayer.com.br/10782904-Classificacao-toxicologica-i-extremamente-toxico-classificacao-do-potencial-de-periculosidade-ambiental-iii-produto-perigoso-ao-meio-ambiente.html>. Acesso em: 30 out. 2018.

CORREIA, F. V.; MOREIRA, J. C. Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, p. 264-268, 2010.

FILKOWSKI, J.; BESPLUG, J.; BURKE, P.; KOVALCHUK, I.; KOVALCHUK, O. Genotoxicity of 2,4-D and dicamba revealed by transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring recombination and point mutation markers. **Mutation Research**, v. 542, p. 23-32, 2003.

FONTANETTI, C. S.; SOUZA, T. S.; CHRISTOFOLETTI, C. A. The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. In: BILIBIO, C.; HENSEL, O.; SELBACH, J. (org.). **Sustainable water management in the tropics and subtropics** - and cases study in Brazil. Brasil/Alemanha: UNIPAMPA/UNIKASSEL, v. 3, p. 975-1005, 2012.

FRIEDRICH, K. Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2,4-D. **Parecer técnico**. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. 45p. 2014. Disponível em: <file:///D:/Downloads/parecer%20herbicida%2024-D%20Karen%20Friedrich.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2018.

GALLAGHER, E.; DI GIULIO, R. Effects of 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid and picloran on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Toxicology Letters**, v. 57, p. 65-72, 1991.

GERAS'KIN, S. A.; OUDALOVA, A. A.; KIM, J. K.; DIKAREV, V. G.; DIKAREVA, N. S. Cytogenetic effect of low dose gamma-radiation in *Hordeum vulgare* seedlings: non-linear dose-effect relationship. **Radiat Environ Biophys**, v. 46, n. 1, p. 31-41, mar. 2007.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: mutação, câncer e reprodução**. Brasília: Universidade de Brasília, 2005. 392 p.

IARC. **DDT, Lindane, and 2,4-D**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 113. 2015. IARC, Lyon. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol113/index.php>. Acesso em: 14 jan. 2019.

KNOPP, D.; SCHILLER, F. Oral and dermal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid sodium and dimethylamine salts to male rats: Investigations on absorption and excretion as well as induction of hepatic mixed-function oxidase activities. **Archives of Toxicology**, v. 66, p. 170-174, 1992.

KUMAR, S.; ARYA, S. K.; ROY, B. K.; SINGH, A. K. The effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and isoproturon herbicides on the mitotic activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) root tips. **Tsitologija I Genetika**, p. 14-21, 2010.

LADOU, J.; HARRISON, R. J. (Org.). **Current**. Medicina ocupacional e ambiental: diagnóstico e tratamento. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p.71-81, 2009.

MACEDO NETO, D.; FROEHNER, S.; MACHADO, K. S. Avaliação do transporte do ácido 2,4 diclorofenoxiacético através de um lisímetro. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S010040422012000900020> Acesso em: 25 nov. 2018.

MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; HERNANDEZ-CERUELO, S. A.; CHAMORRO, G. Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed in vivo. **Food Chem Toxicol**, v. 39, n. 9, p. 941-946, 2001.

McBRIDE, D.; COX, B.; BROUGHTON, J.; TONG, D. The mortality and cancer experience of New Zealand Vietnam war veterans: a cohort study. **BMJ Open**, v. 3, p. e003379, 2013. doi:10.1136/bmjopen-2013-0033792013.

OBIDIKE, I. R.; AKA, L. O.; OMOJA, V. U.; SHOYINKA, S. V.O.; KAMALU, T.; NANIKA, S. M. Testicular morphology and antispermatogenic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in male West African Dwarf (WAD) goats. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, p. 1457-1462, 2012.

PAVLICA, M.; PAPES, D.; NAGY, B. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 263, p. 77-81, 1991.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-58, 2009.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; GARCIA-VALCARCEL, A. I.; TADEO, J. L. Determination of residues of phenoxy acid herbicides in soil and cereals by gas chromatography-ion trap detection. **Journal of Chromatography A**, v. 675, p. 213- 218, 1994.

STEVENS, J. T.; BRECKENRIDGE, C. B. Crop protection chemicals. In: HAYES, W. A. (ed.). **Principles and methods of toxicology**. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001. p. 565-648.

TAYEB, W.; NAKBI, A.; TRABELSI, M.; ATTIA, N.; MILED, A.; HAMMAMI, M. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide "Désormone lourde". **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, p. 225-233, 2010.

THEOPHILO, C. F.; POLI, M. F. P.; CUERVO, M. R. M.; MILANEZ, J. F.; MELGAREJO, L.; PIZZATO, A. C. Agrotóxicos permitidos no cultivo das frutas e verduras mais consumidas pela população brasileira e algumas de suas implicações na saúde. **Revista eletrônica PUCRS**, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2014.

TOMLIN, C. (ed.). **The pesticide manual: incorporating the agrochemicals handbook**. 10th ed. Cambridge: British Crop Protection Council, the Royal Society of Chemistry, 1994. p. 1341.

TRAPÉ, A. Z. O caso dos agrotóxicos. In: ROCHA, L. E.; RIGOTTO, R. M.; BUSCHINELLI, J. T. P. (org.). **Isto é trabalho de gente? Vida, doença e trabalho no Brasil**. São Paulo: Vozes, 1993. p. 569-593.

VENKOV, P.; TOPASHKA-ANCHEVA, M.; GEORGIEVA, M.; ALEXIEVA, V.; KARANOV, E. Genotoxic effect of substituted phenoxyacetic acids. **Arch Toxicol.**, v. 74, p. 560-566, 2000.

VIEIRA, E. M.; PRADO, A. G. S.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4d) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. **Quím. Nova**, v. 22, n. 3, p. 305-309, 1999.

WHO. Switzerland. **Environmental Health Criteria**, v. 29, 1984.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. p. 478.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o possível dano hepático, renal, pancreático e esplênico mediante a exposição crônica por via oral e inalatória do herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) em ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) sobre os parâmetros bioquímicos séricos e morfológicos nos seguintes órgãos: fígado, rim, pâncreas e baço de ratos;
- Avaliar as diferenças entre a exposição crônica por via oral e inalatória do herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) sobre os seguintes órgãos: fígado, rim, pâncreas e baço de ratos;
- Avaliar se o herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) influencia na proliferação das células hepáticas e renais.

4 ARTIGO

DANO HEPÁTICO, RENAL E PANCREÁTICO ASSOCIADO À EXPOSIÇÃO CRÔNICA VIA INALATÓRIA E VIA ORAL AO ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D): UM MODELO DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL EM RATOS

Daniel José Pimentel Bonfim¹, Letícia Rocha Magalhães², Pedro Henrique Nahas Chagas³, Fernanda de Maria Serra⁴, Liliane Aparecida Tanus Benatti⁵, Gisele Alborghetti Nai⁶.

¹MSc, PhD student of the Graduate Program in Animal Science, professor of the Department of Pathology, University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

²Undergraduate student in Medicine, Faculty of Medicine of Presidente Prudente (FAMEPP), University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil. Scholarship holder of the Scientific Initiation Scholarship Program of the National Council for Scientific and Technological Development (PIBIC/CNPq).

³MD, Faculty of Medicine of Presidente Prudente (FAMEPP), University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

⁴MSc, PhD student of the Graduate Program in Animal Science, University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

³PhD, professor, University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

⁶PhD, MD, professor of the Department of Pathology and the Graduate Program in Animal Science, University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

Correspondence: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil. Phone: +55-18-3229-1059. Fax: +55-18-3229-1194. E-mail: patologia@unoeste.br

HIGHLIGHTS

- Este é o primeiro estudo experimental com simulação da exposição crônica ambiental ao herbicida ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) por via oral e inalatória em ratos.
- A exposição ao herbicida 2,4-D por via oral e inalatória levou ao desenvolvimento de lesões degenerativas hepáticas e renais, que mediante a persistência da exposição podem evoluir para alterações irreversíveis com perda de função destes órgãos.
- A exposição a altas doses do herbicida 2,4-D por via oral e inalatória levou a atrofia das ilhotas pancreáticas, o que pode acarretar em um estado pré-diabético.
- As alterações hepáticas foram tanto dependentes da via de exposição quanto da dose e as alterações renais e pancreáticas dependentes da dose do herbicida 2,4-D.

RESUMO

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos herbicidas mais utilizados no mundo. O objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito tóxico da exposição crônica por via oral e inalatória do herbicida 2,4-D no fígado, rim e pâncreas, mediante simulação da exposição ambiental. Utilizaram-se 80 ratos Wistar albinos, machos, adultos, divididos em oito grupos, os quais foram expostos durante 6 meses por via inalatória e oral (ração contaminada) a água destilada (grupos controles) e a três diferentes doses do 2,4-D [$3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), $6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha e $9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha]. Amostras de sangue e fígado, rim, baço e pâncreas foram coletados para análise. Houve diferença na dosagem de ALT (alanino aminotransferase) entre os grupos expostos ao 2,4-D. Os grupos expostos ao 2,4-D por via oral apresentaram maior incidência de esteatose e os grupos expostos a altas doses apresentaram mais inflamação hepática. Todos os animais dos grupos expostos a alta concentração do 2,4-D apresentaram degeneração hidrópica tubular renal. Houve atrofia das ilhotas de Langerhans nos animais expostos ao 2,4-D. A simulação da exposição crônica ambiental ao herbicida 2,4-D acarretou em alterações hepáticas que foram tanto dependentes da via de exposição quanto da dose e em alterações renais e pancreáticas que foram dependentes da dose.

Palavras-chave: agroquímico, exposição ocupacional, exposição dietética, estado pré-diabético, modelos animais.

1. Introdução

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos herbicidas mais utilizados no mundo devido à sua ampla aplicação em vários tipos de lavouras, além de florestas e em gramados e ao seu baixo custo [1]. Devido ao seu amplo uso, os seres humanos podem se expor aos produtos que contêm 2,4-D, tanto ocupacional quanto não-ocupacionalmente, por via inalatória, dérmica ou por ingestão, por contato direto ou com resíduos na água, ar, solo e comida [2].

O 2,4-D pode estar presente na água devido ao seu uso direto nesta, ou por aplicações agrícolas ou em florestas, devido à deriva de aplicação ou por deposição atmosférica [2]. A presença de 2,4-D na água pode levar a contaminação de legumes, verduras e frutas, além da contaminação de seres humanos.

Resíduos de 2,4-D podem ser encontrados em alimentos como resultado do seu uso na agricultura [3]. A Comissão Europeia determinou que a ingestão diária máxima teórica de 2,4-D para um adulto com peso corporal de 60 kg é de 1,4% da dose diária admissível baseada em um nível de efeito adverso não observado (NOAEL), segundo o *European Diet* estabelecido pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura e pela Organização Mundial da Saúde (*FAO / WHO European Diet*) [4].

Estudos experimentais com ratos e camundongos mostraram hepatotoxicidade [5-8] e alterações renais [9] mediante a exposição de curta duração ao 2,4-D. Porém, estes estudos utilizaram doses elevadas do 2,4-D e seus sais, as quais excedem muito a dose relevante da exposição humana. Além disso, as vias de exposição foram a água de beber, gavagem ou intraperitoneal, sendo que as duas últimas não refletem a exposição que ocorre ocupacional, principalmente por via inalatória, e não-ocupacionalmente, principalmente por ingestão de alimentos e água contaminados.

O presente estudo simulou a exposição ambiental de animais ao 2,4-D, com o objetivo de avaliar o possível efeito tóxico para fígado, rim e pâncreas da exposição crônica, por via oral e inalatória, a este herbicida.

2. Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (CEUA – UNOESTE) (Protocolo nº 3792).

2.1. Protocolo experimental

A exposição ao herbicida ácido diclorofenóxiacético foi feita com 2,4-D (Nortox S.A., Araçongas, Paraná, Brasil), com a seguinte composição: sal de dimetilamina de (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4D): 806g/litro (80,6% m/v), equivalente ácido de 2,4D: 670g/litro (67,0% m/v) e ingredientes inertes: 424g/litro (42,4% m/v).

As diferentes concentrações do herbicida 2,4-D foram baseadas nas diferentes concentrações que este herbicida é utilizado, conforme descrito na bula, sendo cada dose ajustada para a área da caixa, para simular a exposição ambiental (ocupacional e de alimentos). As doses utilizadas foram aquelas preconizadas para a cultura de cana de açúcar [10]. O manejo do herbicida foi realizado utilizando-se equipamentos de proteção individual indicados para tal.

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 80 ratos Wistar albinos, machos, adultos (90 dias), com peso entre 300-350 g, alocados em gaiolas plásticas grandes (medindo 54x38x41cm), a temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $50 \pm 15\%$, com ciclos de 12 horas de claro e escuro. Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos (n=10):

- I0 - grupo controle inalatório: expostos à nebulização com água destilada;
- O0 - grupo controle oral: receberam ração pulverizada com água destilada;
- I3 - grupo de baixa concentração inalatório: expostos à nebulização do pesticida com $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha);
- O3 - grupo de baixa concentração oral: receberam ração pulverizada com pesticida com $3,71 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha;
- I6 - grupo de média concentração inalatório: expostos à nebulização do pesticida com $6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha;
- O6 - grupo de média concentração oral: receberam ração pulverizada com pesticida com $6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha;
- I9 - grupo de alta concentração inalatório: expostos à nebulização do pesticida com $9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha;
- O9 - grupo de alta concentração oral: receberam ração pulverizada com pesticida com $9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha.

Para nebulização, foram utilizadas duas caixas (32x 24x 32 cm), cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star® (Soniclear Ind.

Com. Imp. e Exp. Ltda., São Paulo, Brasil). Todos os animais de cada grupo foram nebulizados simultaneamente na mesma caixa. O tempo de exposição foi de aproximadamente 15 minutos, tanto para os animais quanto para a ração (tempo necessário para nebulização de toda a solução) [10].

Os animais expostos por via inalatória foram nebulizados durante cinco dias seguidos na semana. A ração dos animais expostos por via oral foi trocada a cada dois dias, sendo que a nebulização foi realizada um dia antes de a ração ser ofertada aos animais. Foi ofertado 600g de ração por caixa e o residual foi pesado a cada troca.

Os animais foram pesados mensalmente até o final do experimento.

Todos os animais foram expostos durante 6 meses e após este período foram eutanasiados. A anestesia e eutanásia foram realizadas com Tiopental sódico (Syntec, EUA), nas doses de 40mg/Kg e 100 mg/Kg de peso, respectivamente, administrado na cavidade peritoneal. Os indicativos de morte foram a ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos [11].

2.2. Análise dos órgãos

2.2.1. Análise bioquímica sérica

Após a anestesia, foi realizada punção intracardíaca com vacutainer (BD Vacutainer[®], Becton, Dickinson and Company, EUA) nos animais para coleta de 10ml de sangue para realização dos seguintes exames laboratoriais: AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanino aminotransferase), creatinina, ureia e glicose. Toda bioquímica sérica foi realizada em aparelho automatizado (COBAS C111, Roche, EUA).

2.2.2. Análise histopatológica

Após a eutanásia foram coletados fígado, rins, baço e pâncreas. Os fragmentos retirados foram fixados em formol tamponado a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas e submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Cortes seriados de 5 μ foram obtidos através de micrótomo LEICA RM2265 (Leica Biosystems Nussoch GmbH, Alemanha) e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil).

A análise histopatológica foi cega e realizada por um único observador

experiente, utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão). Os parâmetros gerais avaliados no fígado, rim, pâncreas e baço com seus respectivos escores foram: infiltrado inflamatório intersticial e tipo de célula inflamatória presente (polimorfonucleares e/ou mononucleares); congestão tecidual; necrose tecidual; necrose vascular; lesões displásicas e presença de lesões neoplásicas benignas e malignas [12].

Também foram analisados especificamente em cada órgão, os seguintes parâmetros, descritos por Pegoraro et al [12]: no fígado: presença e tipo de esteatose, colestase, fibrose tecidual e cirrose; no rim: presença de alteração tubular; presença de lesão glomerular; presença de espessamento de membrana basal de vasos; presença de cilindros; no pâncreas: fibrose tecidual; atrofia acinar; e atrofia das ilhotas de Langerhans; e no baço: hiperplasia da polpa branca; hiperplasia da polpa vermelha; fibrose tecidual.

Para realização da contagem das NORs (regiões organizadoras de nucléolos), outros cortes desparafinizados de fígado e rim, em lâmina, foram corados por impregnação por prata segundo Ploton et al. [13]. A contagem das NORs foi realizada em 10 campos de grande aumento, 10 células por campo (hepatócitos e células tubulares renais), totalizando 100 células para cada animal [13].

2.2.3. Análise estatística

Para as variáveis quantitativas foi verificada a normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e a homogeneidade dos dados (teste de Levene) e para as variáveis que atenderam aos dois pressupostos, as médias foram comparadas com a Análise de Variância/Teste T; para as demais variáveis, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar os ranks e as comparações múltiplas com o teste de Dunn.

Para as variáveis qualitativas foi aplicado o teste do Qui-Quadrado e para as variáveis onde o pressuposto de menos de 20% dos valores esperados foi menor do que 5, foi utilizada a Razão de Verossimilhança.

Foi utilizado o pacote estatístico SPSS V. 18 e nível de significância de 5% para todos os testes.

3. Resultados

3.1. Peso dos animais e consumo de ração

Houve homogeneidade das variâncias para o peso inicial ($p = 0,411$) e final ($p = 0,113$) entre os grupos de estudo.

Não houve diferença no consumo da ração entre os grupos de estudo ($p > 0,05$).

3.2. Análise dos órgãos (análise bioquímica sérica e estudo histopatológico)

3.2.1. Fígado

Não houve diferença entre os grupos de estudo para a dosagem sérica de AST ($p=0,606$).

Para a dosagem sérica de ALT, houve diferença entre os grupos controle e os expostos ao 2,4-D ($p = 0,002$) (Figura 1).

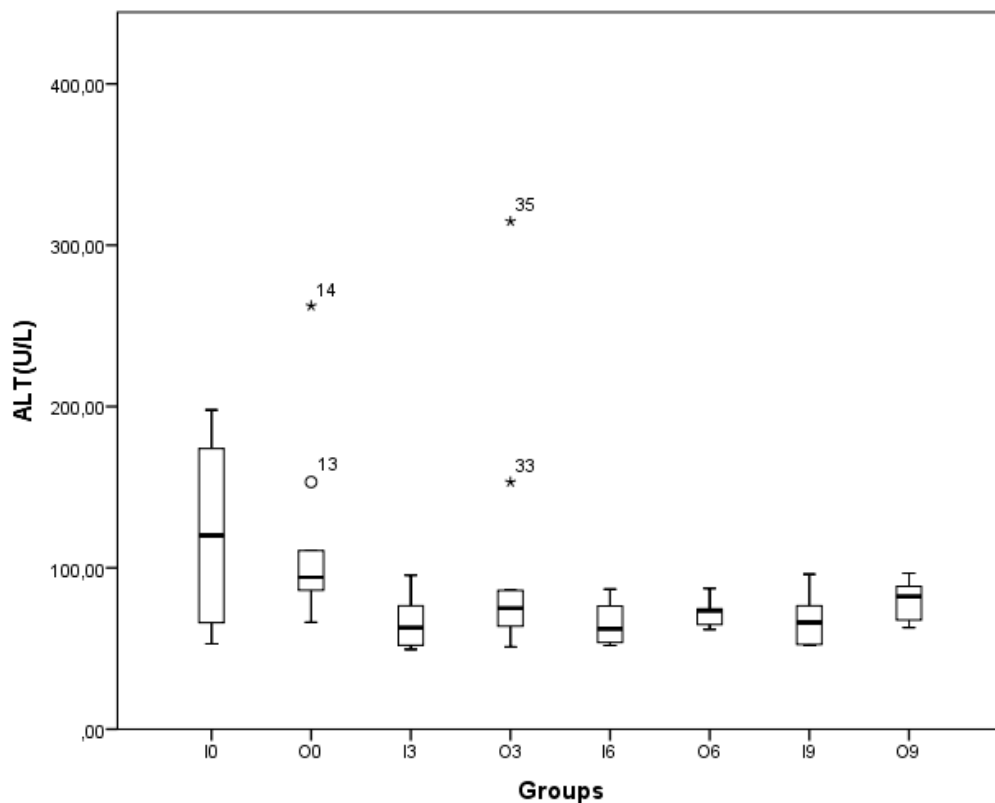


Figura 1 - Resultados da concentração sérica de ALT (alanino aminotransferase) (mediana e interquartil) por grupo estudado ($n=79$) ($p=0,002$). *,°: *outlier* e número do animal; Grupos: I0: controle inalatório; O0: controle oral; I3: baixa concentração de 2,4-D inalatório; O3: baixa concentração de 2,4-D oral; I6: média concentração de 2,4-D inalatório; O6: média concentração de 2,4-D oral; I9: alta concentração de 2,4-D inalatório; O9: alta concentração de 2,4-D oral.

Ao estudo histopatológico, não foram observadas congestão, necrose tecidual ou vascular nem colestase em nenhum dos grupos estudados. Também não foram observadas alterações displásicas ou neoplásicas no parênquima hepático.

Os grupos expostos ao herbicida 2,4-D por via oral apresentaram maior incidência de esteatose do que os animais que foram expostos por via inalatória ($p < 0,05$), porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de exposição oral em relação à dose do herbicida ($p > 0,05$) (Figura 2). A esteatose apresentada pelos animais foi do tipo microvesicular (caracterizada por microgotículas de gordura no citoplasma dos hepatócitos) e difusa em todos os casos (Figura 3).

Em relação ao processo inflamatório hepático não houve diferença entre os grupos expostos por via oral ou inalatória ($p = 0,852$). Porém, houve diferença entre os grupos ($p = 0,001$), sendo os grupos I9 e O9 aqueles com a maior porcentagem de casos (Figura 2).

A inflamação apresentada pelos animais foi de grau leve (1 a 3 focos inflamatórios no parênquima hepático) em todos os casos e as custas de linfócitos (Figura 4).

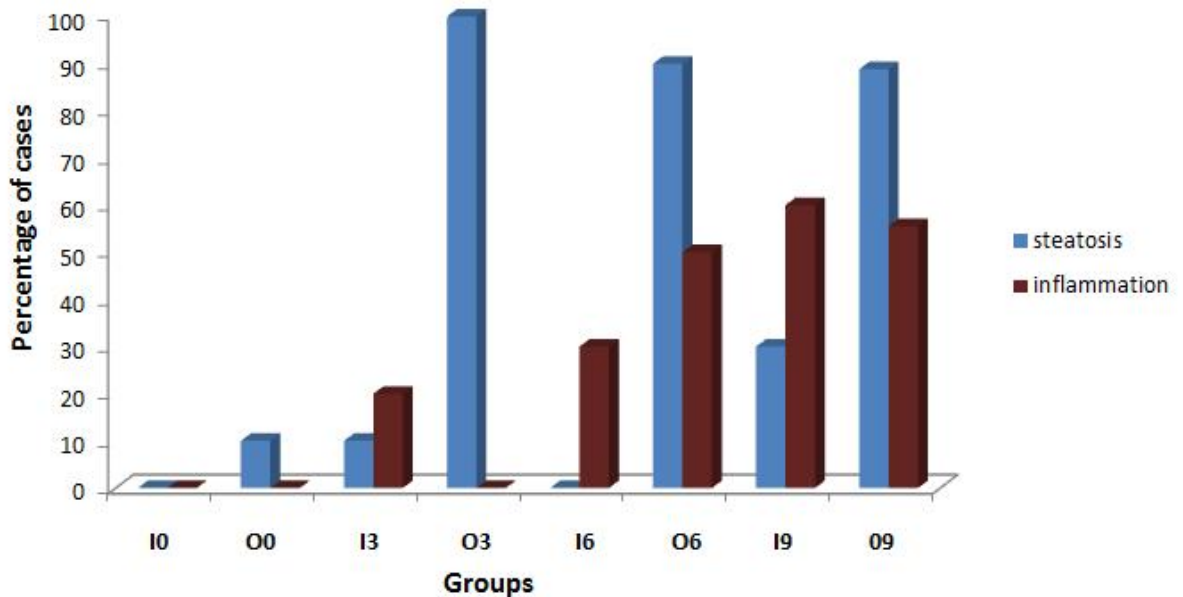


Figura 2 – Frequência de esteatose e inflamação hepáticas por grupo de estudo ($n=79$) ($p < 0,05$). Grupos: I0: controle inalatório; O0: controle oral; I3: baixa concentração de 2,4-D inalatório; O3: baixa concentração de 2,4-D oral; I6: média concentração de 2,4-D inalatório; O6: média concentração de 2,4-D oral; I9: alta concentração de 2,4-D inalatório; O9: alta concentração de 2,4-D oral.

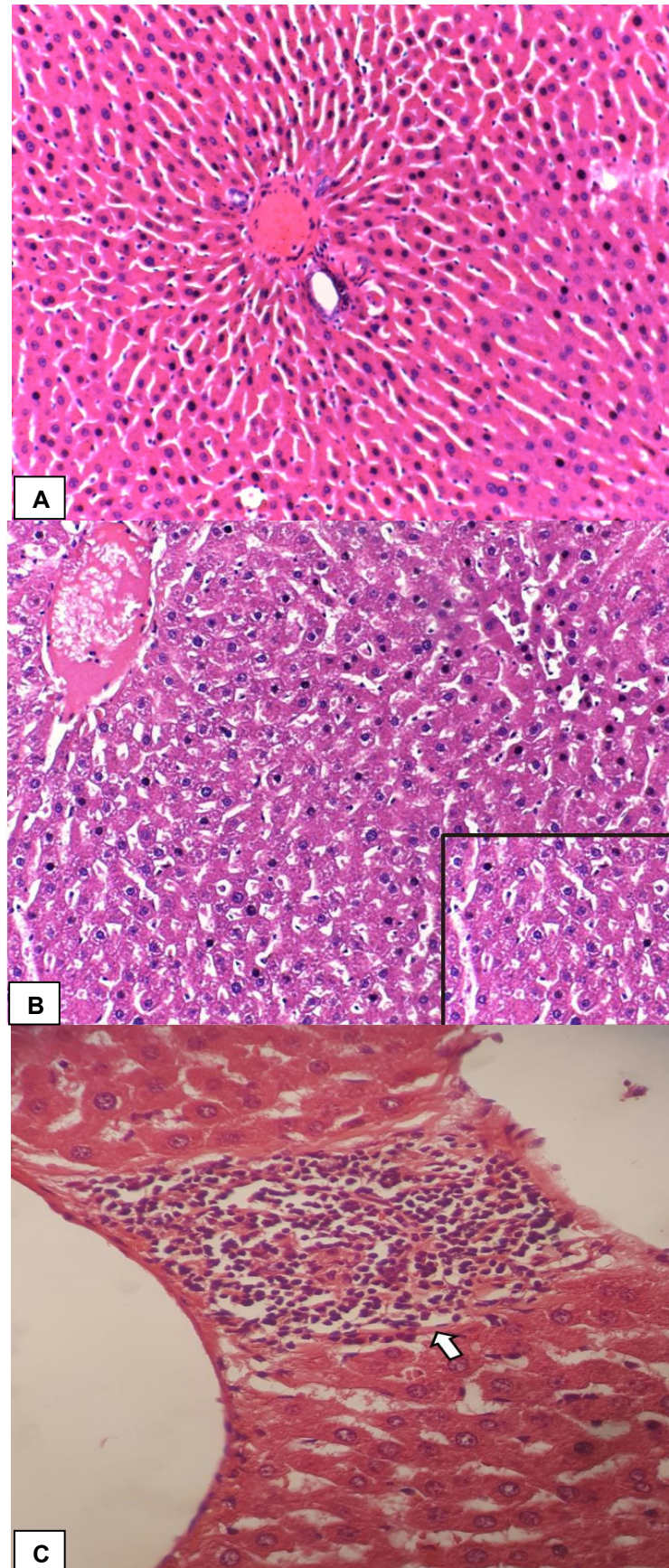


Figura 3 – Fotomicroscopia do fígado. A – Parênquima hepático normal (animal do Grupo I0). B – Esteatose do tipo microvesicular. Notar citoplasma microvacuolizado

dos hepatócitos (detalhe) (animal do Grupo O3). C - Foco de infiltrado linfocitário no parênquima hepático (seta) (animal do Grupo I3). Hematoxilina-eosina, aumento de 200x.

Em relação à contagem de NORs nos hepatócitos, houve diferença estatística entre o grupo I0 x I6 e I9, entre o grupo O0 x O6 e O9, entre o grupo I3 x I9, e entre o grupo O3 x O9 ($p < 0,05$) (Figura 4), porém não houve diferença entre o tipo de exposição (oral ou inalatória) ($p > 0,05$).

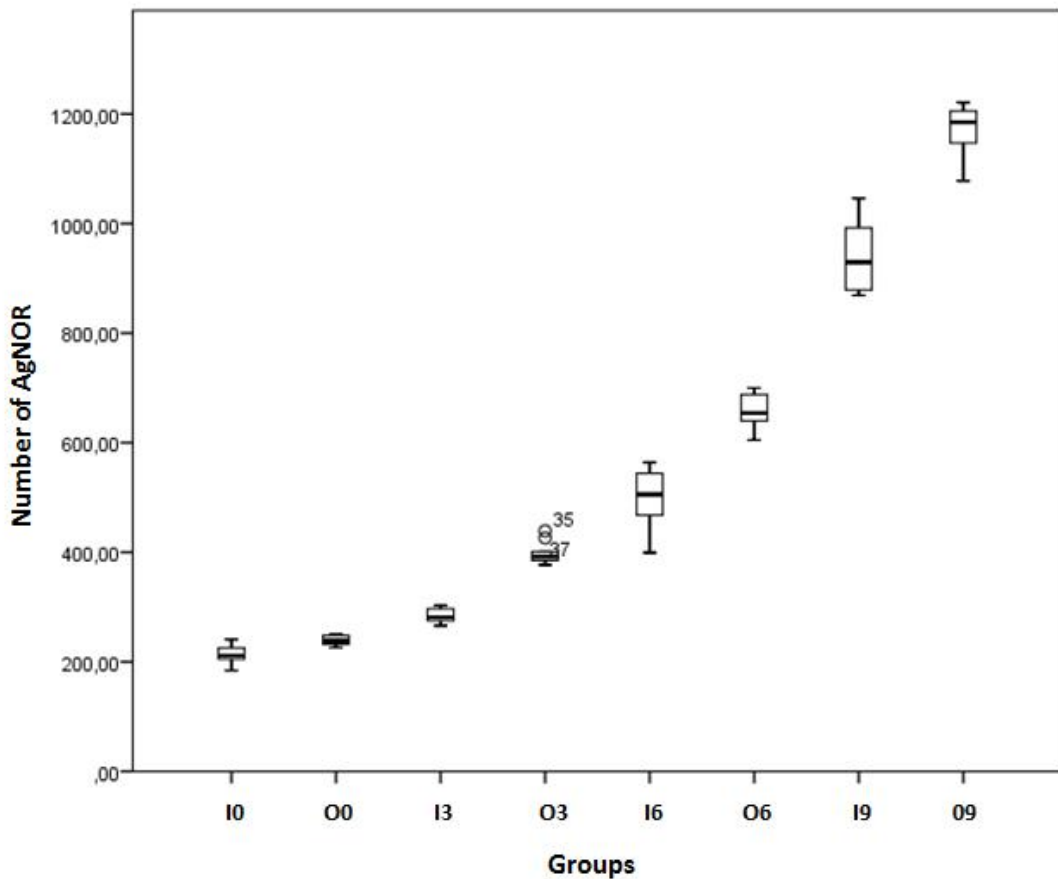


Figura 4 - Número de NORs contados nos hepatócitos por grupo de estudo (mediana e interquartis) ($n=79$) ($p < 0,05$). °: *outlier* e número do animal; Grupos: I0: controle inalatório; O0: controle oral; I3: baixa concentração de 2,4-D inalatório; O3: baixa concentração de 2,4-D oral; I6: média concentração de 2,4-D inalatório; O6: média concentração de 2,4-D oral; I9: alta concentração de 2,4-D inalatório; O9: alta concentração de 2,4-D oral.

3.2.2. Rim

Não houve diferença para as dosagens de ureia ($p=0,451$) e creatinina ($p=0,061$) entre os grupos estudados.

No exame histopatológico, não foram observadas congestão, alterações vasculares, presença de cilindros ou alterações displásicas ou neoplásicas.

Houve diferença estatística para a ocorrência de inflamação entre os grupos ($p = 0,0001$), mas não em relação ao tipo de exposição (oral e inalatória) ($p=0,305$). A inflamação apresentada pelos animais foi de grau leve em todos os casos (Tabela 1, Figura 5).

A alteração tubular foi significativa entre os grupos ($p = 0,0001$), porém para o tipo de exposição (oral ou inalatória) não foi detectada diferença ($p=0,946$). Apenas dois animais (1 do grupo O0 e 1 do grupo O3) apresentaram necrose tubular aguda. Os demais animais com alteração tubular apresentaram degeneração hidrópica (Tabela 1, Figura 5).

Tabela 1 - Incidência de inflamação intersticial e alteração tubular renal nos grupos de estudo (n=79).

Grupos	Inflamação intersticial	Alteração tubular
I0	4/10 (40%) ^b	0/10 (0%) ^a
O0	1/10 (10%) ^a	1/10 (10%) ^a
I3	3/10 (30%) ^b	0/10 (0%) ^a
O3	8/10 (80%) ^c	1/10 (10%) ^a
I6	9/10 (90%) ^c	0/10 (0%) ^a
O6	9/10 (90%) ^c	0/10 (0%) ^a
I9	3/10 (30%) ^b	10/10 (100%) ^b
O9	6/9 (66,66%) ^d	9/9 (100%) ^b

Grupos: I0: controle inalatório; O0: controle oral; I3: baixa concentração de 2,4-D inalatório; O3: baixa concentração de 2,4-D oral; I6: média concentração de 2,4-D inalatório; O6: média concentração de 2,4-D oral; I9: alta concentração de 2,4-D inalatório; O9: alta concentração de 2,4-D oral. Letras minúsculas comparam grupos no mesmo momento e na mesma coluna. Letras minúsculas diferentes: $p < 0,05$.

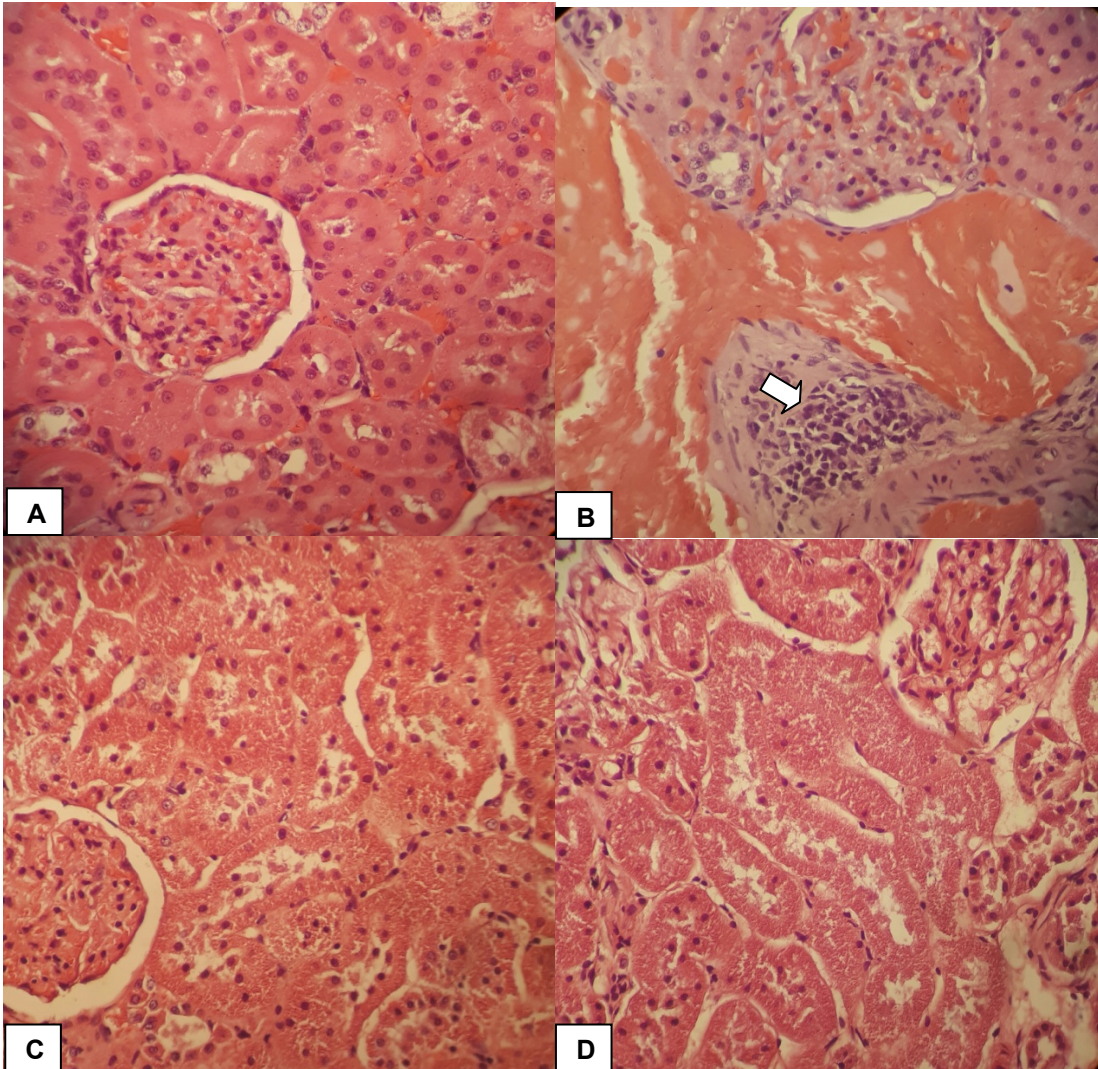


Figura 5 – Fotomicroscopia do rim: A – Parênquima renal normal (animal do Grupo I0). B – Foco inflamatório linfocitário no parênquima renal (seta) (animal do Grupo O3). C – Degeneração hidrópica tubular (animal do Grupo O9). Notar distanciamento entre os núcleos. D – Necrose tubular aguda. Notar ausência de núcleos nas células tubulares (animal do Grupo O3). Hematoxilina-eosina, aumento de 400x.

Em relação à contagem de NORs nas células dos túbulos renais, houve diferença estatística entre o grupo I0 x I6, entre O0 x O3, O6 e O9 e entre o grupo I3 x I6 ($p < 0,05$) (Figura 6), porém não houve diferença entre o tipo de exposição (oral ou inalatória) ($p = 0,593$).

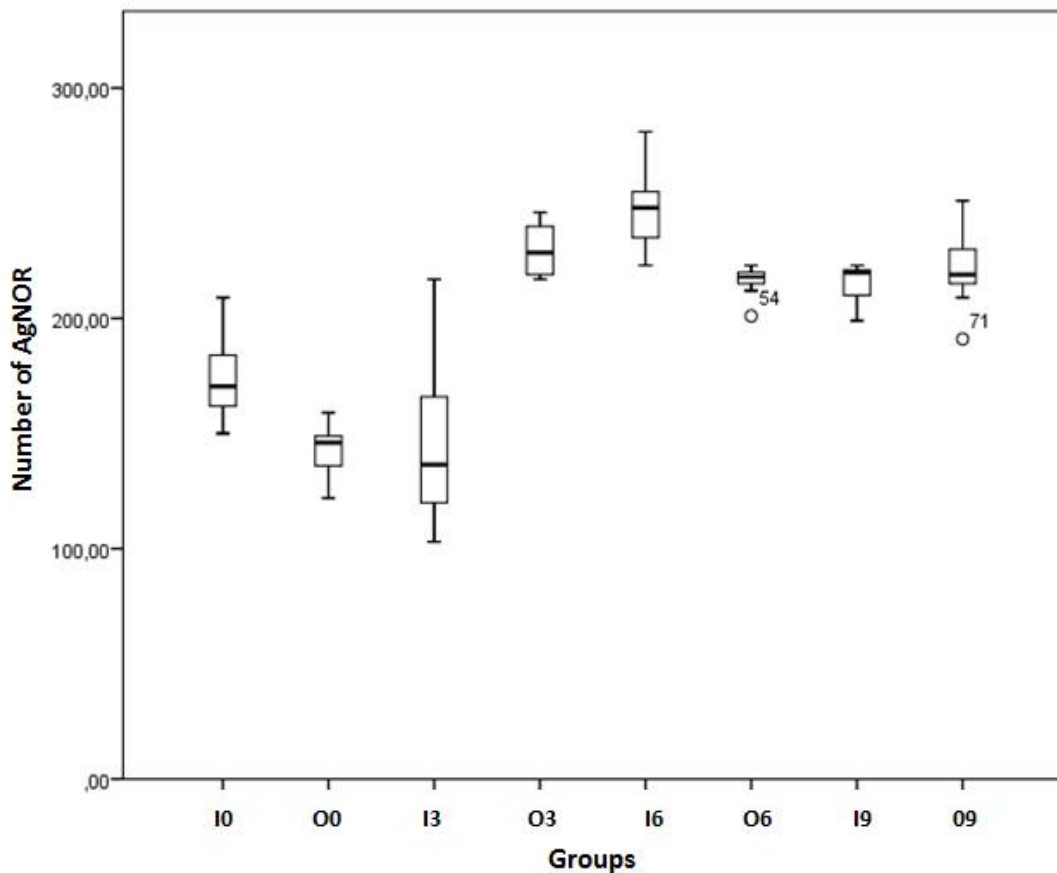


Figura 6 - Número de NORs contados nas células dos túbulos renais por grupo de estudo (mediana e interquartis) (n=79) ($p < 0,05$). °: *outlier* e número do animal; Grupos: I0: controle inalatório; O0: controle oral; I3: baixa concentração de 2,4-D inalatório; O3: baixa concentração de 2,4-D oral; I6: média concentração de 2,4-D inalatório; O6: média concentração de 2,4-D oral; I9: alta concentração de 2,4-D inalatório; O9: alta concentração de 2,4-D oral.

3.2.3. Baço

Não foram observadas alterações histopatológicas no baço em nenhum dos animais avaliados.

3.2.4. Pâncreas

A dosagem de glicose não diferiu entre nenhum dos animais estudados ($p=0,139$).

Não se observou congestão, alterações vasculares, alterações acinares, lesões displásicas ou neoplásicas. Apenas um animal do grupo I6 apresentou inflamação das ilhotas de Langerhans.

Somente os animais dos grupos expostos ao 2,4-D apresentaram atrofia das ilhotas de Langerhans (caracterizada por diminuição no número de células da ilhota) ($p=0,006$) (Tabela 2, Figura 7), mas sem diferença entre o tipo de exposição (oral ou inalatória) ($p>0,05$).

Tabela 2 - Incidência de atrofia das ilhotas de Langerhans nos grupos de estudo (n=79).

Grupos	Atrofia das ilhotas de Langerhans
I0	0/10 (0%) ^a
O0	0/10 (0%) ^a
I3	3/10 (30%) ^b
O3	5/10 (50%) ^b
I6	5/10 (50%) ^b
O6	5/10 (50%) ^b
I9	4/10 (40%) ^b
O9	3/9 (33,33%) ^b

Grupos: I0: controle inalatório; controle oral; I3: baixa concentração de 2,4-D inalatório; O0: de 2,4-D inalatório; O3: baixa concentração de 2,4-D oral; I6: média concentração de 2,4-D inalatório; O6: média concentração de 2,4-D oral; I9: alta concentração de 2,4-D inalatório; O9: alta concentração de 2,4-D oral. Letras minúsculas comparam grupos no mesmo momento e na mesma coluna. Letras minúsculas diferentes: $p<0,05$.

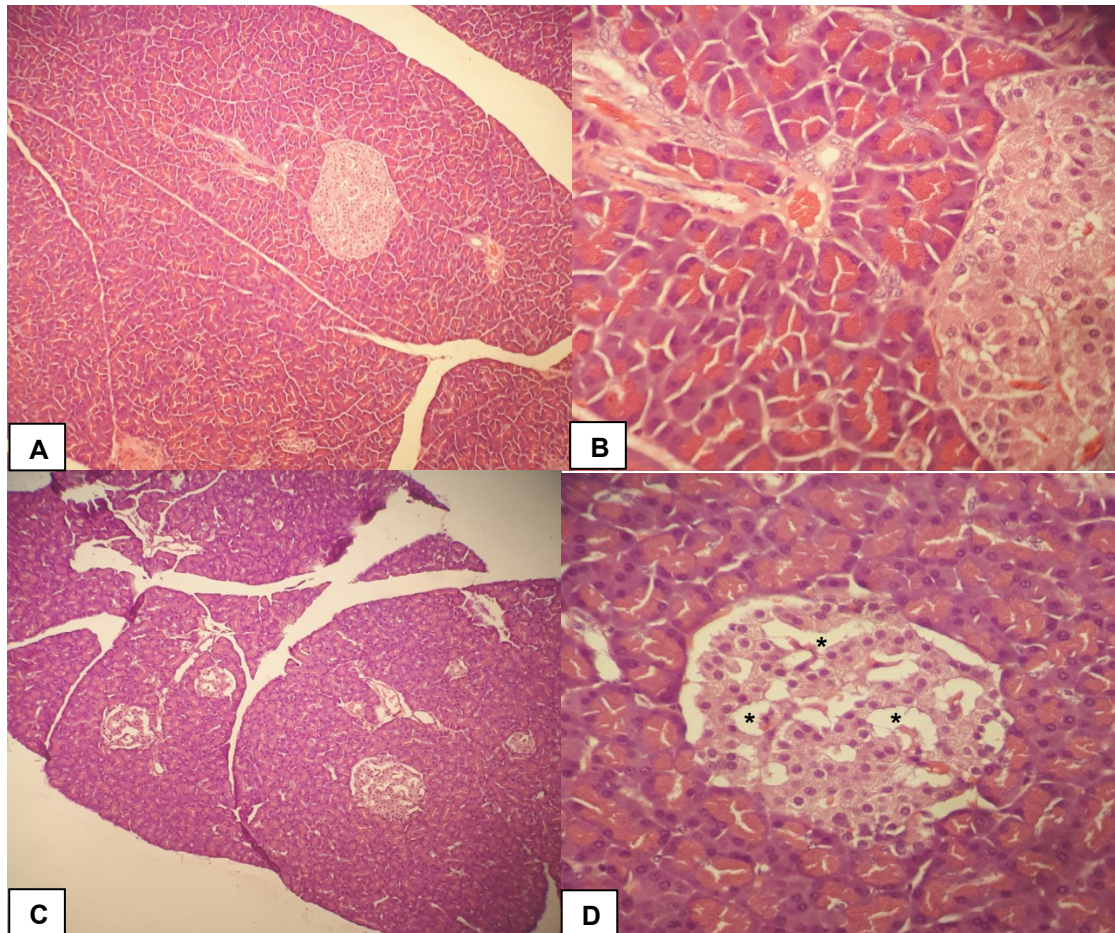


Figura 7 – Fotomicroscopia do pâncreas: A – Parênquima pancreático normal (animal do Grupo I0). B – Detalhe da imagem anterior mostrando ilhota, ácinos e ductos normais. C – Atrofia de ilhotas de Langerhans (animal do Grupo I3). D – Detalhe de uma ilhota atrófica. Notar áreas não preenchidas por células (asteriscos). Em A e C: Hematoxilina-eosina, aumento de 100x; em B e D: Hematoxilina-eosina, aumento de 400x.

4. Discussão

O 2,4-D é considerado um pesticida Classe II, ou seja, “moderadamente perigoso” pela OMS (Organização Mundial de Saúde) [14]. Em estudos com exposição aguda, o 2,4-D geralmente apresenta baixa toxicidade (Categoria de toxicidade III ou IV) por via oral, dérmica e inalatória [15].

Uma revisão da literatura sobre a toxicidade ao 2,4-D, com estudos em animais exposto de forma aguda, subcrônica e crônica ao 2,4-D e aos seus sais e ésteres, mostrou que não há toxicidade sistêmica deste herbicida quando este é usado em doses que não excedem os mecanismos de depuração renal. Porém, em

altas doses, o 2,4-D danifica o fígado e o rim [16]. No presente estudo, observamos que a simulação de exposição ambiental ao herbicida 2,4-D acarretou em inflamação e esteatose hepáticas, alteração tubular renal e atrofia de ilhotas de Langerhans. Estas alterações encontradas estiveram mais associadas à dose do herbicida do que a via de exposição.

Neste estudo, não observamos diferença de peso final dos animais entre os grupos, assim como não houve diferença de quantidade de ingesta de ração. Este dado mostra que não houve interferência no apetite dos animais independente do tipo de exposição ao 2,4-D e que este herbicida não acarretou em perda de peso.

Um estudo com fêmeas de camundongos expostas por 90 dias ao 2,4-DCP mostrou aumento na atividade da fosfatase alcalina nestes animais [5]. No presente estudo, observamos alterações nos níveis de ALT em todos os grupos expostos ao 2,4-D. Isto pode ser justificado pelo fato de termos encontrado processo inflamatório hepático, mesmo que de grau leve, nos animais expostos ao 2,4-D. O processo inflamatório acarreta em destruição de hepatócitos e alteração nos níveis das enzimas hepáticas.

Há um relato de caso na literatura de hepatite aguda em um homem exposto ao 2,4-D através do contato habitual com bolas de golfe, provavelmente contaminadas pelo uso deste herbicida em gramados de golfe [17]. As alterações hepáticas associadas ao 2,4-D observadas em estudos experimentais foram ruptura do cordão hepático, necrose focal, dilatação dos vasos e núcleos picnóticos de hepatócitos [7], congestão vascular, vacuolização citoplasmática e infiltração de células mononucleares [8] e peroxidação lipídica, depleção secundária de glicogênio e alteração estrutural de proteínas [18]. Porém estes estudos utilizaram doses muito elevadas de 2,4-D via gavagem ou na água de beber. O fato de não termos observado necrose de hepatócitos, congestão vascular ou necrose vascular foi, provavelmente, em decorrência de termos utilizado doses mais baixas do que os estudos anteriores, porém semelhantes as da exposição ambiental habitual, as quais simulam doses relevantes da exposição humana.

O aumento progressivo na contagem de NORs (um marcador de proliferação celular [19]) quanto maior a dose de exposição ao 2,4-D mostra ocorrência de regeneração celular aumentada, provavelmente provocada por lesão hepática. Embora, não tenhamos encontrado fibrose hepática, a persistência da exposição ao herbicida 2,4-D pode agravar o processo inflamatório, o que leva ao risco de maior

destruição de hepatócitos, que ao longo dos anos pode culminar no desenvolvimento de cirrose hepática [20].

A absorção de compostos clorofenoxi, classe a qual pertence o 2,4-D, ocorre principalmente através do trato gastrointestinal. A absorção pelo pulmão e pela pele é menor, variando de 5 a 14% [21]. O 2,4-D sofre uma menor degradação hepática em humanos e animais, sendo eliminado em sua maior parte inalterado [2]. A esteatose hepática observada neste estudo foi mais incidente nos grupos expostos por via oral, independente da dose do herbicida, enquanto o processo inflamatório esteve associado a doses elevadas de 2,4-D e não a via de exposição. Esta diferença entre as vias de exposição pode ser devida a possibilidade do 2,4-D quando inalado ser menos absorvido, diminuindo sua concentração hepática. Além da possibilidade do 2,4-D afetar o metabolismo de lipídeos no fígado, semelhante ao que ocorre na ingestão crônica de álcool. Um estudo anterior com animais mostrou que a severidade dos achados histológicos estava associada a aumento da dose [7], o que pode justificar o processo inflamatório observado estar associado as doses mais elevadas do 2,4-D.

Em um estudo, com a administração de 2,4-D em baixas concentrações em alimentos e água, não foi observado efeitos toxicológicos graves, mas o 2,4-D e seu metabólito se acumularam no rim dos animais expostos [22]. O estudo de Uyanikgil et al. [14], com ratos que receberam doses crescentes de 2,4-D via gavagem, mostrou alterações dose-dependentes no córtex renal, como degeneração em corpúsculos renais e podócitos, vacuolização no glomérulo com desintegração da membrana basal, edema de tecido, vacuolização, dilatação cística e invaginação das lâminas basais nas estruturas tubulares, dilatação e congestão nos vasos corpusculares renais e acentuada diminuição na reação de fibronectina glomerular e estromal. Em outro estudo avaliando o rim de ratas prenhas e sua prole que foram tratados com 2,4-D também via gavagem, foram evidenciados espaço de Bowman estreitado, degeneração das células epiteliais tubulares, lúmen tubular alargado e congestão vascular, danos estes também associados a estresse oxidativo e à peroxidação lipídica e diminuição concomitante dos níveis de enzimas antioxidantes [9]. No presente estudo, observamos degeneração hidrópica tubular renal em todos os animais expostos a alta concentração de 2,4-D, independente da via de exposição. A degeneração hidrópica tubular é a primeira alteração estrutural renal observada em intoxicações por xenobióticos e é reversível, porém sua persistência

pode levar a necrose tubular aguda e insuficiência renal [20]. A observação de uma lesão inicial no rim justifica não termos observado alterações nos níveis de ureia e creatinina, provavelmente por termos utilizado doses mais baixas do 2,4-D quando comparado aos outros estudos. Mesmo não sendo observada necrose tubular aguda nem alterações nas provas de função renal, houve um aumento de contagem de NORs nos grupos expostos ao 2,4-D, o que denota possível dano tubular e tentativa de regeneração nos grupos expostos.

No presente estudo, não foram observadas alterações no baço. As alterações esplênicas podem ser primárias ou secundárias. Quando secundárias, geralmente estão associadas a alterações hepáticas como fibrose e/ou cirrose [23]. Assim, a ausência de alterações no baço pode ser justificada pela ausência de alterações hepáticas que acarretam em alterações esplênicas.

Grande parte dos animais expostos ao 2,4-D (42,4%) apresentou atrofia de ilhotas de Langerhans, independente da via de exposição. O fato de não termos encontrado alterações nos níveis de glicose nos animais expostos pode ser devido ao grau de atrofia das ilhotas ter sido discreto ou ao não comprometimento das células β . Alguns estudos tem mostrado relação entre exposição a pesticidas, como organoclorados [24,25] organofosforados, carbamatos e fungicidas [25] e diabetes do tipo 2. A intensidade da relação entre pesticidas e metabólitos de pesticidas com diabetes está relacionada ao tipo de pesticida [26] e é mais forte em indivíduos com sobrepeso ou obesos do que em indivíduos com peso normal [27]. O fato dos animais deste estudo não apresentarem sobrepeso também pode ter influenciado na ausência de alterações nos níveis glicêmicos nos grupos expostos ao 2,4-D. Estudos que avaliem a concentração de cada tipo celular nas ilhotas de Langerhans frente à exposição ao 2,4-D poderão esclarecer a possibilidade de desenvolvimento de um estado pré-diabético nestes casos.

Um estudo realizado com ratos contaminados com 2,4-D via alimentação ou via intraperitoneal, observou focos de células atípicas no pâncreas e no fígado, mostrando o possível potencial carcinogênico do 2,4-D [28]. Em nosso estudo, não observamos alterações displásicas ou neoplásicas em nenhum dos órgãos avaliados. Provavelmente, pelo fato de termos utilizado doses mais baixas de 2,4-D, semelhantes às doses da exposição ambiental oral e inalatória a este herbicida. Assim, a exposição ambiental (oral e inalatória) parece não estar associada à

formação de neoplasias no fígado, rim ou pâncreas, embora cause outros danos nestes órgãos.

5. Conclusão

Com os dados deste estudo concluímos que a simulação da exposição crônica ambiental ao herbicida 2,4-D, por via oral e inalatória, acarretou em alterações histopatológicas hepáticas, renais e pancreáticas nos animais expostos. As alterações hepáticas foram tanto dependentes da via de exposição quanto da dose e as alterações renais e pancreáticas dependentes da dose do 2,4-D. A exposição ao 2,4-D foi associada a um grande número de NORs, demonstrando um aumento de regeneração celular e possivelmente destruição de hepatócitos e células tubulares renais nos animais expostos a alta concentração deste herbicida. Embora, não tenha sido observada alteração nos níveis de glicose nos animais expostos ao 2,4-D, grande parte destes apresentou atrofia de ilhotas de Langerhans.

Agradecimentos

A Ana Vanuire Rombi do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UNOESTE pela realização dos exames bioquímicos e aos técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia da UNOESTE, Carlos Alexandre Santana de Oliveira, Mariana Fonseca Motta Borges e Talita Rizo Pereira, pelo processamento histológico dos espécimes.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não existe nenhum conflito de interesse.

Financiamento

Este estudo foi financiado com auxílio financeiro da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).

Referências

- [1] W. Liu, H. Li, F. Tao, S. Li, Z. Tian, H. Xie, Formation and contamination of PCDD/Fs, PCBs, PeCBz, HxCBz and polychlorophenols in the production of 2,4-D products. *Chemosphere*, 92 (2013) 304–308. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.031

- [2] IARC. DDT, Lindane, and 2,4-D. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 113. IARC, Lyon. 2015. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol113/index.php>. (Accessed Jan 14 2019).
- [3] EFSA, The 2013 European Union report on pesticide residues in food. EFSA Journal, 13 (2015) 4038.
- [4] European Commission, Review report for the active substance 2,4-D. Report No. 7599/V1/97-final. Commission working document. Brussels: Health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate E1 – Food safety, European Commission. 2001. Available from: <http://24d.org/govtrev/ec20011001.pdf>. (Accessed in 4 June 2019).
- [5] J.F. Borzelleca, J.R. Hayes, L.W. Condie, J.L. Jr. Egle, Acute and subchronic toxicity of 2,4-dichlorophenol in CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol*, 5 (1985) 478–486.
- [6] J.M. Charles, H.C. Cunny, R.D. Wilson, J.S. Bus, Comparative subchronic studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, amine, and ester in rats. *Fundam Appl Toxicol*, 33 (1996)161–165. doi:10.1006/faat.1996.0153
- [7] W. Tayeb, A. Nakbi, M. Trabelsi, N. Attia, A. Miled, M. Hammami, Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide "Désormone lourde". *J Hazard Mater*, 180 (2010) 225-233. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.04.018.
- [8] A. Troudi, I. Ben Amara, A.M. Samet, N. Zeghal, Oxidative stress induced by 2,4-phenoxyacetic acid in liver of female rats and their progeny: biochemical and histopathological studies. *Environ Toxicol*, 27 (2012) 137-145. doi: 10.1002/tox.20624.
- [9] A. Troudi, N. Soudani, A.M. Samet, I. Ben Amara, N. Zeghal, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid effects on nephrotoxicity in rats during late pregnancy and early postnatal periods. *Ecotoxicol Environ Saf*, 74 (2011) 2316–2323.
- [10] F.A. Mello, G. Quinallia, A.L. Marion, F.C. Jorge, L.M. Marinelli, A.K.M. Salge, M.A.B. Fagiani, E.A. Mareco, A.P.A. Favareto, R.C. Rossi e Silva, Evaluation of the nasal cavity mice submitted to the inhalation exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Medicina (Ribeirão Preto, Online.)*, 51(2018). <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v51i4p00-00>

- [11] Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. 2005. Available from: http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf. (Accessed in 22 Aug 2015).
- [12] C.M.R. Pegoraro, G.A. Nai, L.A. Garcia, F.M. Serra, J.A. Alves, P.H.N. Chagas, D.G. Oliveira, M.A. Zocoler, Protective effects of *Bidens pilosa* on hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by carbontetrachloride in rats. *Drug Chem Toxicol*, 5 (2018) 1-11. 10.1080/01480545.2018.1526182.
- [13] D. Ploton, M. Menager, P. Jeannensson, G. Himberg, F. Pigeon, J.J. Adnet, Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region of the optical level. *Histochem J*, 18 (1986) 5-14.
- [14] Y. Uyanikgil, U. Ateş, M. Baka, S. Biçer, E. Oztaş, G. Ergen, Immunohistochemical and histopathological evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced changes in rat kidney cortex. *Bull Environ Contam Toxicol*, 82 (2009) 749-755. doi: 10.1007/s00128-009-9689-5.
- [15] Environmental Protection Agency (EPA). *Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D*. Environmental Protection and Toxic Substances. (7508C). EPA 738-R-05-002. June 2005. Available from: https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/24d_red.pdf. (Accessed in 4 June 2019).
- [16] D.H. Garabrant, M.A. Philbert, Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Epidemiology and Toxicology. *Crit Rev Toxicol*, 32 (2002) 233-257. <https://doi.org/10.1080/20024091064237>
- [17] C. Leonard, C.M. Burke, C. O'Keane, J.S. Doyle, "Golf ball liver": agent orange hepatitis. *Gut*, 40 (1997) 687-688. doi:10.1136/gut.40.5.687
- [18] T.H. Dakhakhni, G.A. Raouf, S.Y. Qusti, Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2, 4-D on rat hepatocytes: an FT-IR spectroscopic study. *Eur Biophys J*, 45 (2016) 311-320. doi: 10.1007/s00249-015-1097-7.
- [19] M.S. Siddiqui, I.N. Soomro, N. Kayani, S. Muzaffar, S.H. Hasan, Assessment of nucleolar organizer regions (NORs) in proliferative conditions of the liver. *Pathol Res Pract*, 195 (1999) 421-426.

- [20] G.D. Hammer, S.J. McPhee, *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*. Eighth Edition, McGraw-Hill Education, New York, 2019.
- [21] E.K. Arnold, V.R. Beasley, The pharmacokinetics of chlorinated phenoxy acid herbicides: a literature review. *Vet Hum Toxicol*, 31(1989) 121-125.
- [22] H. Aydin, N. Ozdemir, N. Uzunören, Investigation of the accumulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rat kidneys. *Forensic Sci Int*, 153 (2005) 53-57.
- [23] C.V. Andritoiu, L. Ochiuz, V. Andritoiu, M. Popa, Effect of apitherapy formulations against carbon tetrachloride-induced toxicity in Wistar rats after three weeks of treatment. *Molecules*, 19 (2014) 13374-13391.
- [24] E. Evangelou, G. Ntritsos, M. Chondrogiorgi, F.K. Kavvoura, A.F. Hernández, E.E. Ntzani, I. Tzoulaki, Exposure to pesticides and diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Environ Int*, 91(2016) 60-68. doi: 10.1016/j.envint.2016.02.013.
- [25] C. Juntarawiji, Y. Juntarawijit, Association between diabetes and pesticides: a case-control study among Thai farmers. *Environ Health Prev, Med*, 23 (2018) 3. <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0692-5>.
- [26] C.J. Everett, E.M. Matheson. Biomarkers of pesticide exposure and diabetes in the 1999-2004 national health and nutrition examination survey. *Environ Int*, 36 (2010) 398-401. doi: 10.1016/j.envint.2010.02.010.
- [27] S. Park, S.K. Kim, J.Y. Kim, K. Lee, J.R. Choi, S.J. Chang, C.H. Chung, K.S. Park, S.S. Oh, S.B. Koh, Exposure to pesticides and the prevalence of diabetes in a rural population in Korea. *Neurotoxicology*, 70 (2019) 12-18. doi: 10.1016/j.neuro.2018.10.007.
- [28] E. Kalipci, C. Ozdemir, H. Oztas, Assessing eco-toxicological effects of industrial 2,4-D acid iso-octylester herbicide on rat pancreas and liver. *Biotech Histochem*, 88 (2013) 202-207. doi: 10.3109/10520295.2012.758312.

ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Certificado

<http://www.unoeste.br/SGP/certificados/vw.asp?b=43a1981d3377db2846c0d3#192117>

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "HEPATO E NEFROTOXICIDADE FRENTE À EXPOSIÇÃO CRÔNICA VIA INALATÓRIA E VIA ORAL AO ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D)", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 3792 e tendo como participante(s) DANIEL JOSE PIMENTEL BONFIM (discente), LETICIA ROCHA MAGALHAES (discente), GISELE ALBORGHETTI NAI (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião

valde este documento em www.unoeste.br/legp informando o código de segurança d3a1981d3377db2846c0d3#192117

1 de 2

12/05/2017 09:46

Certificado


<http://www.unoeste.br/SGP/certificados/vw.asp?b=43a1981d3377db2846c0d3#192117>


realizada em 10/05/2017.

Vigência do projeto: 04/2017 a 04/2020.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
ratos Wistar albinos	0	200 gramas	60 dias	M	Biotério Central

Presidente Prudente, 12 de Maio de 2017.


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI


Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Anexo B – Normas de publicação da revista científica a qual o artigo será submetido



JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS

Environmental Control, Risk Assessment, Impact and Management

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0304-3894

DESCRIPTION

The *Journal of Hazardous Materials* publishes full-length research papers, review articles, and case studies that improve our understanding of the hazards and risks that certain materials pose to public health and the environment. Papers that deal with ways of controlling and mitigating risks of hazardous materials (HM) are within the scope of the journal. However, the following areas are excluded: non-hazardous materials, work place health & safety, standard municipal waste and wastewater treatment processes including nutrient removal, greenhouse gas mitigation, toxicology of hazardous materials below the organism level (i.e. at the cellular, metabolic, or molecular level), and the manufacturing of explosives.

The Journal publishes high-impact contributions on: Characterization of the Harmful Effects of Chemicals and Materials

(Including contaminants of emerging concern) Measurement and Monitoring of HM Transport and Fate of HM in Environment Impact Assessment and Management Physico-chemical and Separation Processes for HM Removal Advanced Oxidation Process for HM Removal Thermal Processes for HM Removal Biological Processes for HM Removal Demonstrated Safer and Cleaner Technologies Resource Recovery (Energy and Materials) The Journal publishes papers with significant novelty and scientific impact. The Editors reserve the right to decline, without external review, papers that do not meet these criteria, including papers that:

Are very similar to previous publications, with changed target substrates, employed materials, analyzed sites or experimental methods, Deal with parameter optimization of known processes without new concepts and/or interpretations, Report the environmental analysis and monitoring of specific geographic areas without presenting new insights and/or hypothesis testing, or Do not focus on the environmental relevance and significance of the studied systems or materials.

A 100 word (maximum) "statement of novelty" explaining why the work should be published in *Journal of Hazardous Materials* must be provided as a separate document upon submission of your manuscript. The "statement of novelty" must not be a retelling of the abstract. When preparing the statement, please make sure to address (a) the significance and novelty of the work, with respect to existing literature, and (b) the scientific impact and interests to our readership. Papers that lack significant novelty will be rejected.

Types of Papers

Full-length research papers within the above stated Aims and Scope are welcome. Such contributions are not to be submitted in two parts (i.e. Part I and Part II) - these must be consolidated into one manuscript. Short communications are not considered.

The Editors welcome proposals for review articles. Proposals must contain the following components for consideration: (1) a brief summary of the proposed review article content, (2) a clear indication of the novelty and urgency of such a review paper at this time, in light of other review articles on the same topic, (3) a brief description of the authors' academic background and research areas, and (4) a list of all authors' publications related to the proposed review article topic. Please send your proposals to one of the Editors directly using the e-mail addresses available on the Journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/hazmat>. Note the submission of review articles is by invitation only, pending approval of the proposal by the Editors.

Letters to the Editor will undergo review. Any Letters to the Editor received will be circulated to all Editors before a decision is made whether to publish. Authors of earlier papers, if the Letter concerns a prior publication, will also be given an opportunity to respond.

To ensure conciseness, follow these maximum word count guidelines: research paper: 5,000 words; review article: 15,000 words. Cover letters must state the manuscript word count, which includes text, figure captions, and table legends, but not references.

AUDIENCE

Chemists, Chemical Engineers, Manufacturers of Chemicals, Designers of Chemical Plants, Local Authorities, Emergency Services, Transportation Services, Safety Engineers and Inspectors.

IMPACT FACTOR

2017: 6.434 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

Applied Science & Technology Abstracts
 Elsevier BIOBASE
 Cambridge Scientific Abstracts
 Centre de Documentation Scientifique et Technique - PASCAL Database
 Chemical Abstracts
 CIS
 Coal Abstracts
 Current Contents/Engineering, Computing & Technology
 Engineering Index
 Environmental Periodicals Bibliography
 Laboratory Hazards Bulletin/Chemical Hazards in Industry
 NIOSHTIC
 Système de Documentation et Information Métallurgique
 ASM
 Scopus
 EMBASE

EDITORIAL BOARD

Editors:

Diana Aga, The State University of New York at Buffalo, Buffalo, New York, USA
Andrew Daugulis, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada
Gianluca Li Puma, Loughborough University, Loughborough, UK
Gerasimos Lyberatos, National Technical University of Athens (NTUA), Athens, Greece
Joo Hwa Tay, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada
Eder Claudio Lima, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Associate Editors:

Jaesang Lee, Korea University, Seoul, The Republic of Korea
Constantina Marazioti, University of Patras, Patras, Greece

Editorial Board:

R. Andreozzi, Napoli, Italy
A. Ballester, Madrid, Spain
S.L. Bartelt-Hunt, Omaha, Nebraska, USA
E. Brillas, Barcelona, Spain
H. Cheng, Beijing, China
V. Cozzani, Bologna, Italy
D. Dionysiou, Cincinnati, Ohio, USA
M. Erdem, Elazig, Turkey
S. Esplugas, Barcelona, Spain
Z.P. Hao, Beijing, China
W. Lee, Yuseong-gu, Daejeon, The Republic of Korea
W.-J. Lee, Tainan, Taiwan
P. Lianos, Patras, Greece
L.Q. Ma, Gainesville, Florida, USA
R. Marotta, Napoli, Italy
D. Mohan, India
C. Mulligan, Montreal, Quebec, Canada
P. Oleszczuk, Lublin, Poland
J.M. Park, Pohang, Gyeongbuk, The Republic of Korea
H.J. Pasman, Delft, Netherlands
S.G. Pavlostathis, Atlanta, Georgia, USA
M.J. Plewa, Urbana, Illinois, USA
X. Quan, Liaoning, China
S.D. Richardson, Columbia, South Carolina, USA
M.A. Rodrigo, Real, Spain
P. Stepnowski
S. Tunali Akar, Meselik/Eskisehir, Turkey
S.-B. Wang, Perth, Western Australia, Australia
X. Wang, Beijing, China
J. Yu, Wuhan, China
Z. Svatopluk, Pardubice, Czech Republic
A.I. Zouboulis, Thessaloniki, Greece

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *Journal of Hazardous Materials* full-length research papers, review articles, and case studies that improve our understanding of the hazards and risks that certain materials pose to public health, and the environment. Papers that deal with ways of controlling and mitigating risks of hazardous materials (HM) are within the scope of the journal. However, the following areas are excluded: non-hazardous materials, work place health and safety, standard municipal waste and wastewater treatment processes including nutrient removal, greenhouse gas mitigation, toxicology of hazardous materials below the organism level (i.e. at the cellular, metabolic, or molecular level) and the manufacturing of explosives.

The Journal publishes high-impact contributions on: Characterization of the Harmful Effects of Chemicals and Materials (including contaminants of emerging concern) Measurement and Monitoring of HM Transport and Fate of HM in the Environment Risk Assessment and Management Physico-Chemical and Separation Processes for HM Removal (Adsorption, Ion Exchange, Coagulation/Flocculation/Precipitation, Membrane Processes, Flotation, Stabilization/Solidification) Thermal Processes for HM Removal (Incineration, Pyrolysis, Gasification, Plasma) Advanced Oxidation Processes for HM Removal (Photodegradation/Photocatalysis, H₂O₂-UV, Fenton, Ozone, Sonolysis, Plasma Processes, etc.) Biological Processes for HM Removal (Biodegradation, Phytoremediation, Combined Degradation Processes) Safer and Cleaner Technologies Material and Energy Resource Recovery from Hazardous Waste (Medical waste, Electronic waste, etc.) Micropollutants and Endocrine Disrupting Chemicals.

The Journal publishes papers with significant novelty and scientific impact. The Editors reserve the right to decline, without external review, papers that do not meet these criteria, including papers that: Are very similar to previous publications, with changed target substrates, employed materials, analyzed sites or experimental methods, Deal with parameter optimization of known processes without new concepts and/or interpretations, Report the environmental analysis and monitoring of specific geographic areas without presenting new insights and/or hypothesis testing, or Do not focus on the environmental relevance and significance of the studied systems or materials.

A 100 word (maximum) "statement of novelty" explaining why the work should be published in *Journal of Hazardous Materials* must be provided as a separate document upon submission of your manuscript. The "statement of novelty" must not be a retelling of the abstract. When preparing the statement please make sure to address (a) the significance and novelty of the work, with respect to existing literature, and (b) the scientific impact and interests to our readership. Papers that lack significant novelty will be rejected.

Types of Paper

Full-length research papers within the above stated Aims and Scope are welcome. Such contributions are not to be submitted in two parts (i.e. Part I and Part II) - these must be consolidated into one manuscript. Short communications are not considered.

The Editors welcome proposals for review articles. Proposals must contain the following components for consideration: (1) a brief summary of the proposed review article content, (2) a clear indication of the novelty and urgency of such a review paper at this time, in light of other review articles on the same topic, (3) a brief description of the authors' academic background and research areas, and (4) a list of all authors' publications related to the proposed review article topic. Please send your proposals to one of the Editors directly using the e-mail addresses available on the Journal homepage: <https://www.elsevier.com/locate/hazmat>. Note that submission of review articles is by invitation only, pending approval of the proposal by the Editors.

Letters to the Editor will undergo review. Any Letters to the Editor received will be circulated to all Editors before a decision is made whether to publish. Authors of earlier papers, if the Letter concerns a prior publication, will also be given an opportunity to respond.

To ensure conciseness, follow these maximum word count guidelines: research paper: 5,000 words; review article: 15,000 words. Cover letters must state the manuscript word count, which includes text, figures captions, and table legends, but not references.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2650**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://ees.elsevier.com/hazmat/>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

Manuscripts must conform to the following guidelines for revised manuscripts or they will be rejected.

Should Authors be requested by the Editor to revise their submission, the revised version should be submitted within **two months**. Please note that revised manuscripts will be sent out for review because revising a manuscript does not automatically mean it will be accepted for publication.

In the revision letter, authors must transcribe each reviewer's comments into the letter, followed by the author's responses. Any associated changes in the manuscript (**DO NOT** include page and line numbers) must be copied down in the revision letter. This will help the Editor compare the reviewer comments with both the replies and the changes made in the manuscript. The replies to the reviewers' comments must also be reflected in the revised manuscript wherever possible (not just in the revision letter). Authors must give clear reasons if they choose not to make changes according to the reviewer suggestions. In the revised manuscript, authors must indicate how the manuscript was changed according to the reviewer comments by highlighting the revisions (all new text/data/figures) with colour. Only one final revised version the manuscript must be uploaded.

Authors must provide the original manuscript number, the name of the original handling Editor, and state whether the revised manuscript is a resubmission of a rejected manuscript both in EES and in the cover letter in order to ensure that it is assigned to the original handling Editor.

Upon resubmission of a rejected manuscript, Authors will be required to upload the decision letter from the Editor requesting submission of the rejected manuscript, the original Reviewer comments of the rejected manuscript, the responses to the Reviewer comments, and the original manuscript number. The resubmitted manuscript must indicate, in color, where the revisions were made in the paper in response to the Reviewer comments.

Please be aware that manuscripts rejected for "out of scope" or "lack of novelty" will not be accepted as a resubmission.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **The submitting author and the corresponding author must be the same person. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Abstract

A concise and factual abstract is required (100-200 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) <http://www.iupac.org/> for further information.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Manuscripts must contain at least 10 references. The references must cite recent and relevant research only. At least half (50%) of the references should be published within the last 10 years.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support *Citation Style Language* styles, such as *Mendeley*. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-hazardous-materials>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc.*, New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this

stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>