



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

GABRIELA VIDOTTO CAVALLIERI GOMES

**COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA PULMONAR E DO HEMOGRAMA DE RATOS
EXPOSTOS CRONICAMENTE POR VIA INALATÓRIA E ORAL AOS HERBICIDAS
GLIFOSATO E 2,4-D**

Presidente Prudente- SP
2023



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

GABRIELA VIDOTTO CAVALLIERI GOMES

**COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA PULMONAR E DO HEMOGRAMA DE RATOS
EXPOSTOS CRONICAMENTE POR VIA INALATÓRIA E ORAL AOS HERBICIDAS
GLIFOSATO E 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 Doutora em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional.
Área de concentração: Ciências Ambientais

Orientadora:
Dra Renata Calciolari Rossi
Co-orientadora:
Dra. Ana Paula Alves Favareto

Presidente Prudente- SP
2023

615.907

C377c

Gomes, Gabriela Vidotto Cavallieri.

Comparação morfológica pulmonar e do hemograma de ratos expostos cronicamente por via inalatória e oral aos herbicidas glifosato e 2,4-D / Gabriela Vidotto Cavallieri Gomes. – Presidente Prudente, 2022.

68f.: il.

Tese (Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

Orientador: Dra Renata Calciolari Rossi

Co-orientadora: Dra. Ana Paula Alves Favareto

1. Toxicidade. 2. Pulmão. 3. Células Sanguíneas. 4. Células Caliciformes. 5. Modelos Animais. I. Título.

GABRIELA VIDOTTO CAVALLIERI GOMES

**COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA PULMONAR E DO HEMOGRAMA DE RATOS
EXPOSTOS CRONICAMENTE POR VIA INALATÓRIA E ORAL AOS HERBICIDAS
GLIFOSATO E 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 Doutora em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional.

Presidente Prudente, 24 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Calciolari Rossi
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Máira Rodrigues Uliana
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Sérgio Marques Costa
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Ana Karina Marques Salge Mendonça
Universidade Federal de Goiás – UFG
Goiânia-GO

Profa. Dra. Débora Tavares de Resende e Silva
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS
Chapecó-SC

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que é minha força e meu guia, e a minha mãe Regina que é minha maior incentivadora...

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente e essencialmente, a Deus por ter me sustentado até aqui. Sei que os planos Dele são muito maiores que os meus, e sei que sem Ele não teria conseguido. Obrigada Senhor, por não me deixar desistir e por sempre iluminar o meu caminho fazendo com que as coisas fossem dando certo. Não sei expressar o tamanho da gratidão que sinto e o quanto me sinto abençoada por mais esse sonho concretizado.

Agradeço, em segundo lugar, a pessoa que Deus escolheu a dedo e colocou em minha vida, minha orientadora amada Profa Dra Renata Calciolari Rossi. Desde o mestrado me orientando com maestria, sempre me passou calma, sabedoria e direcionamento. É uma das pessoas mais forte e iluminada que conheço e que levo para minha vida como inspiração pessoal e profissional. Obrigada por tudo minha querida orientadora e amiga, poderá sempre contar comigo. E por isso, agradeço também ao Prof. Dr. Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues que além de me acolher, me apresentou a Profa. Renata quando eu demonstrei interesse para realizar o processo seletivo do mestrado.

Minha eterna gratidão, em todas as conquistas da minha vida, também vai para minha mãe Regina Célia. Ela é a pessoa que mais me admira, me incentiva, me inspira e cuida de mim. Ela sempre está do meu lado nos momentos bons e ruins, é meu porto seguro e um dos principais motivos por eu querer sempre buscar melhores oportunidades de crescimento profissional, para que eu possa um dia dar a ela tudo que merece. A vida dela sempre foi dedica totalmente a mim e ao meu irmão, enfrentou e ainda enfrenta, batalhas diárias e mesmo assim sempre se mostra firme e forte para se preocupar e nos ajudar quando precisamos. Te amo mãe, obrigada por tudo!

Agradeço também ao meu pai Paulo Sérgio por me apoiar desde sempre, por me incentivar a continuar os estudos e por se orgulhar das minhas conquistas mesmo em meio à distância.

Ao meu esposo, Paulo Henrique, por ser um dos meus maiores incentivadores, por falar com orgulho sobre as minhas conquistas, por entender minhas ausências e cansaço. Com certeza, a caminhada fica mais fácil com você ao meu lado. Te amo, obrigada por estar presente em mais essa etapa, obrigada por tudo que construímos e estamos construindo juntos, sou muito feliz ao seu lado.

Agradeço imensamente à Profa Dra Maíra Rodrigues, ao Prof. Dr. Sérgio Costa, à Prof. Dra Ana Karina e a Profa Dra Débora Tavares pela disponibilidade e por terem aceito participar da minha banca de defesa. É uma honra poder contar com as considerações de profissionais excelentes como vocês e tenho certeza que enriquecerão ainda mais o nosso trabalho.

Estendo meus agradecimentos a todos os alunos que participaram durante a fase de experimentação da pesquisa, aos técnicos do laboratório de análises clínicas do hospital veterinário, do laboratório de anatomia patológica, do laboratório de pesquisa odontológica e do Biotério da Unoeste, e também a funcionária Keid Ribeiro Kruger (Secretária do MADRE) por sempre estar disponível para sanar nossas dúvidas.

Gostaria de demonstrar minha gratidão a todos os professores do MADRE pelas aulas lecionadas e por todo o suporte durante o curso, foi uma experiência interdisciplinar enriquecedora para minha vida acadêmica, profissional e pessoal. Além disso, agradeço especialmente ao Prof. Dr. Edson Mareco por contribuir grandemente com as análises estatísticas.

Não posso deixar de agradecer as professoras Dra Patrícia Alcarás e Dra Maria Cristina Corazza, que além de serem grandes incentivadoras desde a graduação, me deram a oportunidade de realizar o estágio de docência no curso de Fonoaudiologia da Unoeste, e também pelas parcerias em pesquisas científicas.

Preciso agradecer imensamente pela existência dos meus maravilhosos sobrinhos Benjamin, Melissa e Isaac, que são luz na minha vida. Terem eles, torna tudo menos difícil, me trazem paz e alegria e têm o poder de recarregar minhas energias. Gratidão ao meu irmão, cunhadas e cunhado por terem me dado esses presentes.

Não foi um período fácil, principalmente por ter que conduzir uma pesquisa e realizar atividades complementares do doutorado em meio a uma pandemia. Conciliar trabalho com as disciplinas, estágio de docência, experimento, análises nos laboratórios e tudo mais, foi um desafio, mas valeu a pena, pois fica muito mais fácil quando fazemos aquilo que amamos. Confesso que houve momentos de angústias, ansiedades, medo, vontade de desistir, por isso tenho tantas pessoas para agradecer, porque sozinha não conseguiria chegar onde cheguei, cada um tem sua parcela de contribuição para mais essa etapa da minha vida e peço desculpas se esqueci de agradecer alguém, então, gostaria de expressar minha gratidão a

todos os meus amigos e familiares que estiveram sempre presentes se preocupando, fazendo orações e torcendo para que tudo desse certo, mesmo os que não entendiam o que é um doutorado ou o que uma Fonoaudióloga fazia com os ratos em um experimento (rsrs).

Por fim, gratidão a todos aqueles que estiveram envolvidos direta ou indiretamente nesse meu processo de aprendizado e conquista.

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001, por meio da Taxa PROSUP (Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares)”.

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça”

(Isaías 41:10).

RESUMO

Comparação morfológica pulmonar e do hemograma de ratos expostos cronicamente por via inalatória e oral aos herbicidas glifosato e 2,4-D.

O Brasil é considerado o país que mais consome agrotóxicos em todo o mundo, sendo um fato preocupante para a saúde pública e ambiental. As formas de exposição aos agrotóxicos são variadas, dentre elas as mais encontradas são a oral e inalatória e ambas podem gerar diversos malefícios a saúde. Dentre os vários pesticidas utilizados no Brasil, os que lideram o ranking de vendas são o glifosato e o 2,4-D. Sendo assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o tecido pulmonar e parâmetros hematológicos de ratos submetidos às exposições inalatórias e oral crônica ao herbicida 2,4-D e ao glifosato. Parte da metodologia foi realizada em um estudo anterior, o que diz respeito a exposição ao herbicida 2,4-D. Para a exposição ao glifosato foram utilizados 112 ratos Wistar machos que foram divididos aleatoriamente 14 animais para 8 grupos de concentrações diferentes (GC – Grupo Controle; GBC – Grupo Baixa Concentração; GMC – Grupo Média Concentração e GAC – Grupo Alta Concentração), sendo 4 grupos expostos por via inalatória e 4 grupos expostos por via oral. A exposição foi realizada por 180 dias e após foi realizada a coleta do sangue dos animais para confecção do hemograma e a eutanásia e coleta do tecido pulmonar para análise do infiltrado inflamatório e quantificação das células caliciformes nas vias aéreas. Em relação ao hemograma foi observado que os animais expostos ao glifosato estavam com os valores de hematócritos elevados em todos os ratos, entretanto os do GBC e GMC estavam significativamente reduzidos em relação ao GC. O mesmo resultado foi observado na análise da hemoglobina. Outra alteração observada foi em relação aos valores de fibrinogênio que estavam normais no GC e elevados, com diferença estatística, no GAC e na literatura há indícios de que os níveis de fibrinogênio podem estar relacionados a doenças cardiovasculares. Os animais expostos ao 2,4-D apresentaram valores elevados de eritrócitos comparado aos de referência, sendo que os animais do GBC e GAC estavam com valores significativamente maiores que o GC. Na análise pulmonar não foi observado aumento significativo das células caliciformes e do infiltrado inflamatório dos grupos expostos aos herbicidas comparados aos GC. Portanto, concluímos que ambos os herbicidas podem desencadear alterações hematológicas, entretanto o glifosato se demonstrou com uma maior toxicidade para o sangue comparado aos resultados encontrados do 2,4-D. Além disso, no período de 6 meses a exposição aos herbicidas não provocaram alterações pulmonares. Devido a utilização de agrotóxicos e outras substâncias associadas na prática agrícola, sugere-se ampliar as pesquisas sobre os efeitos da exposição combinada a essas substâncias na saúde ambiental, animal e humana.

Palavras-chave: Toxicidade. Pulmão. Células Sanguíneas. Células Caliciformes. Modelos animais.

ABSTRACT

Lung morphological comparison and blood count of rats chronically exposed by inhalation and orally to the herbicides glyphosate and 2,4-D

Brazil is considered the country that consumes the most pesticides in the world, which is a matter of concern for public and environmental health. The forms of exposure to pesticides are varied, among them the most common are oral and inhalation, both of which can cause various harm to health. Among the various pesticides used in Brazil, those leading the sales ranking are glyphosate and 2,4-D. Therefore, the objective of the present study is to evaluate the lung tissue and hematological parameters of rats submitted to inhalational and chronic oral exposure to 2,4-D herbicide and glyphosate. Part of the methodology was carried out in a previous study, which concerns exposure to the 2,4-D herbicide. For glyphosate exposure, 112 male Wistar rats were randomly divided into 14 animals for 8 groups of different concentrations (GC – Control Group; GBC – Low Concentration Group; GMC – Medium Concentration Group and GAC – High Concentration Group), 4 of which were groups exposed by inhalation and 4 groups exposed by oral route. The exposure was carried out for 180 days and after that the animals' blood was collected for making the blood count and euthanasia and collection of lung tissue for analysis of the inflammatory infiltrate and quantification of goblet cells in the airways. Regarding the blood count, it was observed that the animals exposed to glyphosate had high hematocrit values in all rats, however those of the GBC and GMC were significantly reduced in relation to the GC. The same result was observed in the analysis of hemoglobin. Another alteration observed was in relation to fibrinogen values that were normal in the CG and elevated, with statistical difference, in the GAC and in the literature there are indications that fibrinogen levels may be related to cardiovascular diseases. The animals exposed to 2,4-D showed high values of erythrocytes compared to the reference ones, and the animals from the GBC and GAC had significantly higher values than the GC. In lung analysis, no significant increase in goblet cells and inflammatory infiltrate was observed in the groups exposed to herbicides compared to the CG. Therefore, we conclude that both herbicides can trigger hematological changes, however glyphosate has shown to be more toxic to the blood compared to the results found for 2,4-D. In addition, in the period of 6 months, exposure to herbicides did not cause pulmonary alterations. Due to the use of pesticides and other associated substances in agricultural practice, it is suggested to expand research on the effects of combined exposure to these substances on environmental, animal and human health.

Keywords: Toxicity. Lung. Blood Cells. Goblet Cells. Animal models.

LISTA DE SIGLAS

IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
TON/IA	- Tonelada por Ingrediente Ativo
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
SEADE	- Sistema Estadual de Análise de Dados
ABRASCO	- Associação Brasileira de Saúde Coletiva
PLS	- Projeto de Lei do Senado
GHS	- Globally Harmonized System
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DL50	- Dose Letal Mediana
CL50	- Concentração Letal Mediana
EPA	- Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
EPI	- Equipamento de Proteção Individual
IARC	- Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
LMR	- Limite Máximo de Resíduo
PARA	- Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
GCI	- Grupo Controle Inalatório
GCO	- Grupo Controle Oral
GBCI	- Grupo Baixa Concentração Inalatório
GBCO	- Grupo Baixa Concentração Oral
GMCI	- Grupo Média Concentração Inalatório
GMCO	- Grupo Média Concentração Oral
GACI	- Grupo Alta Concentração Inalatório
GACO	- Grupo Alta Concentração Oral
HCM	- Hemoglobina Corpuscular Média
CHCM	- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
VCM	- Volume Corpuscular Médio
DPOC	- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
LBA	- Líquido do Lavado Broncoalveolar
LPS	- Lipopolissacarídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Caixas de inalação.....	30
Figura 2-	Quantificação das células calciformes por meio do software Image-Pro Plus	32
Figura 3-	Imagens representativas dos escores classificatórios do infiltrado inflamatório.....	33
Figura 4-	Comparação da média do peso dos animais entre os diferentes grupos das concentrações dos herbicidas glifosato e 2,4-D por via inalatória e oral e o tempo de antes e depois das exposições.....	34
Figura 5-	Comparação da média do peso dos animais entre os diferentes grupos de concentrações dos herbicidas glifosato e 2,4-D e as vias de exposições inalatória e oral.....	35
Figura 6-	Comparação dos valores de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e VCM entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida 2,4-D expostos por via inalatória.....	36
Figura 7-	Comparação dos valores de fibrinogênio, plaquetas, leucócitos e eosinófilos entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida 2,4-D expostos por via inalatória.....	37
Figura 8-	Comparação dos valores de linfócitos, monócitos, HCM, CHCM e proteína plasmática entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida 2,4-D expostos por via inalatória.	38
Figura 9-	Comparação dos valores de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e VCM entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida glifosato expostos por via inalatória.....	39
Figura 10-	Comparação dos valores de fibrinogênio, plaquetas, leucócitos e eosinófilos entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida glifosato expostos por via inalatória.	40
Figura 11-	Comparação dos valores de linfócitos, monócitos, HCM, CHCM e proteína plasmática entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida glifosato expostos por via inalatória.....	41
Figura 12-	Comparação da quantificação das células calciformes dos pulmões entre os animais expostos por via inalatória e oral de cada herbicida (Glifosato e 2,4-D).....	42

Figura 13-	Comparação da quantificação das células calciformes dos pulmões entre os animais expostos por via oral ao glifosato e ao 2,4-D e os expostos por via inalatória aos herbicidas.....	43
Figura 14-	Imagens de lâminas dos pulmões dos ratos expostos ao 2,4-D, de cada grupo, utilizadas para a quantificação das células calciformes.	43
Figura 15-	Imagens de lâminas dos pulmões dos ratos expostos ao glifosato, de cada grupo, utilizadas para a quantificação das células calciformes.....	44
Figura 16-	Comparação do escore do infiltrado inflamatório dos pulmões entre os animais expostos por via oral e inalatória de cada herbicida (Glifosato e 2,4-D).	45
Figura 17-	Comparação do escore do infiltrado inflamatório dos pulmões entre os animais expostos por via oral ao glifosato e ao 2-4-D e os animais expostos por via inalatória aos herbicidas.....	45
Figura 18-	Imagens de lâminas dos pulmões dos ratos expostos ao 2,4-D, de cada grupo, utilizadas para classificação do infiltrado inflamatório.....	46
Figura 19-	Imagens de lâminas dos pulmões dos ratos expostos ao glifosato, de cada grupo, utilizadas para análise do infiltrado inflamatório.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	O cenário dos agrotóxicos no Brasil e no Oeste do Estado de São Paulo.....	17
2.2	Pulverização aérea	18
2.3	Classificação dos agrotóxicos e toxicidade	19
2.4	Herbicida Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	20
2.5	N-Fosfometil Glicina (Glifosato)	22
2.6	Efeitos nocivos da exposição aos agrotóxicos	24
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Aspectos de natureza ética	28
3.2	Caracterização da amostra	28
3.3	Protocolo de exposição inalatória e oral ao herbicida glifosato.....	29
3.4	Coleta dos materiais	31
3.5	Análise histopatológica	31
3.7	Análise estatística	33
4	RESULTADOS.....	34
5	DISCUSSÃO	47
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXO A-PARECER FINAL DA COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA).....	63

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos maiores produtores agropecuários, o qual representa fundamental importância na economia local. Para manter essa alta produtividade e suprir o aumento do consumo advindo do constante crescimento populacional, são necessárias o uso de algumas medidas nas plantações, tais como sementes transgênicas e, principalmente, insumos químicos como fertilizantes e agrotóxicos (PIGNATI *et al.*, 2017).

Esses agrotóxicos são aplicados de diversas formas, inclusive podem ser pulverizados por meio de tratores e aviões sobre as plantações, entretanto além de atingirem o alvo desejado, são disseminados no ambiente e podem contaminar o solo, as águas, o ar e os alimentos, além de atingir trabalhadores, moradores e animais que vivem ao entorno dessas áreas pulverizadas (PIGNATI *et al.*, 2017).

É evidente que o tipo de agrotóxico mais utilizado no Brasil e no mundo é o herbicida e o aumento do seu consumo já está bem documentado, principalmente em países da América do Norte, da América do Sul, Europa e Ásia. O mercado dos herbicidas chegou a gerar cerca de US\$ 17 bilhões anualmente, sempre com tendência ao crescimento exponencial (GIANESSI, 2013). De acordo com avaliações mais recentes, os herbicidas representam quase US\$ 24 bilhões em valor de mercado (HASANUZZAMAN *et al.*, 2020).

Trabalhos anteriores demonstraram o potencial efeito tóxico dos agrotóxicos, que pode prejudicar a saúde da população apresentando efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, neuroendócrinos, dificuldades respiratórias, problemas de memória e de pele, depressão, entre outros (PERES; MOREIRA, 2003; GRISOLIA, 2005).

Desta forma, precisamos buscar informações que demonstrem se há riscos no consumo desses alimentos contaminados, principalmente, para os que possuem agrotóxicos que não deveriam ser encontrados em determinadas culturas.

A relevância do tema é destacada ao se considerar a dimensão da área de utilização dos herbicidas 2,4-D e glifosato no Pontal do Paranapanema e em todo o Brasil e a diversidade de pessoas expostas ao produto, sendo assim, os resultados deste estudo poderão contribuir para a conscientização das empresas, trabalhadores e a população em geral quanto aos riscos à saúde do uso indiscriminado dos herbicidas, dando início a discussões quanto à criação de

projetos sustentáveis e políticas públicas, que melhorem a saúde e a qualidade de vida de todos os envolvidos.

Além disso, as consequências à saúde relacionada ao uso de agrotóxicos são muito bem exploradas por meio de estudos há algum tempo, porém, no Brasil, não se encontram muitas informações na literatura sobre os efeitos causados pela exposição crônica a essas substâncias, necessitando de uma maior atenção, principalmente pelo fato de simular a exposição inalatória do trabalhador rural e a exposição oral da população que consome os alimentos contaminados.

Sendo assim, o objetivo geral do presente trabalho é avaliar o tecido pulmonar e parâmetros hematológicos de ratos submetidos às exposições inalatórias e oral crônica ao herbicida 2,4-D e ao glifosato. Com isso, os objetivos específicos são: Avaliar os parâmetros hematológicos dos ratos expostos por via inalatória aos herbicidas 2,4-D e ao Glifosato; Quantificar as células caliciformes nas vias aéreas dos pulmões dos ratos expostos por via inalatória e oral ao 2,4-D e glifosato; Classificar o infiltrado inflamatório dos pulmões dos ratos expostos por via inalatória e oral a ambos os herbicidas; Comparar os resultados entre os diferentes herbicidas, concentrações e formas de exposição.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O cenário dos agrotóxicos no Brasil e no Oeste do Estado de São Paulo

O Brasil expandiu seu mercado de agrotóxicos de forma muito rápida a partir do ano 2000 (cerca de 190%), ultrapassando mais que o dobro do crescimento do mercado global (93%). A partir dessa expansão, o Brasil se tornou o país campeão em vendas de pesticidas no ranking mundial desde o ano de 2008, quando movimentou R\$ 7 bilhões no mercado de agroquímicos (LONDRES, 2011).

Desde então, os números vêm crescendo, o último relatório de vendas publicado em 2021 pelo Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2021) demonstra que o Brasil vendeu mais de 685.745 toneladas por ingrediente ativo (TON/IA) no ano de 2020, um aumento aproximado de 10% em relação ao ano anterior (620.537 TON/IA) (BRASIL, 2021).

Ainda de acordo com o Brasil (2021), de todas as regiões do Brasil, a que mais vendeu agrotóxicos no ano de 2020 foi a Centro-Oeste, sendo o estado do Mato Grosso o campeão em vendas, com cerca de 133.290 TON/IA. A segunda região que mais comercializou foi a região sul, tendo o estado do Paraná como líder, seguida da região sudeste, com o estado de São Paulo liderando o comércio de agrotóxicos, o qual vendeu aproximadamente 88.954 TON/IA, que representa cerca de 61% das vendas de toda a região sudeste.

Existem diversas classes de agrotóxicos comercializadas, porém uma das classes mais utilizadas são os herbicidas, principalmente no Estado de São Paulo, que é responsável por 43,1% do faturamento total do estado. Os herbicidas comercializados em São Paulo são destinados especialmente ao cultivo de cana-de-açúcar, além de soja e milho (FERREIRA; VEGRO; CAMARGO, 2008). E nessas plantações os agrotóxicos que mais se destacam no estado são: glifosato, cipermetrina, enxofre, 2,4-D, atrazina e metamidofós (BRASIL, 2010).

O estado de São Paulo é o maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, o qual representa aproximadamente 50% da área plantada nacional, característica em comum com o estado do Mato Grosso, campeão em venda de agrotóxicos, que também possui a cana-de-açúcar como uma das culturas importantes para a agricultura da região (BRASIL, 2017).

Entretanto, de todo o Estado de São Paulo, há regiões que se destacam na produtividade dessa cultura. Sachs e Martins (2007) relataram que entre os anos de

1995 à 2006 as regiões que apresentaram maiores taxas anuais de crescimento de área de cultivo de cana-de-açúcar foram Presidente Prudente (12,76%), Dracena (12,70%), São José do Rio Preto (12,04%), Tupã (11,88%) e Andradina (10,67%), ou seja, áreas localizadas no oeste do estado em regiões tradicionais nas atividades agropecuárias.

Cabe ressaltar que um fator limitante ao cultivo de cana-de-açúcar são as plantas infestantes, que pode comprometer até 85% da produtividade quando não tratadas corretamente, portanto o cultivo requer a utilização de medidas químicas, mecânicas e/ou biológicas para o controle dessas ervas daninhas, porém o uso de agroquímicos continua como principal escolha por ser um método econômico e de alto rendimento (KUVA *et al.*, 2003), o que justifica a grande proporção do uso dos agrotóxicos em São Paulo, sendo que os mais utilizados no estado, especificamente do Oeste Paulista são: glifosato, atrazina e 2,4-D, devido, principalmente, ao cultivo da cana-de-açúcar. (SÃO PAULO, 2013).

2.2 Pulverização aérea

Apesar dos já conhecidos impactos para o meio ambiente e para a saúde humana, uma das formas de aplicação dos pesticidas no Brasil é a pulverização aérea. Essa técnica tem como objetivo aplicar a quantidade correta do composto no alvo desejado, com extrema eficácia e de forma ágil, economizando mão-de-obra e tempo (COSTA *et al.*, 2007; FERREIRA, 2015).

De acordo com o Ministério da Saúde, a pulverização aérea vem sendo extensivamente discutida no país pelos danos já conhecidos e pelo fato da possibilidade de deriva. Deriva ou “deriva técnica” é quando ocorre a disseminação do agrotóxico no meio ambiente durante a sua aplicação por meio do vento ou das águas. A deriva sempre acontece, mesmo quando todas as normas técnicas de aplicação são seguidas (BRASIL, 2016). Isso sugere que é praticamente impossível utilizar agroquímicos sem contaminar o meio ambiente e sem afetar os que trabalham ou vivem ao entorno da aplicação.

A deriva técnica pode ultrapassar os 80% na pulverização e assim atingir localidades distantes, por causa do deslocamento da calda do produto fora do local desejado, e pode ser influenciada pelo vento, temperatura do ar, umidade relativa do ar, distância do alvo, velocidade de aplicação e tamanho das gotas (BRASIL, 2016). Um estudo realizado por Chaim (2004) estima que 32% dos agrotóxicos pulverizados

ficam retidos nas plantas, outros 19% atingem áreas adjacentes da aplicação e 49% atingem o solo.

De acordo com o Dossiê ABRASCO- Associação Brasileira de Saúde Coletiva (AUGUSTO *et al.*, 2012), a pulverização é mais perigosa e contaminante do que outras formas de aplicação e deveria ser proibida. O Ministério da Saúde demonstrou ser favorável à proposta de proibição da pulverização aérea no Brasil, como resposta à consulta sobre o Projeto de Lei do Senado (PLS) nº 541/2015 (BRASIL, 2015), porém até o momento não houve mudanças na legalização sobre a pulverização.

2.3 Classificação dos agrotóxicos e toxicidade

A classificação dos agrotóxicos é feita através de sua composição e finalidade, são eles: acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, nematicidas, rodenticidas e moluscicidas, os quais são utilizados para combater, respectivamente, ácaros, bactérias, fungos, plantas infestantes, insetos, nematoides parasitas, roedores e moluscos, sendo que os herbicidas representam 45% do valor total de agrotóxicos comercializados no país (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela classificação da toxicidade dos agrotóxicos no Brasil. E essa classificação sofreu alterações no ano de 2019, devido as diferenças classificatórias que existiam quando comparado a toxicidade dos agrotóxicos no Brasil com a de outros países. Portanto, em 2019 houve uma reclassificação na qual o Brasil passou a adotar os parâmetros de classificação toxicológica de agrotóxicos com base nos padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS) (BRASIL, 2019a).

A classificação toxicológica dos agroquímicos permanece baseada nos perigos que eles podem representar aos seres humanos, essa classificação é estabelecida pela Resolução nº 294/2019 da ANVISA (BRASIL, 2019c), a qual estabelece os critérios para a classificação toxicológica dos agrotóxicos a partir da: Dose letal mediana aguda (DL 50) por via oral e dérmica, para animais de laboratório, para os produtos técnicos e produtos formulados e a Concentração letal mediana inalatória (CL 50) para produtos formulados como gases, vapores, sólidos e

líquidos. As DL50 e CL50 referem-se a dose ou concentração do agrotóxico que é letal à 50% dos animais em testes.

De acordo com esses critérios os agrotóxicos são classificados atualmente, em 6 classes, sendo elas: Extremamente Tóxico (Categoria I), Altamente Tóxico (Categoria II), Moderadamente Tóxico (Categoria III), Pouco Tóxico (Categoria IV), Improvável de causar dano agudo (Categoria V) e não classificado. Quanto menor o valor para a dose e concentração letal, irritação dérmica e ocular, mais tóxico é o agrotóxico (BRASIL, 2019a).

A toxicidade dos pesticidas pode ser dividida em aguda e crônica, de acordo com os efeitos dos mesmos. Os efeitos agudos surgem logo em seguida do contato com uma única dose do agrotóxico e pode provocar náuseas, vômitos, desmaios, dificuldades respiratórias e espasmos musculares. Também podemos observar efeitos subagudos que acontece por exposição moderada ou pequena a substâncias altamente ou mediamente tóxicas, provocando sintomas subjetivos como dor de cabeça, fraqueza, sonolência, dor de estômago. E o efeito crônico é provocado por pequenas exposições de uma substância por um longo período de tempo, podendo ser observados em semanas, meses e até anos, dificilmente diagnosticados e relacionados com o agente causador (PERES; MOREIRA, 2003).

De acordo com o Ministério da Saúde, a intoxicação crônica dificilmente é estabelecida por apresentar quadros clínicos indefinidos e muitas vezes irreversíveis, o que leva a não existir registros oficiais sobre os efeitos crônicos causados pelo contato com os pesticidas. Os efeitos podem manifestar-se através de várias patologias e alcançar vários órgãos e sistemas, e dar origem, principalmente, a problemas imunológicos, hepáticos, neurológicos, hematológicos e tumores (BOMBARDI, 2011; BEZERRA et al., 2013).

A carcinogênese é um dos fatores mais preocupantes em relação a exposição crônica aos pesticidas, visto que diversos estudos já evidenciaram a exposição aos agroquímicos como fator de risco para câncer de mama (RUDEL et al., 2007), tumores cerebrais (MIRANDA-FILHO; MONTEIRO; MEYER, 2012), câncer de próstata e câncer de boca (KACHURI et al., 2017).

2.4 Herbicida Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

O primeiro herbicida registrado no Brasil foi o ácido 2,4-diclorofenoxiacético, conhecido como 2,4-D, sendo introduzido em 1946 e desde então se transformou

em um dos herbicidas mais usados em todo o mundo. No princípio, suas propriedades fitotóxicas foram utilizadas com propósitos militares durante a Guerra do Vietnã, juntamente com o ácido 2,4,5- triclorofenoxiacético (2,4,5- T) e o pentaclorofenol formaram o “agente laranja” com função de desfolhante e, após a guerra, funcionaram como substitutos da capina manual, que reduziu a mão-de-obra e aumentou a produtividade agrícola (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002).

Em 2012, o 2,4-D foi o quinto herbicida mais utilizado para a agricultura, bem como a escolha preferida em casa e jardim nos Estados Unidos (EPA, 2017). E no Brasil é o segundo agrotóxico mais vendido desde o ano de 2013, perdendo apenas para o Glifosato (IBAMA, 2020). Por ser muito popular e utilizado em várias culturas, há preocupações com os riscos da exposição humana, que pode ocorrer durante a aplicação do herbicida ou sua fabricação, além da população que habita em espaços onde o 2,4-D é aplicado (AYLWARD *et al.*, 2010).

O 2,4-D é utilizado no controle de várias plantas infestantes, em plantações de cereais, cana-de-açúcar, arroz, café, soja, milho, controle florestal e pomares. Em seu índice monográfico inicial a ANVISA classificava o 2,4-D como Classe I, ou seja, Extremamente Tóxico, pois apresenta irritação ocular persistente com opacidade corneana, irite, hiperemia, edema e secreção conjuntivais. Porém, na reclassificação de 2019 o 2,4-D passou a ser classificado como Classe IV, pouco tóxico (BRASIL, 2019a) devido aos valores de DL 50 Oral, Dérmica e CL 50 inalatória, em consonância com os dados apresentados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA, 2005).

Além disso, as avaliações da EPA (2005) revelam que o herbicida não é um irritante da pele (Categoria de Toxicidade III ou IV) e embora as formas de éster de 2,4-D não sejam irritantes para os olhos (Categoria de toxicidade III ou IV), as formas ácidas e salinas são consideradas irritantes oculares graves (Categoria de toxicidade I) (EPA, 2005).

Em 2019 o 2,4-D passou por uma reavaliação toxicológica pela ANVISA na qual concluiu que o herbicida não será proibido no Brasil, visto que os estudos revisados demonstraram que o produto não é tóxico para a reprodução e formação de fetos, nem para o sistema endócrino. E também relataram que não há possibilidade do herbicida ser mutagênico ou causador de câncer (BRASIL, 2019b).

Porém, embora a ANVISA não tenha proibido o uso do 2,4-D, a agência reconheceu que há riscos aos trabalhadores rurais quanto a exposição ao produto e

por isso, definiu medidas que precisam ser adotadas, a partir de então, para a aplicação do herbicida e para a população que reside em torno das áreas pulverizadas. Aos trabalhadores rurais as medidas são: Para aplicação por meio do trator serão necessários vários trabalhadores rurais para o preparo e a aplicação do produto; o trabalhador só poderá entrar em uma área pulverizada após o tempo mínimo definido para cada tipo de cultura ou com uso de equipamentos de proteção individual (EPI). Aos residentes de áreas próximas às plantações: margem de 10 metros em que o produto não poderá ser aplicado; práticas que reduzem a deriva técnica; limitação de dose máxima de aplicação de 1,7 kg/hectare por via costal (BRASIL, 2019b).

Grande parte dos agravos evidenciados pelo 2,4-D como alterações da tireóide, rins, supra-renais, ovários e testículos, foram observados em estudos de longo prazo e em níveis de dose acima do limiar de saturação para a depuração renal (EPA, 2005).

Além disso, uma revisão de literatura sobre neurotoxicidade do 2,4-D demonstrou que os efeitos do herbicida são dose-dependente, ou seja, aumentam com a dose. Os principais efeitos neurotóxicos observados pelos autores para o 2,4-D foram redução da atividade motora; alterações nos padrões locomotores e comportamentos interrompidos; hipomielinização; alterações nos níveis de lipídios, proteínas e DNA; alterações na serotonina e compostos associados (FREITAS *et al.*, 2019).

O 2,4-D pertence à classe dos ácidos fenoxiacéticos e mesmo sendo comercializado há muitos anos, ainda existem dúvidas quanto aos seus efeitos à saúde humana e riscos ao ambiente (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002).

2.5 N-Fosfometil Glicina (Glifosato)

O N-fosfometil glicina, Glifosato, é um herbicida que pertence a classe do fosfonato, que é uma classe bem similar aos organofosforados, e que pode ser encontrado com os nomes comerciais de Roundup ou Sting (BAIRD; CANN, 2011). É um herbicida amplamente difundido, com uso anual de aproximadamente 1 milhão de toneladas em todo o mundo (SWANSON *et al.*, 2014).

O glifosato, formulado como Roundup, é um herbicida de amplo espectro. Sua principal função é eliminar as plantas infestantes nas lavouras de trigo, canola e soja, embora, nas lavouras de trigo, também seja usado como

dessecante antes da colheita (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018). Além disso, o glifosato também é usado em áreas urbanas, em parques e em contextos marinhos para eliminar plantas aquáticas (CLEMENTS *et al.*, 2017).

No Brasil, atualmente, o Glifosato apresenta classe toxicológica V pela ANVISA, ou seja, improvável de causar dano agudo (BRASIL, 2019). Porém, assim como o 2,4-D, antes da reclassificação toxicológica de 2019 o glifosato era classificado como extremamente tóxico (Classe I). Nos Estados Unidos, é classificado como herbicida com baixa toxicidade aguda por via oral, inalatória e dérmica pela EPA (2009).

O glifosato é o agrotóxico líder em vendas no Brasil desde o ano de 2009, quando o IBAMA deu início a liberação dos boletins sobre a comercialização desses produtos (BRASIL, 2020).

O uso do glifosato ainda gera certas polêmicas entre a comunidade científica e seus consumidores, pois há um debate contínuo sobre a sua proibição devido os questionamentos sobre a segurança do glifosato para a saúde humana. Os Estados Unidos e agências europeias defendem que o glifosato e suas formulações comerciais são classificados como produtos químicos com baixa probabilidade de serem cancerígenos (FOGLIATTO; FERRERO; VIDOTTO, 2020). Em controvérsia, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica essa substância como provável cancerígena, com base em sua capacidade de induzir danos ao DNA e estresse oxidativo (KUDSK; MATHIASSEN, 2020).

Na bula do herbicida glifosato, consta que, além de ser grande irritante ocular e dérmico, pode causar danos hepáticos e renais se ingeridos, como forma de alimentos contaminados, com doses acima dos limites recomendados (MONSANTO, 2019).

É necessário se preocupar com a saúde da população em geral, e principalmente, com os trabalhadores rurais, visto que o glifosato foi encontrado em altas proporções na urina de agricultores e outros fluidos biológicos, como sangue e leite materno, e também esteve presente em 60-80% da população geral, incluindo crianças (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018; NIEMANN *et al.*, 2015).

Alguns trabalhos anteriores já demonstraram efeitos tóxicos do glifosato no sistema nervoso, hepático, renal e reprodutivo (FORD *et al.*, 2017; KUBSAD *et al.*, 2019; YAOYU *et al.*, 2020; VAN BRUGGEN *et al.*, 2018).

Estudos *in vitro*, também já evidenciaram que o glifosato causa danos genéticos, aumenta o estresse oxidativo, interfere na via do estrogênio, pode comprometer as funções cerebrais e tem sido correlacionado com várias formas de câncer (PORTIER *et al.*, 2016; NAGY *et al.*, 2019; PEILLEX; PELLETIER, 2020).

Foi demonstrado também risco da inalação do glifosato para a saúde respiratória em um estudo experimental com camundongos. Os animais inalaram amostras de ar após a pulverização do glifosato e foi observado que essa exposição representou um fator de risco para asma ocupacional, evidenciado pelo aumento na contagem de células de eosinófilos, neutrófilos e mastócitos nos pulmões dos animais expostos (KUMAR *et al.*, 2014).

Há indícios de que a exposição oral ao glifosato também acontece, demonstrado pela presença em quantidades significativas do herbicida na carne de boi e na urina das vacas que consumiam alimentos contaminados (KRUGER *et al.*, 2014). A substância se acumula no solo, água, produtos vegetais e alimentos, incluindo grãos, frutas e cereais, e não são removidos pela lavagem nem degradados pelo cozimento (MCQUEEN; CALLAN; HINWOOD, 2012; TORRETTA *et al.*, 2018).

Como observado, os dados são amplos sobre os efeitos da exposição ao glifosato na saúde, e por ser um herbicida muito utilizado a garantia da sua segurança nas concentrações de exposições para a população em geral precisa estar em constante avaliação e por isso requer um número maior de publicações que definam essa segurança.

2.6 Efeitos nocivos da exposição aos agrotóxicos

Se por um lado a utilização dos defensivos agrícolas aumenta e diversifica a produção, por outro podem ser os responsáveis pela ocorrência de vários impactos negativos em relação à saúde e à segurança dos que estão diretamente ligados e dos organismos vivos presentes no ambiente, além disso, também podem alcançar uma grande parte da população através da pulverização, consumo de alimentos e água contaminada (DE OLIVEIRA; FAVARETO; ANTUNES, 2013).

De acordo com Rigotto, Vasconcelos e Rocha (2014) os agrotóxicos são considerados um grande problema de saúde pública, devido ao aumento da exposição de trabalhadores de fábricas de agroquímicos e da agricultura, de moradores

das áreas agrícolas e seus trabalhadores, no controle de endemias, além de todos os consumidores dos alimentos contaminados.

Além disso, Inouye (2014) citam que o desconhecimento sobre os danos que os defensivos agrícolas trazem é considerado um dos principais problemas que aumenta o risco de contaminações devido à falta de utilização de equipamentos de proteção e fragilidade dos órgãos de fiscalização, fatores que são mais susceptíveis em áreas de baixo nível socioeconômico e cultural.

Londres (2011) relata que diferente das intoxicações agudas, as intoxicações crônicas, não advém apenas do contato direto com o pesticida, mas que o uso massivo de defensivos agrícolas contamina os alimentos, as águas e o ar e assim dissemina essa substância a grande parte da população e pode causar doenças neurológicas, hepáticas, respiratórias, renais, cânceres, nascimento de crianças com malformações congênitas, entre outros males.

Os problemas de saúde decorrentes da utilização de agrotóxicos não estão direcionados unicamente a pessoa e o produto exposto. Vários outros fatores interferem nesse processo e não devem ser desconsiderados como: as características químicas e toxicológicas dos produtos, a concentração ambiental, a dose de exposição do agente químico, vias de absorção, o grau de exposição, tempo e a frequência da exposição, susceptibilidade individual e se a exposição se dá a um único produto ou a vários (GARCIA, 2005).

Uma revisão de literatura demonstrou que dentre 233 pesquisas os efeitos na saúde mais frequentemente estudados incluíram genotoxicidade e os resultados neurocomportamentais e pesticidas organofosforados foram os mais frequentemente examinados. A exposição a pesticidas organofosforados, carbamatos ou a várias classes de pesticidas foi consistentemente associada a marcadores de genotoxicidade e resultados neurocomportamentais adversos, particularmente entre crianças e trabalhadores rurais. A genotoxicidade foi demonstrada por meio de danos ao DNA de tecidos como sangue e células bucais. E as avaliações neurocomportamentais demonstraram efeitos maléficos na habilidade verbal, memória, índice cognitivo, orientação espacial e desenvolvimento motor (ZUÑIGA- VENEGAS *et al.*, 2022).

Resumidamente, de 1993 a 1997, 52.394 aplicadores privados de pesticidas e 4.916 aplicadores comerciais de pesticidas foram recrutados e preencheram questionários de inscrição quando renovaram suas licenças de pesticidas de uso

restrito. Os autores observaram que entre os aplicadores privados, as taxas de incidência para câncer de lábio, câncer de próstata, linfomas de células B em geral, leucemia linfocítica crônica e leucemia mielóide aguda foram significativamente elevados. E entre os cônjuges de aplicadores privados, as taxas de incidência para câncer peritoneal, melanoma, câncer, papilar câncer de tireoide e linfoma folicular também foram significativamente elevados (LERRO *et al.*, 2019).

Sapbamrer e Nata (2014) coletaram dados sobre variáveis demográficas e sintomas de saúde associados à exposição a pesticidas de 182 produtores de arroz (sujeitos expostos) e 122 não agricultores (grupo controle) por meio de entrevistas. Os autores observaram que a maioria dos agricultores pulverizava pesticidas em seus arrozais uma vez por mês ou menos, enquanto 39 agricultores usavam pesticidas uma vez por semana. Quanto à fonte de informação sobre agrotóxicos, 139 agricultores receberam informações sobre agrotóxicos de seus vizinhos contra 107 que souberam de agrotóxicos pela televisão, ou seja, nenhum foi por meio de conhecimento técnico. Dentre 19 sintomas citados, houve a prevalência de dificuldade respiratória e dor no peito que foi significativamente maior nos agricultores do que nos controles.

Peiris-John *et al.* (2005) realizaram um estudo com 25 agricultores que pulverizam regularmente pesticidas organofosforados que foram recrutados aleatoriamente entre 300 agricultores do esquema de irrigação. 22 pescadores de água doce que vivem em um raio de 25km de raio de campos agrícolas e provavelmente expostos a organofosforados por deriva de pulverização ambiental foram selecionados aleatoriamente entre 100 pescadores na área. 40 pescadores marinhos que vivem longe de áreas agrícolas foram recrutados como grupo de controle. A capacidade vital forçada (CVF) e o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) foram medidos por espirometria. Como resultados, os pesquisadores evidenciaram que a relação CVF foi menor nos agricultores em comparação com os controles. O VEF_1 foi menor nos agricultores em comparação com os controles. Nos pescadores, a diminuição das relações CVF e VEF_1 após a exposição aos agrotóxicos, não foi significativa. Portanto, a exposição ocupacional ao OP resulta em disfunção pulmonar restritiva, fenômeno não observado após a exposição ambiental.

Vale ressaltar que os riscos à saúde advindos da exposição aos agrotóxicos não são apenas devido a inalação ou o contato físico direto com esses produtos,

mas também por meio do consumo de alimentos contaminados. Para que isso seja monitorado, existe o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) que foi criado em 2001 com o objetivo de avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal que chegam à mesa do consumidor (BRASIL, 2019d).

O último relatório do PARA referente as análises de 2017-2018 evidenciaram que em amostras de arroz foram detectados cerca de 23 agrotóxicos, dentre eles o glifosato (em 18 de 329 amostras), entretanto em concentrações iguais ou menores que o Limite Máximo de Resíduos (LMR) (PARA, 2019). Porém, um alerta vai para as amostras de laranja e manga. Em 382 amostras de laranja foram detectados, em 9, o 2,4-D, entretanto esse herbicida não está autorizado para uso nesse tipo de cultura. O mesmo ocorreu na análise de 350 amostras de manga o qual foram detectados o glifosato, em 7, sendo que o herbicida também não é autorizado para o uso nessa determinada plantação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa de caráter experimental, transversal e de abordagem quantitativa.

3.1 Aspectos de natureza ética

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para uso dos Animais da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) sob n° 5684 e foi realizado de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (USA).

3.2 Caracterização da amostra

Para determinar o tamanho amostral mínimo para comparação entre escores para 8 grupos, utilizou-se o pacote “pwr”, disponível no Programa R para cálculo de tamanhos amostrais para condução de Análise de variância (CHAMPELY, 2018; TEAM, 2019). Após obter-se o número mínimo de elementos por amostra, adicionou-se 15% a mais de elementos por amostra para adaptá-las a uma possível distribuição não paramétrica (BEAVER; LEHMANN, 2006) utilizou-se os seguintes parâmetros:

- a.) Poder do teste = 80%
- b.) Nível de significância = 5%
- c.) Número de grupos a serem comparados = 8
- d.) Tamanho do efeito (D de Cohen) = 0,50

A partir destes dados concluiu-se serem necessários, no mínimo 12 elementos por grupo. Adicionando-se 15% a mais de elementos, optou-se por utilizar 14 animais por grupo.

Portanto, para a realização do estudo, foram utilizados 112 ratos Wistar adultos machos (300-450g), fornecidos pelo Biotério Central da UNOESTE, alocados em 24 gaiolas plásticas coletivas (5 animais por gaiola e uma gaiola com 4 animais) medindo 600 X 415 milímetros, a temperatura média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07:00 as 19:00 horas (período claro) e 19:00 as 07:00 horas (período escuro). Foram divididos 56 ratos que foram expostos por via oral e 56 ratos expostos por via inalatória ao herbicida glifosato.

Os gastos com os materiais necessários para a pesquisa foram arcados pelos pesquisadores.

Parte do estudo foi realizado com materiais previamente coletados e que encontravam-se armazenados no laboratório de anatomia patológica localizado no Bloco H, campus I, da Universidade do Oeste Paulista de Presidente Prudente-SP. Esses materiais tratam-se de tecidos pulmonares emblocados em parafinas de 40 ratos Wistar adultos machos expostos por via inalatória ao herbicida 2,4-D e 40 ratos expostos por via oral ao 2,4-D, os quais foram expostos nas mesmas condições que ocorreu a exposição ao herbicida glifosato. Os materiais coletados fazem parte do projeto intitulado "EXPOSIÇÃO CRÔNICA VIA INALATÓRIA E VIA ORAL AO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D) - AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO MUTAGÊNICO" aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o protocolo 3761.

Os resultados do hemograma dos ratos expostos por via inalatória ao herbicida 2,4-D também já foram analisados e publicados previamente (CAVALLIERI *et al.*, 2021) e serão utilizados para comparar com os resultados encontrados nos ratos expostos por via inalatória ao glifosato.

3.3 Protocolo de exposição inalatória e oral ao herbicida glifosato

O protocolo de exposição contou com duas caixas (32 x 24 x 32 cm) (Figura 1), cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star®. As concentrações do herbicida foram administradas após diluídas em 10 ml de água destilada. Todos os grupos foram expostos por um tempo aproximado de 15 minutos diários, de segunda à sexta-feira, por um período de 180 dias (exposição crônica), sendo divididos 14 animais para cada grupo.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 8 grupos, de acordo com a tabela 1:

Tabela 1 – Divisão dos animais por grupo de diferentes concentrações do herbicida Glifosato e formas de exposição (inalatória e oral).

Grupo experimental	Sigla	Concentração de glifosato*
Controle Oral	GCO	Ração nebulizada com 10 ml de água destilada
Controle Inalatório	GCI	Inalação com 10 ml de água

		destilada
Baixa Concentração Oral	GBCO	Ração nebulizada com 187,17 mg/m ³
Baixa Concentração Inalatório	GBCI	Inalação com 187,17 mg/m ³
Média Concentração Oral	GMCO	Ração nebulizada com 312,28 mg/m ³
Média Concentração Inalatório	GMCI	Inalação com 312,28 mg/m ³
Alta Concentração Oral	GACO	Ração nebulizada com 467,63 mg/m ³
Alta Concentração Inalatório	GACI	Inalação com 467,63 mg/m ³

Legenda: *Em miligramas por metros cúbicos (mg/m³), considerando experimento ambientalmente relevante segundo forma de aplicação do produto.

Fonte: Autor

As concentrações utilizadas foram baseadas na recomendação do fabricante para uso agrícola, especificado na bula, do Roundup® (Formulação comercial, Sal de Di-amônio de N-(phosphonomethyl)glycine 445 g/L (44,5% m/v), equivalente ácido de N-(phosphonomethyl)glycine 370 g/L (37,0% m/v) e outros ingredientes 751 g/L (75,1% m/v), Monsanto do Brasil LTDA, São Paulo, Brasil) de acordo com as medidas das caixas em que os animais permaneciam durante a exposição, mimetizando o volume do ambiente, sendo feitos ajustes para a caixa baseado na exposição ambiental (MELLO *et al.*, 2018).

Para a proteção dos pesquisadores, durante o manuseio dos animais para a exposição aos herbicidas, foram utilizadas luvas descartáveis, máscara de proteção respiratória reutilizável com 2 filtros e óculos de proteção.

Todos os animais receberam dieta padrão para animais de laboratório (Primor®) e água *ad libitum*.

A dieta padrão para animais (ração) do grupo exposto por via oral foi nebulizada nas mesmas condições em que os animais foram expostos as nebulizações. A bandeja com as rações de cada grupo foi colocada dentro da caixa que estava acoplada ao nebulizador (Figura 1), individualmente, e na metade da nebulização a bandeja era agitada para misturar as rações e assim a substância atingir todo o alimento dos animais. A exposição das rações foi realizada sempre no dia anterior ao dia do consumo.

Os animais do GC eram alocados e realizavam a nebulização em ambientes separados dos animais dos grupos expostos ao herbicida.

Figura 1- Caixas de inalação



Fonte: O autor

3.4 Coleta dos materiais

Os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (100 a 150 mg/kg do peso corporal) e após anestesia foi coletado 2 ml de sangue de cada animal, por meio de punção intracardíaca, para a confecção do hemograma. O analisador hematológico modelo POCH-100iV DIFF (Sysmex do Brasil Indústria e Comércio LTDA®, Curitiba/PR-Brasil) foi utilizado para analisar as plaquetas, as séries vermelha e branca.

Posteriormente à coleta do sangue foi realizada a eutanásia dos ratos por meio do rompimento da aorta. Após esta etapa foi realizada autópsia para retirada dos pulmões e posterior análise. Para que os pulmões mantivessem sua arquitetura morfológica e pressão constante (20 cmH₂O) foi introduzida na região da traqueia formalina tamponada 10%. O tecido pulmonar foi coletado aleatoriamente de áreas centrais e periféricas dos pulmões de cada animal para o processamento e confecção dos blocos em parafina.

3.5 Análise histopatológica

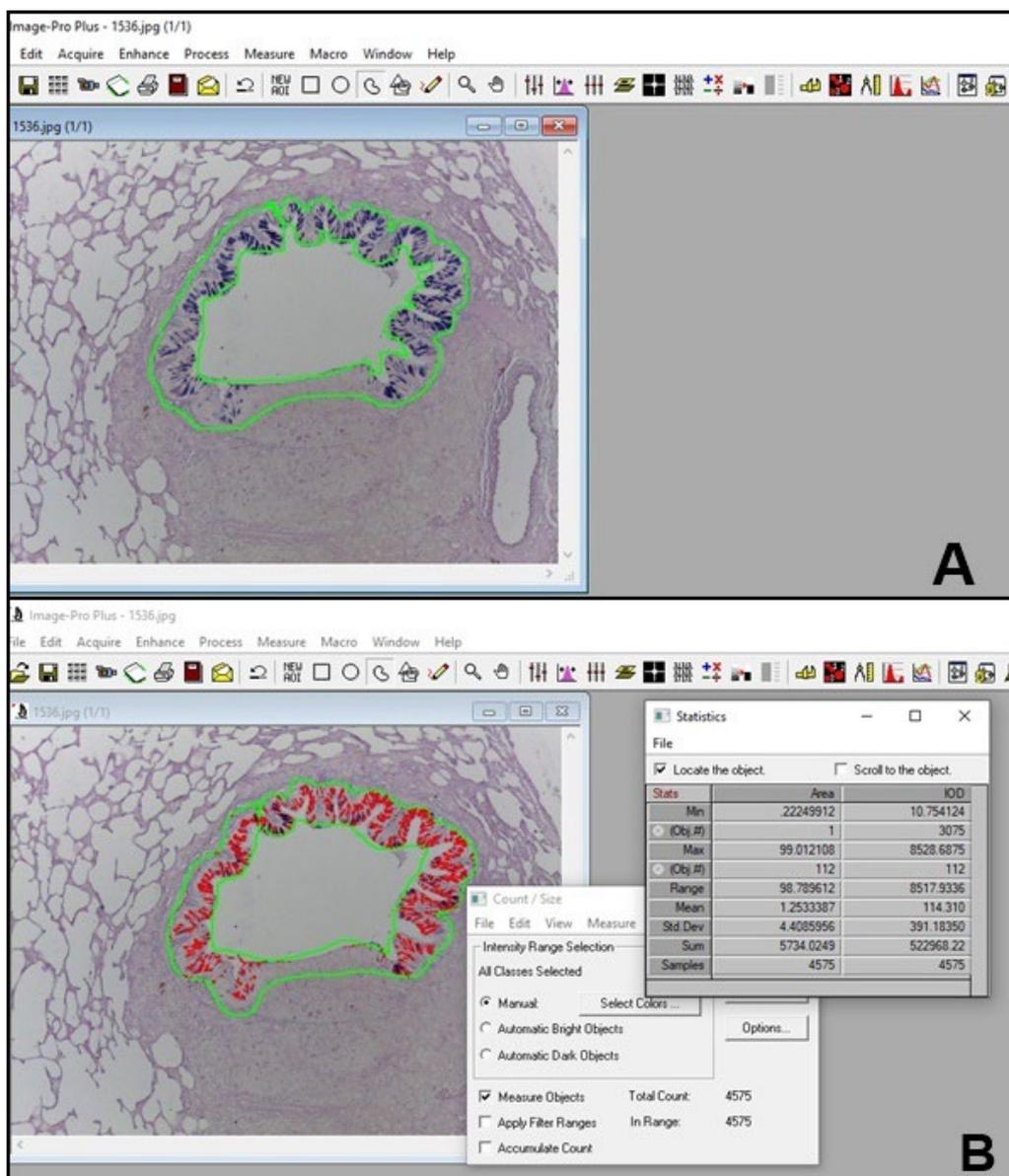
Cortes de 5µm das amostras foram corados com Hematoxilina e Eosina para subsequente seleção das vias aéreas mais apropriadas para avaliação do infiltrado inflamatório, com inclusão no estudo das lâminas com as vias aéreas localizadas em região distal do pulmão e com preservação da arquitetura histológica.

Para a investigação da secreção de muco foram utilizadas preparações com a coloração de PAS - Alcian Blue.

Após a confecção das lâminas, foram capturadas imagens em microscópio com câmera acoplada (Leica ICC50 HD) para analisá-las morfometricamente.

Foi utilizado o software Image-Pro Plus® (Versão 7.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para quantificar as células caliciformes, em toda extensão do corte do tecido pulmonar dos ratos (Figura 2).

Figura 2 – Quantificação das células caliciformes por meio do software Image-Pro Plus



Legenda: A – Representa a seleção da parede dos bronquíolos (verde). B- Representa a quantificação automática das células caliciformes (vermelho).
Fonte: o autor.

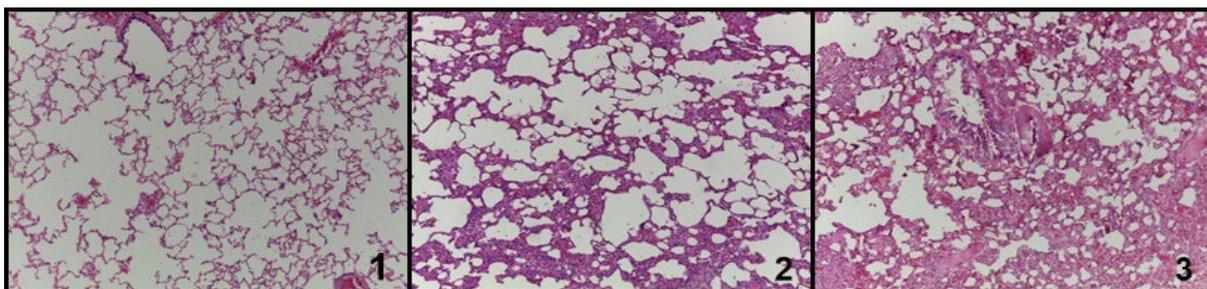
O infiltrado inflamatório foi analisado pelo método semi-quantitativo proposto por Curtis et al. (1991). Essa avaliação classifica o infiltrado inflamatório em escores

de 1 à 3, de acordo com a extensão das células inflamatórias nas imagens das lâminas capturadas (Figura 3), sendo eles:

- 1: Áreas ocasionais revestidas de células inflamatórias
- 2: A maioria das áreas revestida por uma camada fina de células inflamatórias
- 3: A maioria das áreas revestida por uma camada espessa de células inflamatórias

As lâminas contendo os cortes histológicos foram cegadas para que os examinadores não soubessem o grupo analisado e, desta forma, emitissem falsos resultados.

Figura 3 – Imagens representativas dos escores classificatórios do infiltrado inflamatório



Fonte: o autor

3.7 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa PAST 4.03. Foi realizado o Teste de Normalidade Shapiro-Wilk e os dados não-normais foram normalizados em escala logarítmica. Os gráficos foram elaborados pelo programa Graphpad.

Para a análise dos pesos foi utilizado o teste ANOVA de dois fatores considerando o fator concentração (GC, GB, GM, GA) e tempo (antes e após a exposição). O mesmo teste foi realizado para análise das células caliciformes e infiltrado inflamatório, sendo os fatores: dose x via de exposição e dose x herbicida.

Foi utilizado o teste ANOVA de um fator para análise dos resultados do hemograma para comparar as diferentes concentrações dos herbicidas (GC, GB, GM e GA).

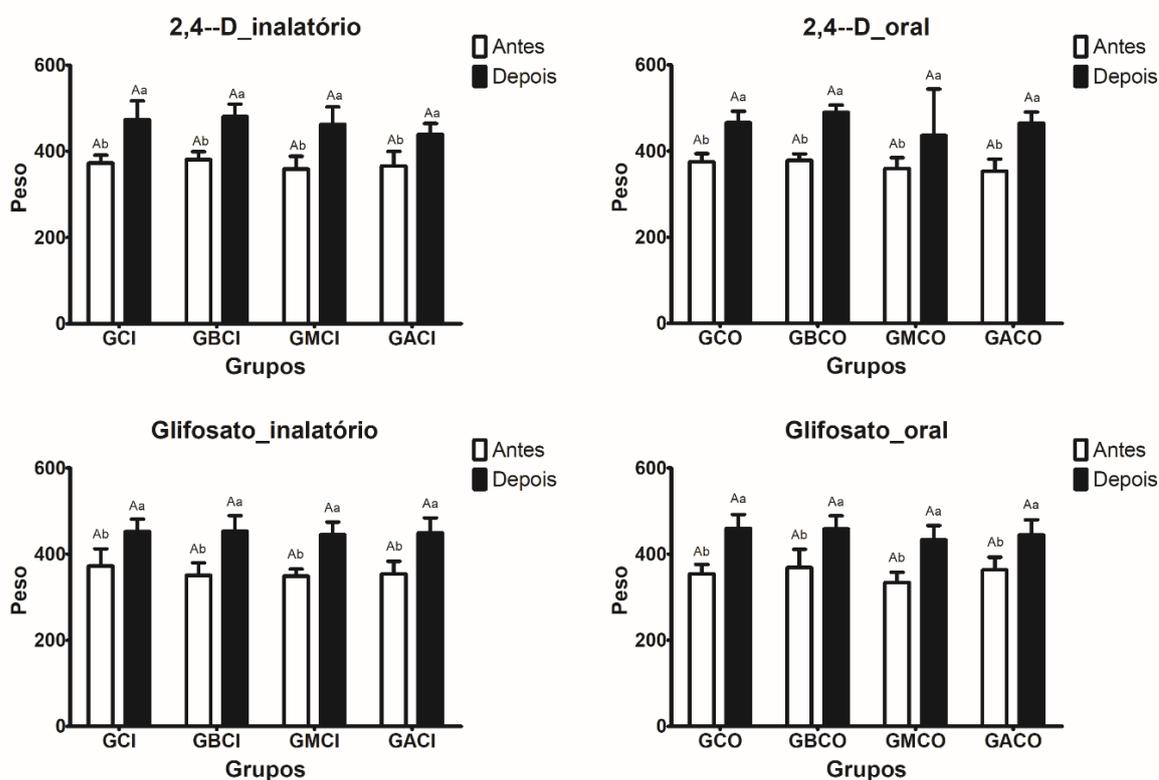
As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p fosse menor que 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Não houve morte de nenhum animal durante o período experimental de exposição crônica inalatória e oral, tanto para o herbicida 2,4-D quanto para o glifosato, até a data da eutanásia.

Na Figura 4 são demonstradas as comparações em relação ao peso dos animais antes e após o período de exposição aos herbicidas, além de comparar os diferentes grupos de concentrações. Como o período experimental ocorreu por 6 meses o esperado era que os animais ganhassem peso, como foi observado nos resultados das análises da Figura 4. Além disso, esse aumento de peso apresentou diferenças estatísticas para todos os grupos independente da concentração, do herbicida e da via de exposição.

Figura 4 – Comparação da média do peso dos animais entre os diferentes grupos das concentrações dos herbicidas glifosato e 2,4-D por via inalatória e oral e o tempo de antes e depois das exposições.



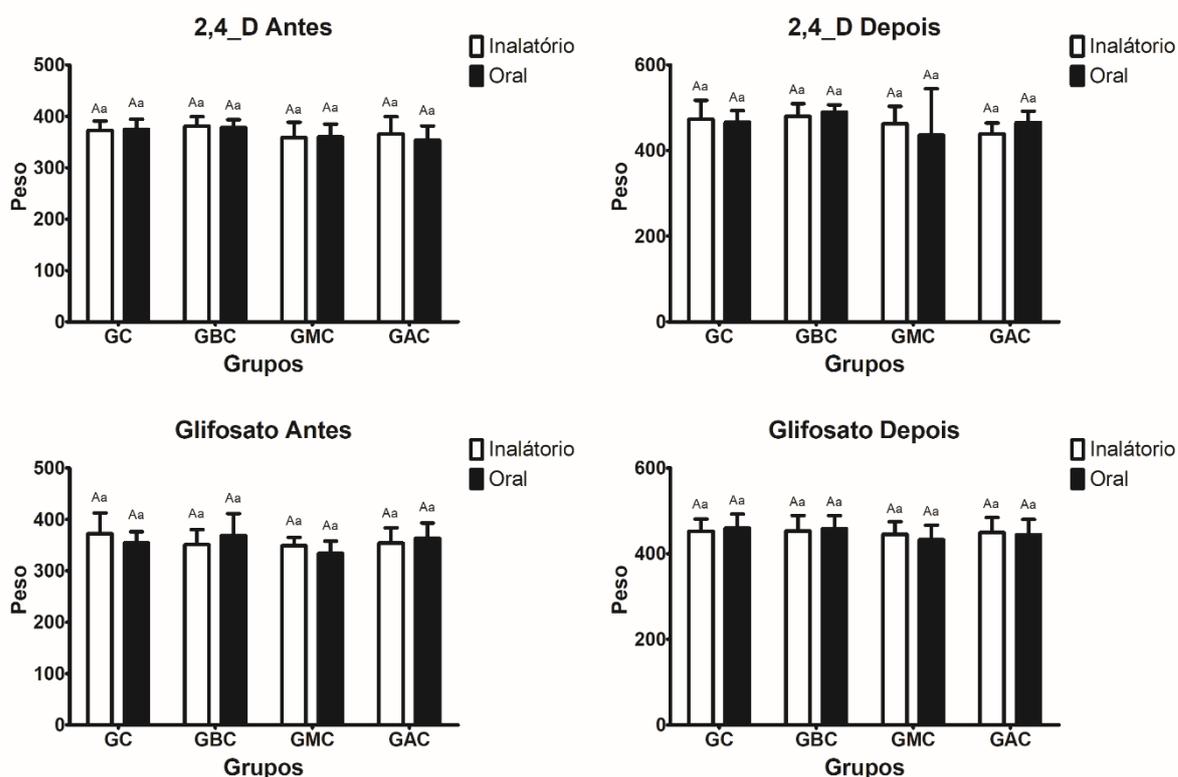
Legenda: Letras maiúsculas diferentes representam a diferença estatística na comparação entre os grupos "Concentração (GC, GBC, GMC e GAC)". Letras minúsculas diferentes representam a diferença estatística na comparação dentro dos grupos "Tempo (antes e depois)".

Resultados apresentados em média (Desvio Padrão). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de dois fatores. Nível de significância de $p < 0,05$.

Fonte: o autor.

Na Figura 5 podemos observar a comparação da variável peso entre as diferentes vias de exposição (inalatória e oral), que não apresentou diferença estatística para nenhum dos herbicidas e diferentes concentrações.

Figura 5 - Comparação da média do peso dos animais entre os diferentes grupos de concentrações dos herbicidas glifosato e 2,4-D e as vias de exposições inalatória e oral.



Legenda: Letras maiúsculas diferentes representam a diferença estatística na comparação entre os grupos "Concentração (GC, GBC, GMC e GAC)". Letras minúsculas diferentes representam a diferença estatística na comparação dentro dos grupos inalatório e oral.

Resultados apresentados em média (Desvio Padrão). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de dois fatores. Nível de significância de $p < 0,05$.

Fonte: o autor.

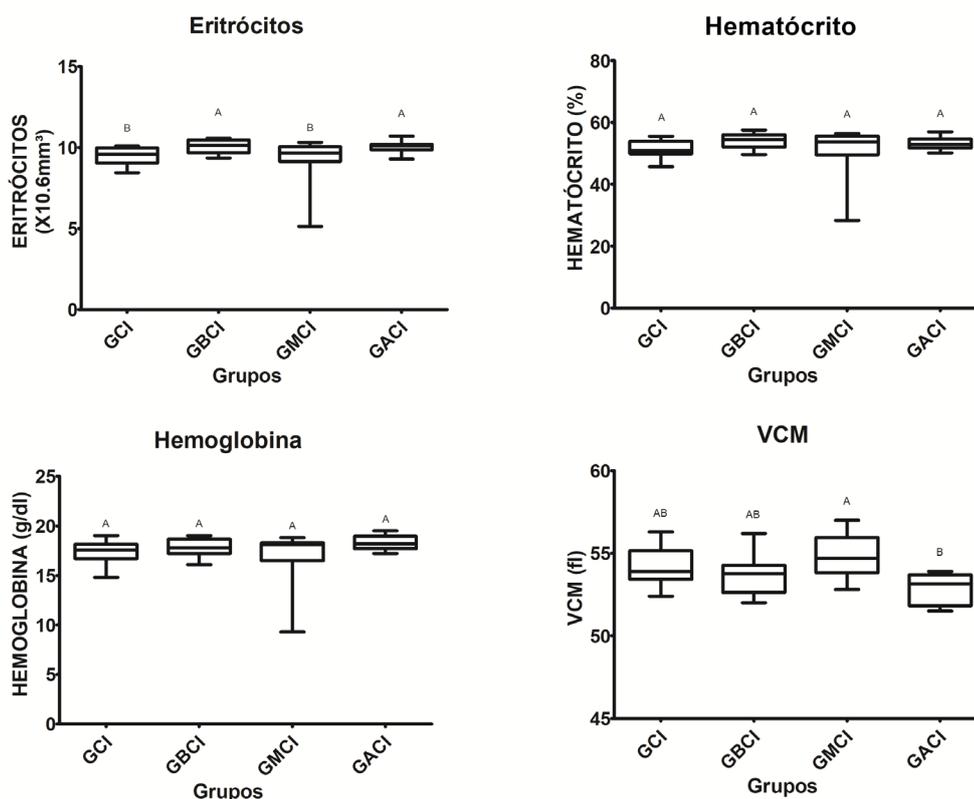
Os resultados das análises do hemograma dos ratos expostos por via inalatória ao 2,4-D encontram-se nas Figuras 6, 7 e 8 e dos ratos expostos por via inalatória ao glifosato são demonstrados nas Figuras 9, 10 e 11.

Os ratos que foram expostos por via oral ao 2,4-D não realizaram hemograma, pois pertenciam ao estudo realizado previamente como descrito na metodologia, portanto a análise para essa variável foi realizada apenas para os grupos inalatórios.

Os animais expostos ao 2,4-D apresentaram valores elevados de eritrócitos comparado aos de referência (Figura 6), sendo que os animais do GBC e GAC estavam com valores significativamente maiores que o GC. Provavelmente o GMC não apresentou essa diferença, pois um animal desse grupo estava com valores de eritrócitos normais.

Outro dado observado com diferença estatística foi para os valores de CHCM dos grupos expostos ao 2,4-D (Figura 8), os quais apresentaram valores reduzidos significativamente nos GBC e GMC em comparação ao GC. Entretanto, os valores de CHCM estavam acima dos valores de referência para os GC e GAC e normais para os GBC e GMC.

Figura 6 – Comparação dos valores de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e VCM entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida 2,4-D expostos por via inalatória.



Legenda: VCM, Volume Corpuscular Médio.

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

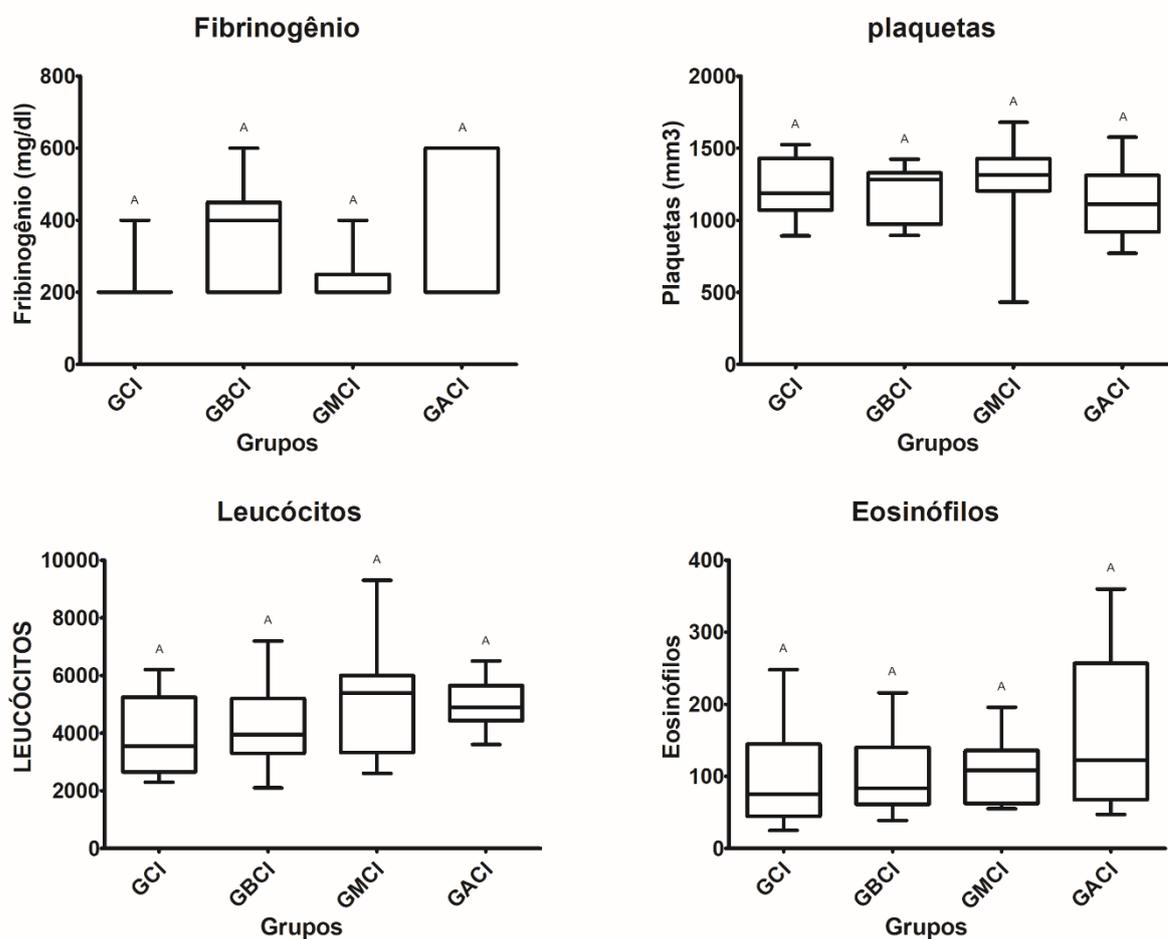
Valores de referência de acordo com Melo et al (2012): Eritrócitos (7,3-8,6). Hematócrito (39,1-48,5).

Hemoglobina (13,2-15,1). VCM (49,1-62,5).

Resultados apresentados em mediana (Intervalo Interquartil). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de um fator. Nível de significância de $p < 0,05$.

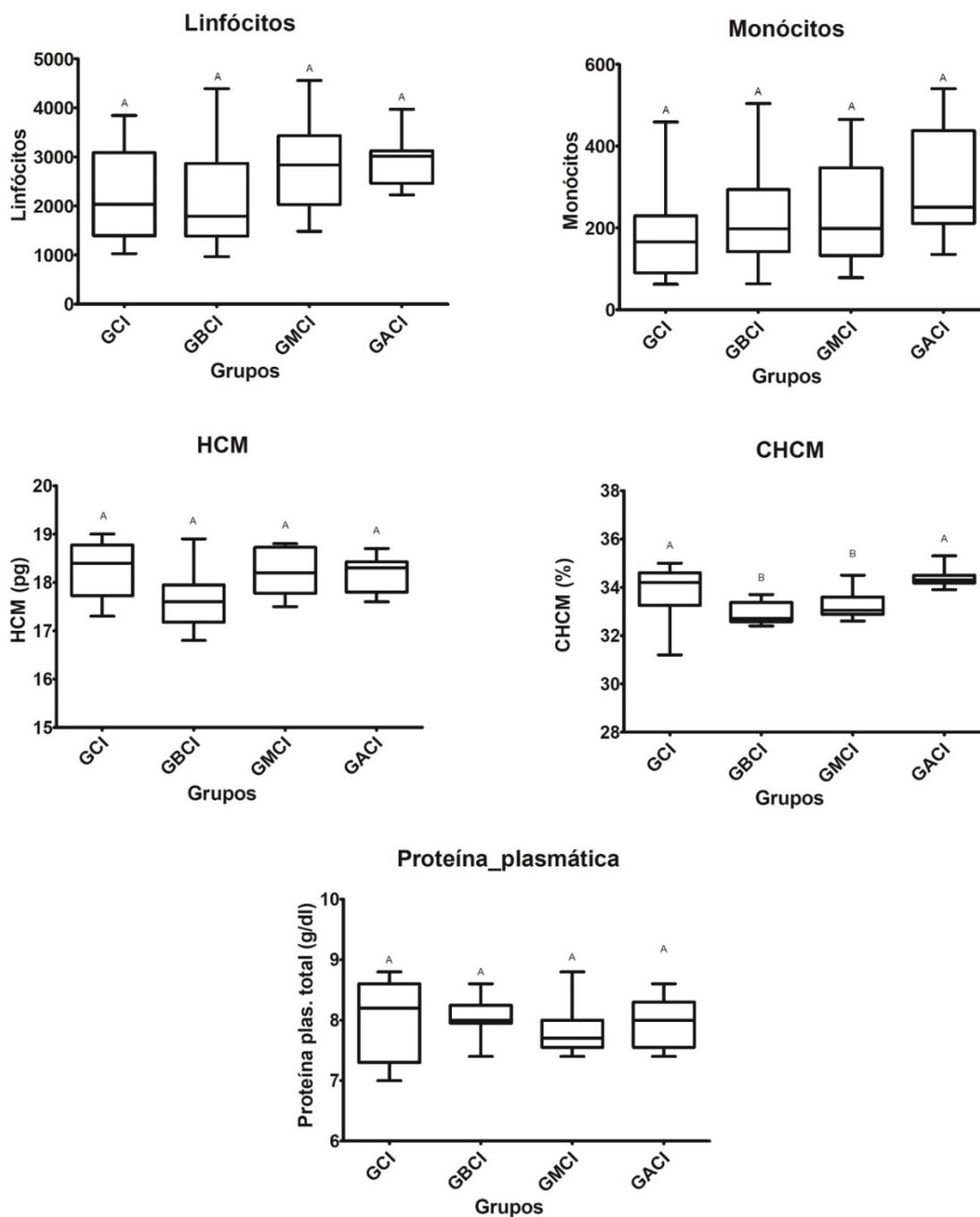
Fonte: o autor.

Figura 7 – Comparação dos valores de fibrinogênio, plaquetas, leucócitos e eosinófilos entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida 2,4-D expostos por via inalatória.



Legenda: Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de referência de acordo com Melo et al (2012): Fibrinogênio (100-300). Plaquetas (s/ref). Leucócitos (4700-12900). Eosinófilos (0-194). Resultados apresentados em mediana (Intervalo Interquartil). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de um fator. Nível de significância de $p < 0,05$.
Fonte: o autor.

Figura 8 – Comparação dos valores de linfócitos, monócitos, HCM, CHCM e proteína plasmática entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida 2,4-D expostos por via inalatória.



Legenda: HCM, hemoglobina corpuscular média. CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média.

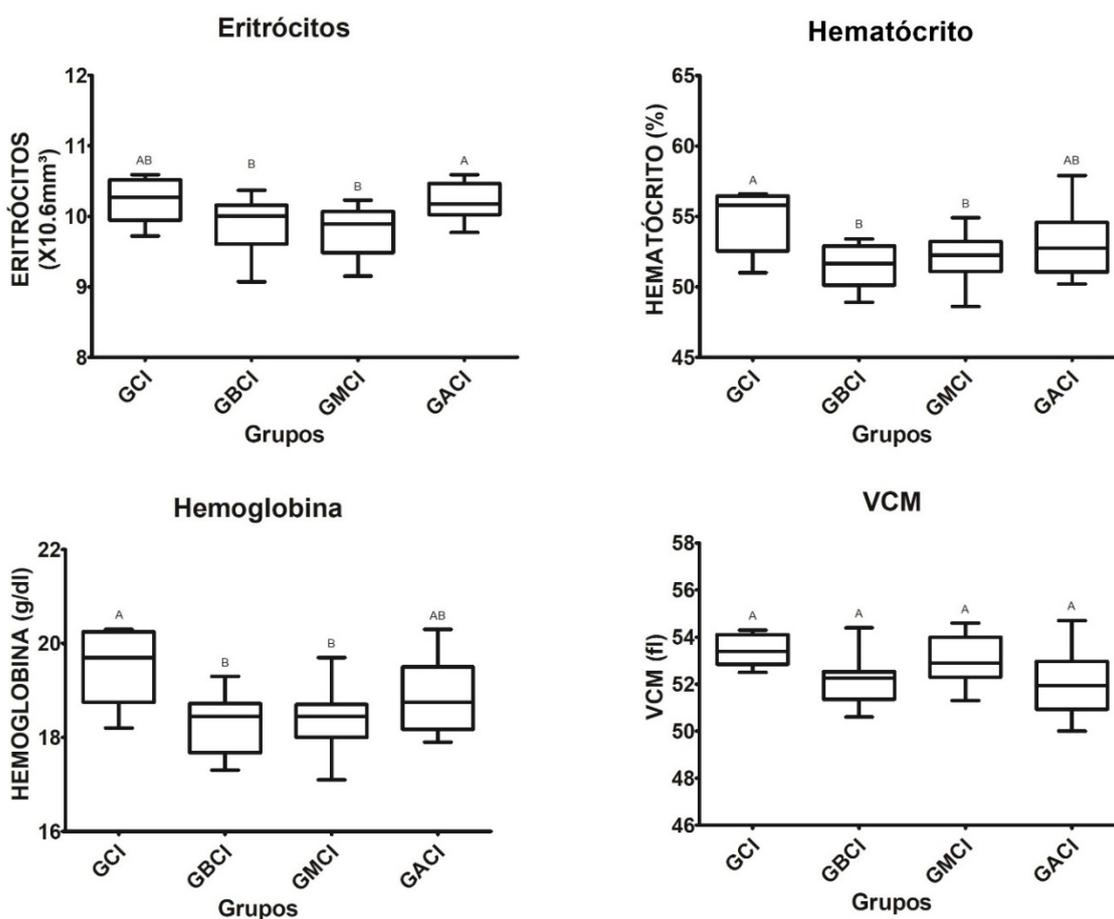
Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Valores de referência de acordo com Melo et al (2012): Linfócitos (1953-9021). Monócitos (0-776). HCM (16,6-18,9). CHCM (29,9-39,9). Proteína Plasmática (6,1-7,1).

Resultados apresentados em mediana (Intervalo Interquartil). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de um fator. Nível de significância de $p < 0,05$.

Fonte: o autor. Os animais expostos de forma inalatória ao glifosato não apresentaram alterações significativas em relação aos eritrócitos e CHCM, entretanto apresentaram em relação a outras variáveis das células vermelhas: hematócrito e hemoglobina. Os valores de hematócrito estavam elevados em todos os animais do estudo do glifosato, entretanto os do GBC e GMC estavam significativamente reduzidos em relação ao GC. O mesmo resultado foi observado na análise da hemoglobina (Figura 9).

Figura 9 – Comparação dos valores de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e VCM entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida glifosato expostos por via inalatória.



Legenda: VCM, Volume Corpuscular Médio.

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Valores de referência de acordo com Melo et al (2012): Eritrócitos (7,3-8,6). Hematócrito (39,1-48,5).

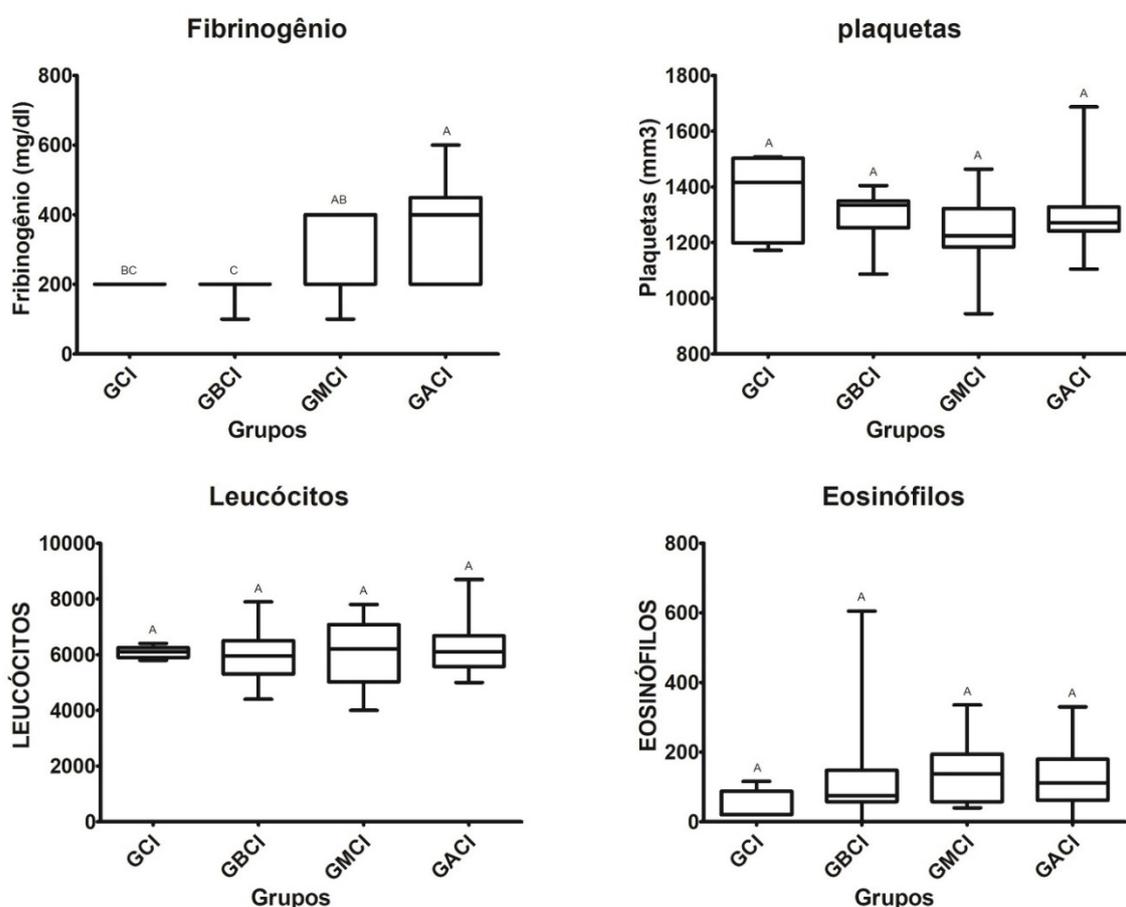
Hemoglobina (13,2-15,1). VCM (49,1-62,5).

Resultados apresentados em mediana (Intervalo Interquartil). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de um fator. Nível de significância de $p < 0,05$.

Fonte: o autor.

Como pode ser observado na Figura 10 houve diferença estatística para os valores de fibrinogênio que estavam normais no GC e de GBC e elevados no GAC. O GMC também apresentou valores de fibrinogênio elevados, porém sem diferença estatística.

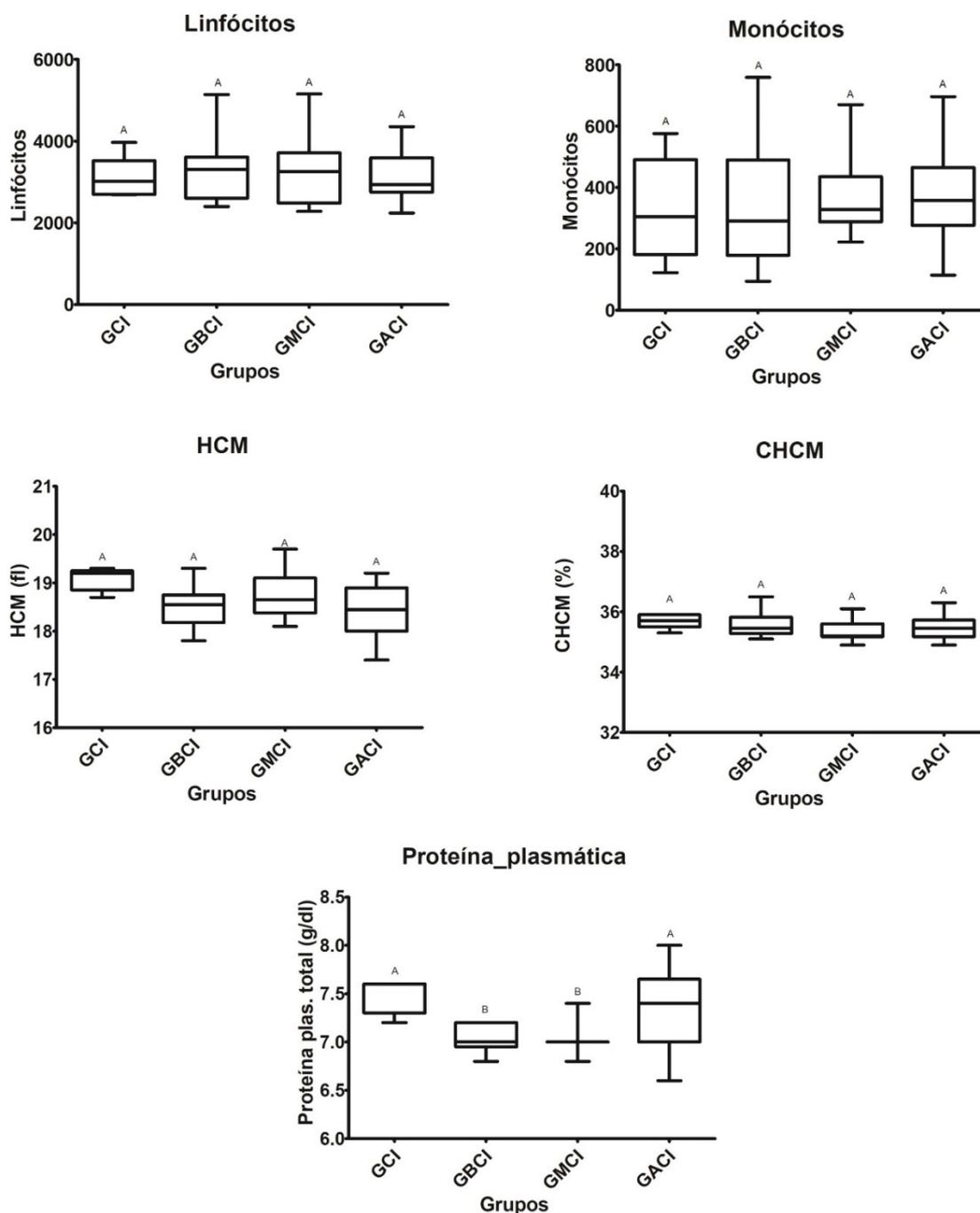
Figura 10 – Comparação dos valores de fibrinogênio, plaquetas, leucócitos e eosinófilos entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida glifosato expostos por via inalatória.



Legenda: Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de referência de acordo com Melo et al (2012): Fibrinogênio (100-300). Plaquetas (s/ref). Leucócitos (4700-12900). Eosinófilos (0-194). Resultados apresentados em mediana (Intervalo Interquartil). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de um fator. Nível de significância de $p < 0,05$.
Fonte: o autor.

A proteína plasmática apresentou diferença estatística dos GBC e GMC quando comparados ao GC (Figura 11), porém os valores desse parâmetro nos GC e GAC estavam elevados e nos GBC e GMC estavam dentro dos valores de referência.

Figura 11 – Comparação dos valores de linfócitos, monócitos, HCM, CHCM e proteína plasmática entre os grupos de diferentes concentrações do herbicida glifosato expostos por via inalatória.



Legenda: HCM, hemoglobina corpuscular média. CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média.

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Legenda: Valores de referência de acordo com Melo et al (2012): Linfócitos (1953-9021). Monócitos (0-776). HCM (16,6-18,9). CHCM (29,9-39,9). Proteína Plasmática (6,1-7,1).

Resultados apresentados em mediana (Intervalo Interquartil). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de um fator. Nível de significância de $p < 0,05$.

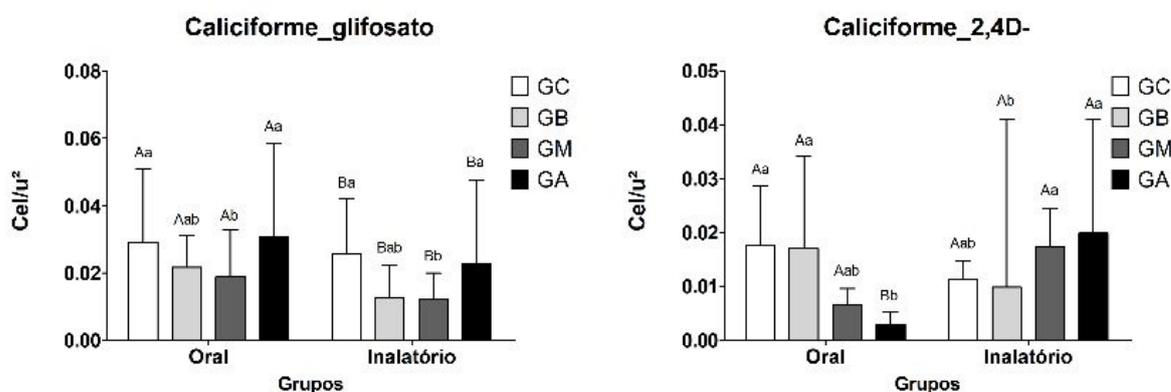
Fonte: o autor.

De acordo com a Figura 12 foi observado que houve diferença estatística entre os animais expostos por via oral comparados aos expostos por via inalatória em todos os grupos de diferentes concentrações do herbicida glifosato, com maior quantidade de células calciformes encontrada nos animais do grupo oral. Essa diferença foi observada apenas nos animais do GAC expostos ao 2,4-D, porém diferente dos ratos expostos ao glifosato, a quantidade de células calciformes estava significativamente reduzida no grupo oral comparado ao inalatório.

Tanto para os animais expostos por via oral quanto por via inalatória ao glifosato foi observada diferença estatística do GMC comparado ao GC e GAC, porém o GMC estava com menor quantidade de células calciformes em relação aos demais (Figura 12).

Já para os animais expostos ao 2,4-D foi observada diferença estatística do GAC do grupo oral comparado ao GC e GBC, porém da mesma forma que no glifosato, o GAC estava com valores reduzidos em comparação aos grupos citados. Para os animais expostos por via inalatória não foi encontrada diferença em comparação ao GC.

Figura 12 – Comparação da quantificação das células calciformes dos pulmões entre os animais expostos por via inalatória e oral de cada herbicida (Glifosato e 2,4-D).



Legenda: Resultados apresentados em média (Desvio Padrão). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de dois fatores. Nível de significância de $p < 0,05$.

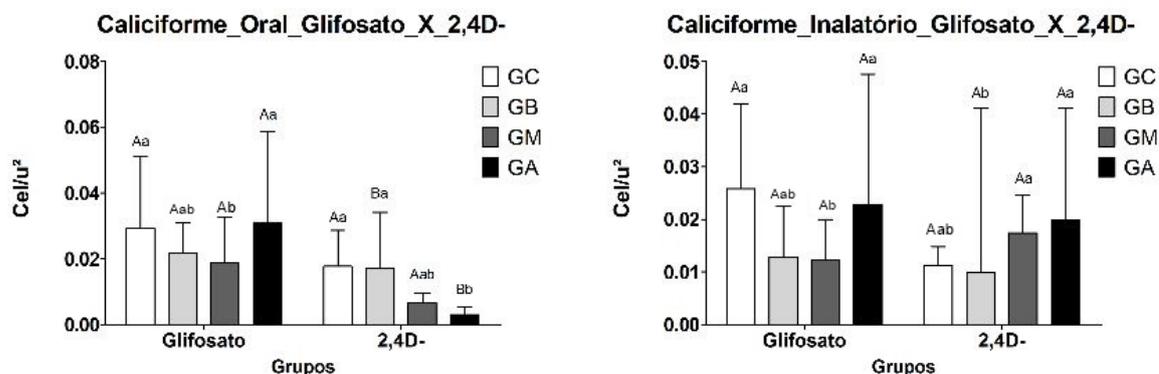
Letras maiúsculas representam a comparação do grupo exposto por via oral com o inalatório e letras minúsculas representam a comparação dentro do grupo, ou seja, entre GC, GB, GM e GA. Letras diferentes representam diferença estatística.

Fonte: o autor.

Em relação aos animais expostos por via oral houve diferença estatística de todos os grupos expostos ao glifosato comparado aos animais do GBC e GAC expostos ao 2,4-D, visto que os animais expostos ao glifosato apresentaram maiores quantidades de células caliciformes, inclusive no GC. Já para os animais expostos por via inalatória não houve diferença estatística quando comparado os grupos expostos ao glifosato com os do 2,4-D (Figura 13).

As Figuras 14 e 15 demonstram amostras de imagens de algumas lâminas (uma de cada grupo de exposição) utilizadas para a quantificação das células caliciformes dos pulmões dos ratos utilizados no estudo.

Figura 13 – Comparação da quantificação das células caliciformes dos pulmões entre os animais expostos por via oral ao glifosato e ao 2,4-D e os expostos por via inalatória aos herbicidas.

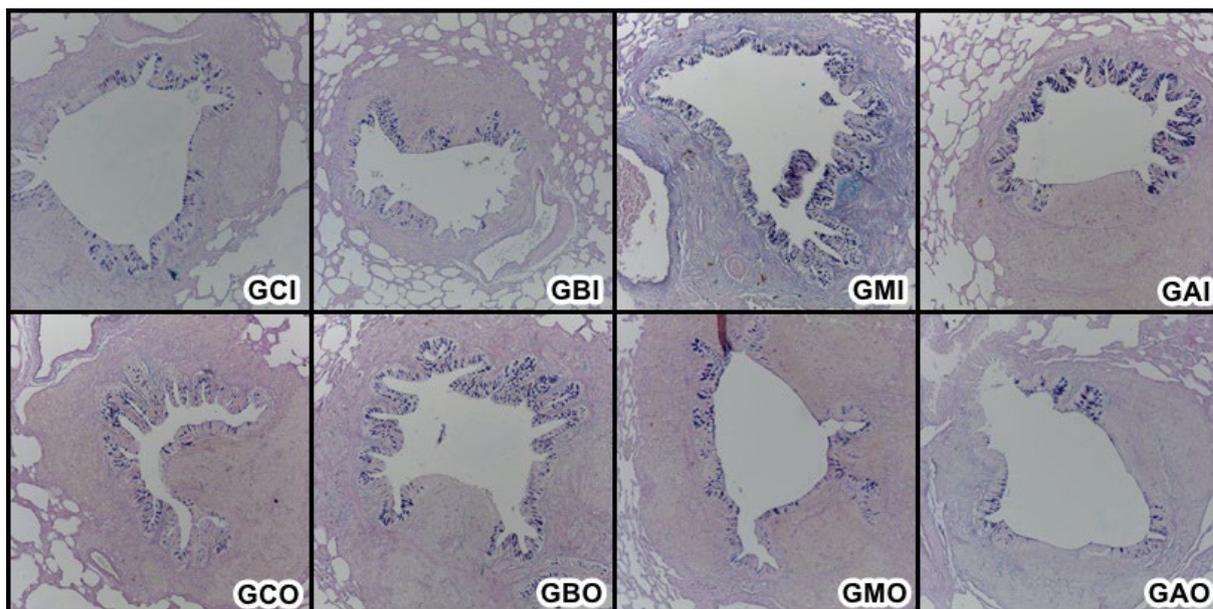


Legenda: Resultados apresentados em média (Desvio Padrão). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de dois fatores. Nível de significância de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas representam a comparação do grupo exposto ao glifosato e ao 2,4-D e letras minúsculas representam a comparação dentro do grupo de cada herbicida, ou seja, entre GC, GB, GM e GA. Letras diferentes representam diferença estatística.

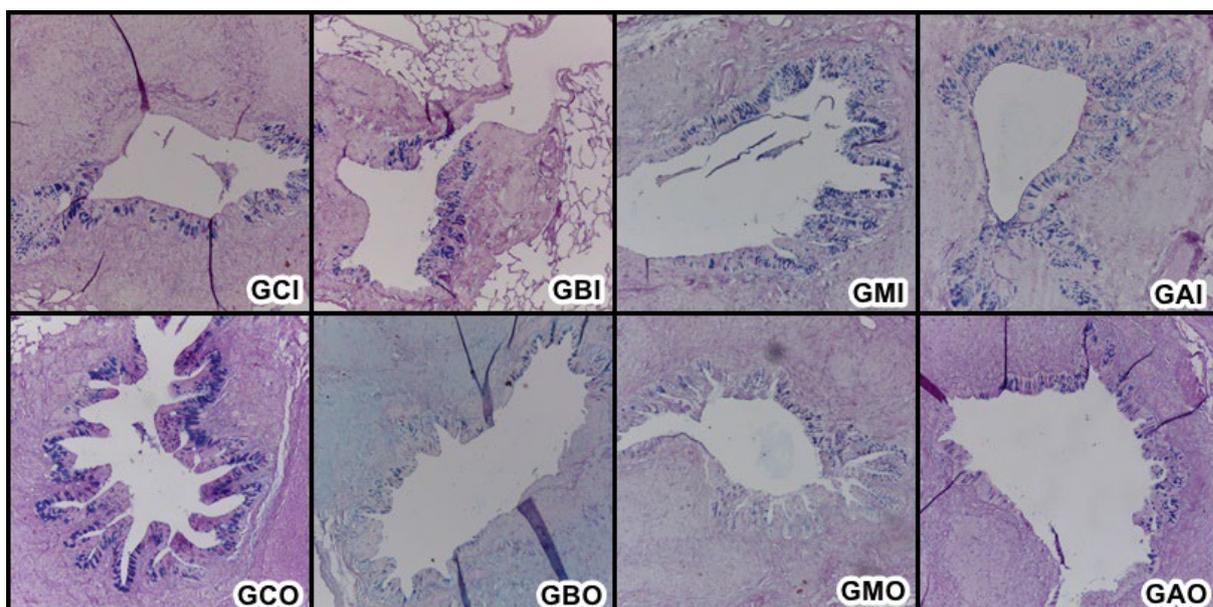
Fonte: o autor.

Figura 14 – Imagens de lâminas dos pulmões dos ratos expostos ao 2,4-D, de cada grupo, utilizadas para a quantificação das células caliciformes.



Fonte: o autor.

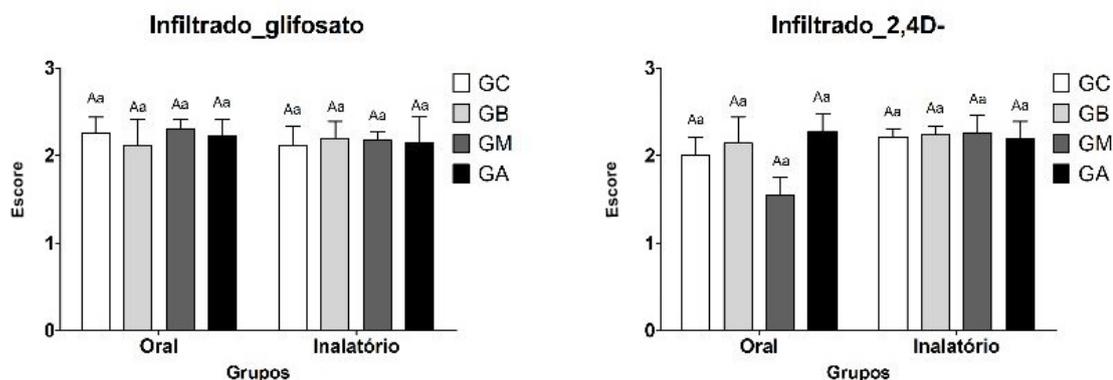
Figura 15 – Imagens de lâminas dos pulmões dos ratos expostos ao glifosato, de cada grupo, utilizadas para a quantificação das células caliciformes.



Fonte: o autor

Tanto para os ratos expostos ao glifosato quanto ao 2,4-D, em ambas as vias de exposição, não foi observada diferença estatística em relação ao infiltrado inflamatório (Figura 16).

Figura 16 – Comparação do escore do infiltrado inflamatório dos pulmões entre os animais expostos por via oral e inalatória de cada herbicida (Glifosato e 2,4-D).



Legenda: Resultados apresentados em média (Desvio Padrão). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de dois fatores. Nível de significância de $p < 0,05$.

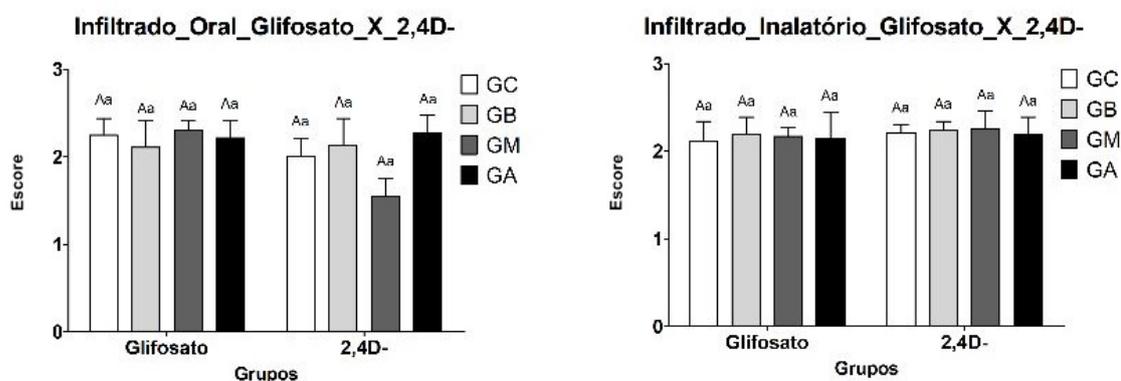
Letras maiúsculas representam a comparação dos grupos expostos por via inalatória e oral de cada herbicida e letras minúsculas representam a comparação dentro do grupo da via de exposição, ou seja, entre GC, GBC, GMC e GAC. Letras diferentes representam diferença estatística.

Fonte: o autor.

Assim como na Figura 16, também não houve diferença estatística quando comparado ambos os grupos dos herbicidas, tanto para exposição inalatória, quanto para exposição oral (Fig. 17).

As Figuras 18 e 19 representam exemplos de imagens das lâminas dos pulmões dos animais de cada grupo, utilizadas para classificação do infiltrado inflamatório.

Figura 17 – Comparação do escore do infiltrado inflamatório dos pulmões entre os animais expostos por via oral ao glifosato e ao 2-4-D e os animais expostos por via inalatória aos herbicidas.



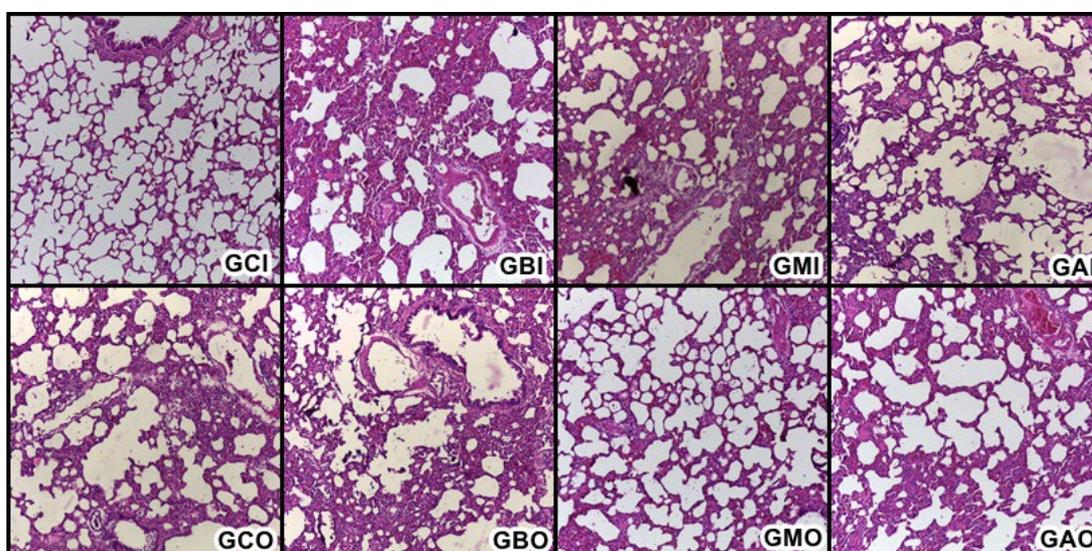
Legenda: Resultados apresentados em média (Desvio Padrão). Valor de p obtido pelo Teste de ANOVA de dois fatores. Nível de significância de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas representam a comparação dos grupos expostos ao glifosato e ao 2,4-D e letras minúsculas representam a comparação dentro do grupo de cada herbicida, ou seja, entre GC, GB, GM e GA. Letras diferentes representam diferença estatística.

Fonte: o autor.

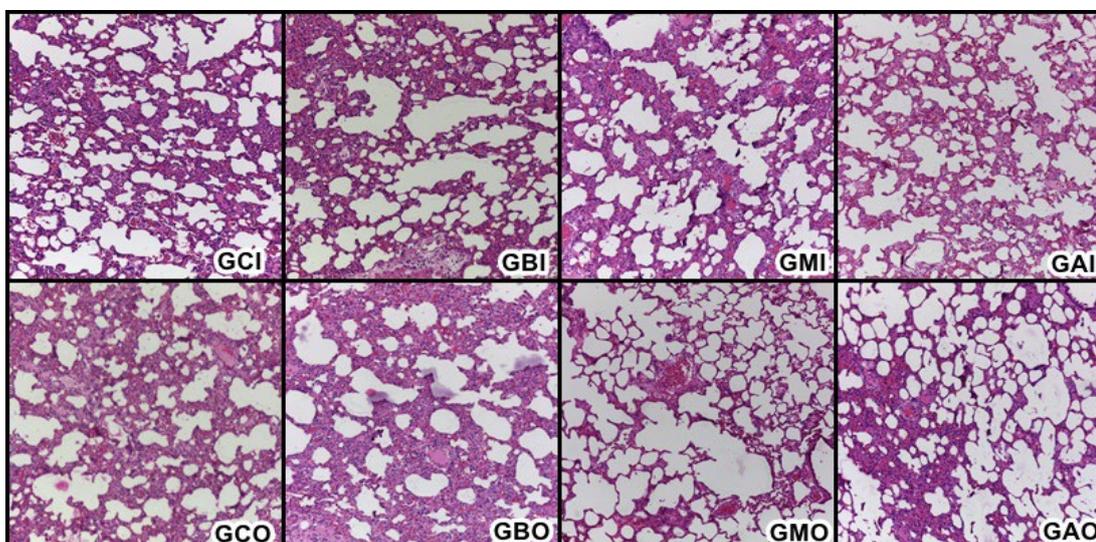
Como podemos observar nas Figuras 18 e 19 a quantidade de infiltrado inflamatório estão similares nas imagens selecionadas, independente da concentração dos herbicidas, em concordância com a análise estatística representada nas Figuras 16 e 17.

Figura 18 – Imagens de lâminas dos pulmões dos ratos expostos ao 2,4-D, de cada grupo, utilizadas para classificação do infiltrado inflamatório.



Fonte: o autor.

Figura 19 – Imagens de lâminas dos pulmões dos ratos expostos ao glifosato, de cada grupo, utilizadas para análise do infiltrado inflamatório.



Fonte: o autor.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram, primeiramente, que as concentrações utilizadas, de ambos os herbicidas, durante o tempo de exposição de 6 meses não tiveram efeito letal. Similar a maioria dos estudos realizados previamente com o 2,4-D e glifosato, tanto para exposição oral (STURTZ *et al.*, 2008; SHAFEEQ; MAHBOOD, 2021; MESSAGE *et al.*, 2021; INGARAMO *et al.* 2022), quanto para a inalatória (MELLO *et al.*, 2018).

Os herbicidas também não demonstraram efeitos sobre o peso dos animais, visto que ganharam peso na mesma proporção, independente da via de exposição ou das concentrações utilizadas. Em controvérsia, Shafeeq e Mahbood (2021) observaram redução significativa do peso de ratos expostos por via oral a 150mg/kg de 2,4-D, entretanto, diferente da presente pesquisa, os animais recebiam o herbicida por via oral de forma direta (gavage) e não por meio de ração contaminada. Além disso, os autores observaram também sintomas severos de intoxicação em 4 semanas de exposição, tais como: anorexia, rigidez muscular, incapacidade de ficar em pé, queda de pelo e hemorragia nasal. Cabe ressaltar que durante todo o período experimental da presente pesquisa, não foi observado nenhum sinal similar a intoxicação dos animais.

Já em relação ao glifosato, uma pesquisa anterior com exposição subcrônica, por 75 dias, inalatória e oral com o mesmo protocolo de exposição do presente trabalho, também não observou relação das exposições na variável peso (SERRA *et al.*, 2021). Já para a exposição oral por gavage em diferentes doses Benedetti (2003) observou redução significativa do ganho de peso em todos os grupos comparado ao grupo controle, diferente do encontrado na presente pesquisa, o que demonstrou, assim como o 2,4-D, que a exposição oral direta do glifosato traz maior toxicidade comparada as outras formas de exposição.

As análises do hemograma dos ratos expostos aos herbicidas 2,4-D e glifosato, por via inalatória, apresentaram algumas alterações significativas.

A eritrocitose (aumento dos eritrócitos), observada nos animais expostos ao 2,4-D, por si só, na maioria dos casos, não significa grandes preocupações, entretanto há relatos que doenças como a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) pode influenciar no surgimento dessa alteração hematológica causada pela hipoxemia advinda da própria patologia (RUIZ; GARCÍA, 2009). Porém, como será

discutido posteriormente, não houve evidência de alterações pulmonares nos ratos expostos por via inalatória ao 2,4-D no presente trabalho.

Devido ao aumento de CHCM no GC e GAC, observado nos ratos expostos ao 2,4-D, não ficou claro se seria um padrão dos ratos estudados e o 2,4-D foi capaz de reduzir esses níveis, ou se não teve relação com a exposição ao herbicida, visto que Fareed *et al.* (2013) demonstraram anteriormente que a exposição a pesticidas ocasionou uma redução dos valores de CHCM e nos grupos com diferença estatística, os valores não estavam reduzidos, mas normais. Já para os valores elevados nos grupos GC e GAC de CHCM há algumas justificativas que podem ter ocorrido, porém não foram avaliadas, tais como: amostras hemolisadas, aglutinação de eritrócitos, esferocitose hereditária e valores de sódio reduzidos (ROSENFELD, 2012).

Nos animais expostos ao glifosato foi observado a redução do hematócrito e da hemoglobina (Figura 9). No hemograma a redução desses parâmetros é um fator alarmante, principalmente na rotina clínica em humanos, visto que este resultado está frequentemente associado à presença de anemia (LOPEZ *et al.*, 2016). Previamente, já foi demonstrada que a exposição de trabalhadores a agrotóxicos ocasiona a redução dos níveis de hematócrito e hemoglobina no sangue quando comparado ao grupo controle, mesmo estando com valores dentro da normalidade, porém não foi possível determinar a dose de exposição e os tipos de agrotóxicos utilizados por essa população (PATIL; PATIL; GOVINDWAR, 2003).

Estudos de exposição por via inalatória ao glifosato e seus efeitos no hemograma não foram encontrados até o momento, entretanto uma pesquisa experimental com diferentes doses do herbicida em exposição por via oral (gavage) demonstrou que as doses média e alta do herbicida em 75 dias foram capazes de reduzir significativamente os níveis de hematócrito e hemoglobina no sangue dos ratos comparado ao grupo controle (BENEDETTI, 2003). Sendo assim, os efeitos do herbicida nesses parâmetros podem ocorrer tanto por via inalatória quanto oral, visto que os resultados do estudo de Benedetti (2003) foram similares aos encontrados pela presente pesquisa.

Outra diferença estatística encontrada na análise do hemograma dos ratos expostos por via inalatória ao glifosato foi em relação a proteína plasmática total que foi encontrada em nível elevado nos GC e GAC e normais nos GBC e GMC. Mesmo resultado encontrado para os valores de CHCM nos grupos expostos ao 2,4-D

descritos anteriormente. Desta forma, não é possível associar esses dados ao herbicida visto que o GC apresentou resultados elevados e os grupos com diferenças (GBC e GMC) apresentaram resultados normais.

Um dos motivos que pode aumentar a produção de proteína plasmática total nos animais é a desidratação ou desnutrição (SAMPAIO *et al.*, 2012) sabemos que não houve perda de peso dos animais durante o estudo, portanto não ocorreu a desnutrição dos mesmos, entretanto em relação a desidratação não foi realizado o controle do consumo de água dos animais e, portanto, não podemos descartar essa hipótese, sendo este considerado um fator limitante do estudo.

Um dado muito relevante a ser destacado na presente análise é de que os valores de fibrinogênio estavam normais no GC e elevados, com diferença estatística, no GAC.

O fibrinogênio elevado pode indicar uma fase aguda de inflamação, além disso, há indícios de que os níveis de fibrinogênio podem estar relacionados a doenças cardiovasculares, mais precisamente, a trombose arterial ou venosa (LIND *et al.*, 2001). Portanto, essa variável em nível elevado no GAC no presente trabalho, traz o alerta para possíveis doenças cardiovasculares causadas pela exposição inalatória a altas doses do glifosato. Entretanto, são necessárias análises mais específicas para determinar a saúde cardiovascular em expostos a esse herbicida.

A associação da exposição, tanto oral quanto inalatória, ao glifosato com doenças cardiovasculares foi demonstrada por Maia *et al.* (2021) que, após 75 dias de exposição, observaram estrias gordurosas (lesão inicial da aterosclerose) na maioria dos animais expostos ao glifosato independente da via de exposição e dose utilizada. Desta forma, os resultados se complementam e é provável que a exposição ao glifosato traga danos à saúde cardiovascular dos sujeitos expostos.

Em relação a saúde pulmonar dos animais, quantificamos as células calciformes, pois a hiperplasia dessas células leva a hipersecreção de muco, que está intimamente relacionada a DPOC (AIKAWA *et al.*, 1989). Além disso, classificamos o infiltrado inflamatório que, quando presente, pode estar associado a diversas patologias pulmonares, tais como doenças infecciosas, neoplasias, toxicidade por drogas, hemorragia alveolar, bronquiolite obliterante, entre outras (WARNER; WARNER; DIVERTIE, 1998).

Porém, tanto os animais expostos ao glifosato quanto ao 2,4-D, independente da via de exposição (oral e inalatória), não apresentaram aumento de

células dos grupos expostos aos agrotóxicos quando comparados aos GC. E em alguns casos foi observado até mesmo redução, em vez de aumento, em relação ao GC (Figura 13). Portanto, não foi possível atribuir hiperplasia de células caliciformes dos pulmões à exposição aos herbicidas estudados, bem como aumento do infiltrado inflamatório.

Um estudo o qual caracterizou a absorção e destino biológico do glifosato em aplicadores evidenciou que o glifosato é rapidamente eliminado do corpo, dentro de 24 horas após a aplicação, e além disso, os níveis de glifosato na urina são maiores no grupo por exposição dérmica do que no grupo por inalação (PIERCE *et al.*, 2020). Com esses dados, podemos inferir que a eliminação rápida do herbicida contribui para o não surgimento de alterações pulmonares, entretanto são suficientes para causar alterações hematológicas, como observadas no presente trabalho.

A absorção dos agrotóxicos se dá principalmente pela pele e pelo sistema respiratório. Porém, os órgãos afetados podem ir muito além dos pulmões, pois a substância é absorvida por meio da membrana celular e entra na corrente sanguínea, de tal forma que atinge vários tecidos dos órgãos antes de ser excretado do corpo (SIDTHILAW *et al.*, 2022). No presente estudo não encontramos alterações pulmonares significativas decorrentes a exposição ao 2,4-D e glifosato, porém foi observado alterações hematológicas que demonstra a absorção da exposição dos herbicidas pela corrente sanguínea, principalmente para o glifosato.

Uma pesquisa de análise da toxicidade inibitória para a viabilidade celular por herbicidas à base de glifosato utilizando linhagens celulares humanas de carcinoma alveolar, hepático e neuroblastoma *in vitro* como objeto de estudo, demonstrou que todos os formulantes à base de glifosato testados têm efeito citotóxico na supressão da viabilidade celular, já o ingrediente ativo declarado glifosato propriamente dito, não apresentou toxicidade significativa às células dos pulmões, fígado e tecido nervoso. Portanto, os autores consideraram que o glifosato como ingrediente ativo é relativamente seguro, porém os formulantes podem ter efeitos tóxicos aos órgãos estudados (HAO *et al.*, 2019). Os resultados corroboram, em partes, com os achados da presente pesquisa, que não encontrou efeitos tóxicos da exposição ao glifosato para os pulmões, embora tenhamos utilizado uma formulação disponível no mercado de agrotóxicos que possui outros ingredientes além do glifosato.

Em controvérsia com o presente trabalho, que não encontrou alterações significativas nas avaliações pulmonares dos ratos expostos ao 2,4-D, Fukuyama *et al.* (2009) demonstraram que o 2,4-D é considerado um alérgeno respiratório. Os autores, realizaram exposição dérmica, aplicando o 2,4-D no dorso de cada orelha de camundongos, e a exposição respiratória, com injeção via intratraqueal. Então foram colhidos sangue para testar níveis de IgE total e colhido o Líquido do Lavado Broncoalveolar (LBA) para contagem de células (macrófagos, eosinófilos e neutrófilos). Como resultado, os pesquisadores observaram que houve aumento do IgE nos grupos expostos a alta dose de 2,4-D comparado ao controle, bem como aumento de eosinófilos e neutrófilos no LBA. A principal diferença entre o estudo anterior com a presente pesquisa que poderia justificar a ausência de alterações significativas é a forma de exposição que foi intratraqueal, além disso, não quantificamos os níveis de IgE para analisar o efeito alérgeno dos herbicidas estudados, visto que não abrangia nosso objetivo geral.

Embora não tenhamos encontrado alterações pulmonares significativas na exposição crônica ao 2,4-D neste trabalho, previamente foi observada reação celular proliferativa nos pulmões de camundongos expostos por via inalatória ao 2,4-D evidenciado pela redução da área de luz dos alvéolos pulmonares em todas as concentrações comparado ao GC, com o mesmo protocolo de exposição desta pesquisa. O tempo de exposição foi de 24, 48, 72 e 192 horas, caracterizada como exposição aguda (CATTINI *et al.*, 2021). O único fator que diferenciou ambos os trabalhos para justificar as variações nos achados foi a linhagem do animal utilizado nos estudos (camundongos e ratos) e a forma de análise, pois utilizamos o método de quantificação das células caliciformes em vez da análise morfométrica. Meek, Mashimo e Burdon (2017) relatam que o rato sofre menos estresse do que o camundongo, e que isso minimiza qualquer influência ou variabilidade nos resultados das pesquisas experimentais, portanto é provável que a diferença comportamental entre as linhagens dos animais tenha influenciado nos diferentes resultados obtidos.

Não foram encontrados estudos que avaliassem o infiltrado inflamatório dos pulmões após a exposição individual do glifosato ou 2,4-D. Porém, Pandher *et al.* (2021) realizaram uma pesquisa experimental com camundongos cujo objetivo era comparar os efeitos nas células pulmonares da exposição isolada e combinada ao glifosato e de lipopolissacarídeo (LPS), que é uma endotoxina presente na poeira

agrícola. As substâncias foram introduzidas por via intranasal dos animais sob anestesia local. Por meio da análise do LBA e histopatológica do tecido pulmonar foi observado que a contagem de leucócitos do tecido pulmonar aumentou após a exposição das substâncias combinadas e não isoladas. Além disso, foi observado que houve acúmulo robusto de células inflamatórias nas regiões perivascular, peribronquiolar e alveolar dos pulmões dos camundongos em todos os grupos, porém com acúmulo mais intenso nos pulmões de camundongos expostos à combinação de LPS + Glifosato. Todas as alterações foram observadas apenas após 5 dias de exposição.

Portanto, por mais que não tenhamos encontrado alterações pulmonares significativas em nosso trabalho, cabe ressaltar que dificilmente os trabalhadores agrícolas são expostos a um único agente agressor, e este, quando associado a demais agentes, podem ser potencialmente tóxicos a saúde respiratória (PANDHER *et al.*, 2021).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho demonstraram que ambos os herbicidas podem desencadear alterações hematológicas, entretanto o glifosato se demonstrou com uma maior toxicidade para o sangue comparado aos resultados encontrados do 2,4-D.

No período de 6 meses de exposição inalatória e oral não houve alterações pulmonares significativas tanto para os animais expostos ao 2,4-D quanto ao glifosato, independente da concentração de exposição.

Desta forma, é importante salientar que há a necessidade do monitoramento hematológico de indivíduos expostos a esses herbicidas, para evitar possíveis doenças crônicas. Além disso, cabe ressaltar a necessidade também do monitoramento da saúde cardiovascular desses indivíduos devido a elevação dos níveis de fibrinogênio encontrados no grupo de alta concentração do glifosato.

Demonstra-se a importância de buscar alternativas que evidentemente são mais seguras ao meio ambiente e a população exposta. Portanto, são necessários maiores estudos de comparações entre agrotóxicos similares e suas formulações para reduzir o risco à saúde que a exposição aos diversos agrotóxicos pode desencadear.

Devido a utilização de agrotóxicos e outras substâncias associadas na prática agrícola, sugere-se ampliar as pesquisas sobre os efeitos da exposição combinada a essas substâncias na saúde ambiental, animal e humana.

REFERÊNCIAS

- AIKAWA, T. *et al.* Morphometric analysis of intraluminal mucus in airways in chronic obstructive pulmonary disease. **Am Rev Respir Dis**. v.140, n. 2, p. 477-482, ago. 1989. DOI: 10.1164/ajrccm/140.2.477
- AMARANTE JUNIOR, O.P. *et al.* Revisão das propriedades, usos e legislação do ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D). **Cad Pesq**. v.13, n.1, p.60-70, jan./jun. 2002.
- AUGUSTO, L. G. S. *et al.* Agrotóxicos, Saúde, Ambiente e Sustentabilidade. *In: Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde*. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.
- AYLWARD, L. L. *et al.* Biomonitoring data for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the United States and Canada: interpretation in a public health risk assessment context using Biomonitoring Equivalents. **Environ Health Perspect**. v.118, n.2, p.177-181, 2010. Acesso em: 17 jan. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20123603/>
- BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.
- BEAVER, R. J.; LEHMANN, E. L. **Nonparametrics: Statistical Methods Based on Ranks**. 1. ed. New York: Springer-Verlag. 2006.
- BENEDETTI, A. L. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico glifosato sobre a saúde: estudos em modelo animal**. 2003. Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003. Acesso em: 20 jan. 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/86334?show=full>
- BEZERRA, A. G. *et al.* Identificação do potencial carcinogênico dos agrotóxicos: tetraconazol, ciproconazol, triadimenol, poxadiazona e cloransulam-metílico. **Evolv Scient**. v.2, n.1, p.9-18, 2013. Acesso em: 13 dez. 2022. Disponível em: <http://www.scientia.univasf.edu.br/vol2/paper02-pp9-18.pdf>
- BOMBARDI, L. M. Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado. **Boletim DATALUTA**. 2011. Acesso em: 16 dez. 2022. Disponível em: http://www2.fct.unesp.br/nera/artigodomes/9artigodomes_2011.pdf
- BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Quim Nova**.v.34, n.1, p.10-15, 2012. Acesso em 10 dez. 2022. Disponível em: http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_1/03-QS-02-11.pdf
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola – LSPA**. Brasília: IBGE, 2017. Acesso em: 11 dez. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=destaques>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Marco regulatório para reclassificação toxicológica dos agrotóxicos**. 2019a.

Acesso em: 15 dez 2022. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5578706&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_uriTitle=publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos-&inheritRedirect=true

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Agrotóxico 2,4-D passa a ter restrições na aplicação**. 2019b. Acesso em: 15 jan. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/agrotoxico-24-d-passa-a-ter-restricoes-na-aplicacao>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 294, de 29 de julho de 2019**. Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União, 31 jul. 2019c. Acesso em: 10 dez. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-294-de-29-de-julho-de-2019-207941987>

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota informativa contendo esclarecimentos sobre pulverização aérea e o controle de endemias**. Brasília: Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador, 2016. Acesso em: 15 dez. 2022. Disponível em: <https://cporgsc.files.wordpress.com/2016/06/parecer-pulverizacao-aecc81rea-ministecc81rio-da-saude.pdf>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. **Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018**. Brasília: Gerência Geral de Toxicologia, 2019d. Acesso em: 31 jan. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), 2010. Acesso em: 15 jan. 2023. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/livros/produtosagrotoxicoseafinscomercializadoem2009nobrasildigital.pdf>

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), 2020e. Acesso em: 08 dez. 2022. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), 2021. Acesso em: 08 dez. 2022. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>

BRASIL. Senado Federal. **Projeto de Lei do Senado nº541 de 2015**. Altera a Lei nº7.802, de 11 de julho de 1989, para restringir o registro e uso de agrotóxicos. Brasília: Senado Federal, 2015. Acesso em: 14 dez. 2022. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/ecidania/visualizacaomateria?id=122747>

CATTINI, M.M. *et al.* Efeitos agudos do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético no pulmão de camundongos: análise morfológica e fractal. **Interação**. v.21, n.1, p.683-699, 2021.

CAVALLIERI, G.V. *et al.* Análise histopatológica de ratos cronicamente expostos por inalação ao herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). **Res. Dev. Soc.** v.10, n.11, p.e282101119607, 2021. Acesso em: 04 jan. 2023. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/19607/17527>

CHAIM, A. Tecnologia de aplicação de agrotóxicos: fatores que afetam a eficiência e o impacto ambiental. *In*: SILVA, C. M. M.S.; FAY, E. (org.). **Agrotóxicos & Ambiente**. Brasília: EMBRAPA, 2004. p. 289-317.

CHAMPELY, S. **Package 'pwr': R package version**. PWR: Basic Functions for Power Analysis. 2018. Acesso em: 13 out. 2022. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/pwr/pwr.pdf>

CLEMENTS, D. *et al.* Herbicide Efficacy for Aquatic *Alternanthera Philoxeroides* Management in an Early Stage of Invasion: Integrating above-Ground Biomass, below-Ground Biomass and Viable Stem Fragmentation. **Weed Res.** v.57, p.257-266, 2017. Acesso em: 12 jan. 2023. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/318249253_Herbicide_efficacy_for_aquatic_Alternanthera_philoxeroides_management_in_an_early_stage_of_invasion_integrating_above-ground_biomass_below-ground_biomass_and_viable_stem_fragmentation

COSTA, A. G. F. *et al.* Efeito da intensidade do vento, da pressão e de pontas de pulverização na deriva de aplicações de herbicidas em pré-emergência. **Planta danin.** v.11, n.1, p.203-210, 2007. Acesso em: 10 dez. 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pd/a/gkS6d7JHjts9t6Fg5wSDHBH/?lang=pt>

CURTIS, J. L. *et al.* Requirement of CD4-positive T cells for cellular recruitment to the lungs of mice in response to a particulate intratracheal antigen. **J Clin Invest.** v. 88, n.4, p.1244-1254, 1991. Acesso em: 10 dez. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295593/?page=3>

DE OLIVEIRA, T. G.; FAVARETO, A. P. A.; ANTUNES, P. A. **Agrotóxicos: Levantamento dos mais utilizados no oeste paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos**. Fórum Ambiental da Alta Paulista, v.9, n.11, p.375-390, 2013. Acesso em: 05 jan. 2023. Disponível em: https://publicacoes.amigosdanatureza.org.br/index.php/forum_ambiental/article/view/684/708

EPA. Environmental Protection Agency. **2,4 RED FACTS**. Washington: United States Environmental Protection Agency, 2005. Acesso em: 19 dez. 2022. disponível em:

https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-030001_30-Jun-05.pdf

EPA. Environmental Protection Agency. **Glyphosate Draft Human Health Risk Assessment for Registration Review**. Washington: United States Environmental Protection Agency, 2009. Acesso em: 06 nov. 2022. Disponível em: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2009-0361-0068>

EPA. Environmental Protection Agency. **Pesticides Industry Sales and Usage: 2008 – 2012 Market Estimates**. Washington: United States Environmental Protection Agency, 2017. Acesso em: 14 jan. 2023. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf

FAREED, M. *et al.* Adverse respiratory health and hematological alterations among agricultural workers occupationally exposed to organophosphate pesticides: a cross-sectional study in North India. **PLoS One**. v.8, n.7, p.e69755, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069755#:~:text=It%20is%20concluded%20from%20this,lung%20functions%20and%20hematological%20abnormalities>

FERREIRA, C. R. R. P.; VEGRO, C. L. R.; CAMARGO, M. L. B. Defensivos agrícolas: rumo a uma retomada sustentável. Análises e Indicadores de Agronegócio. **Análises e Indicadores do Agronegócio**. v.3, n.2, 2008. Acesso em: 15 jan. 2023. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=9200>

FERREIRA, M. L. P. C. A pulverização aérea de agrotóxicos no Brasil: cenário atual e desafios. **Rev Direito Sanit**. v.15, n.3, p.1845, 2015. Acesso em: 14 dez. 2022. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rdisan/article/view/97324/96336>

FOGLIATTO, S.; FERRERO, A.; VIDOTTO, F. Current and future scenarios of glyphosate use in Europe: Are there alternatives? *In*: SPARKS, D. L. **Advances in Agronomy**. Cambridge, MA, USA: Academic Press, 2020. v.163. p. 219-278.

FORD, B. *et al.* Mapping proteome-wide targets of glyphosate in mice. **Cell Chem. Biol**. v.24, n.2, p.133-140, 2017. DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.12.013

FREITAS, L. M. *et al.* Animal models in the neurotoxicology of 2,4-D. **Hum. Experimen. Toxicol**. v.38, n.10, p.1178-1182, 2019. Acesso em: 16 jan. 2023. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327119860172?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed

FUKUYAMA, T. *et al.* Allergic reaction induced by dermal and/or respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides. **Toxicol**. v.261, n.3, p.152-161, jul. 2009.

GARCIA, E. G. Aspectos de prevenção e controle de acidentes no trabalho com agrotóxicos. São Paulo: Fundacentro, 2005. Acesso em: 10 jan. 2023. Disponível

em: <https://alexinoco.com/seguranca-do-trabalho/pdf-aspectos-de-prevencao-e-controle-de-acidentados-no-trabalho-com-agrotoxicos/>

GIANESSI, L. P. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. **Pest Manag. Sci.** v.69, p.1099-1105, 2013. DOI: 10.1002/ps.3598

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: Mutações, Reprodução e Câncer.** 1. ed. Brasília: UNB, 2005.

HAO, Y. *et al.* Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung, and nerve. **J Environ Sci Health B.** v.54, n.9, p.737-744, jun. 2019. DOI: 10.1080/03601234.2019.1633215

HASANUZZAMAN, M. *et al.* Phytotoxicity, environmental and health hazards of herbicides: Challenges and ways forward. *In*: PRASAD, M. N. V. **Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation.** Butterworth-Heinemann. India: Hyderabad, 2020. p.55-99.

INGARAMO, P. I. *et al.* Altered uterine angiogenesis in rats treated with a glyphosate-based herbicide. **Environ Pollut.** v.296, p.118729, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749121023113>

INOUE, L. A. Avaliação Morfológica do Fígado e do Pulmão Pós Intoxicação por Organofosforado, em Ratos Wistar. **Uniciências.** v.8, n.2, p.103-109, 2014. Acesso em: 08 jan. 2023. Disponível em: <https://uniciencias.pgsskroton.com.br/article/view/316>

KACHURI, L. *et al.* Cancer risks in a population-based study of 70,570 agricultural workers: results from the Canadian census health and Environment cohort (CanCHEC). **BMC Cancer.** v.17, n.1, p.343, 2017. Acesso em: 18 dez. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5437486/>

KRUGER, M. *et al.* Detection of Glyphosate Residues in Animals and Humans. **J. Environ. Anal. Toxicol.** v.4, p.1–5, 2014. Disponível em: <https://www.hilarispublisher.com/open-access/detection-of-glyphosate-residues-in-animals-and-humans-2161-0525.1000210.pdf>

KUBSAD, D. *et al.* Assessment of glyphosate induced epigenetic transgenerational inheritance of pathologies and sperm epimutations: generational toxicology. **Sci. Rep.** v.9, n.6372, 2019. Acesso em: 15 jan. 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-42860-0#citeas>

KUDSK, P; MATHIASSEN, S. K. Pesticide regulation in the European Union and the glyphosate controversy. **Weed Sci.** v.68, p.214–222, 2020. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/weed-science/article/abs/pesticide-regulation-in-the-european-union-and-the-glyphosate-controversy/280701D3315D9AF5E80B2EB383CF593D>

KUMAR, S. *et al.* Glyphosate-rich air samples induce IL-33, TSLP and generate IL-

13 dependent airway inflammation. **Toxicology**. v.5, n.0, p.42-51, 2014. Acesso em: 19 dez. 2022. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4195794/>

KUVA, M.A. *et al.* Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. III – capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). **Planta Danin.** v.21, n.1, p.37-44, 2003. Acesso em: 10 dez. 2022. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/pd/a/Qjy689znpF4zpfcbd4RgyfL/?lang=pt>

LERRO, C. C. *et al.* Cancer incidence in the Agricultural Health Study after twenty years of follow-up. **Cancer Causes Control**. v.30, n.4, p.311-322, abr. 2019. Acesso em: 26 mar. 2023. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6459699/>

LIND, P. *et al.* Influence of Plasma Fibrinogen Levels on the Incidence of Myocardial Infarction and Death Is Modified by Other Inflammation-Sensitive Proteins. **Arterioscl Thromb Vasc Biol**. v.21, n.3, p.452-458, 2001. Acesso em: 20 jan. 2023. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.atv.21.3.452>

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: Um guia para ação em defesa da vida**. 1. ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. Acesso em: 15 dez. 2022]. Disponível em: <https://br.boell.org/pt-br/2011/10/31/agrotoxicos-no-brasil-um-guia-para-acao-em-defesa-da-vida-0>

LOPEZ, A. *et al.* Iron deficiency anaemia. **Lancet**. v.387, n.10021, p.907–916, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26314490/>

MAIA, F. C. C. *et al.* Cardiovascular damage associated with subchronic exposure to the glyphosate herbicide in Wistar rats. **Toxicol Indust Health**. v.37, n.4, p.210-218, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33625310/>

MCQUEEN, H.; CALLAN, A. C.; HINWOOD, A. L. Estimating Maternal and Prenatal Exposure to Glyphosate in the Community Setting. **Int. J. Hyg. Environ. Health**. v.215, p.570–576, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22261298/>

MEEK, S.; MASHIMO, T.; BURDON, T. From engineering to editing the rat genome. **Mamm Genome**. v.28, n.7, p.302-314, jul. 2017. Acesso em: 26 mar. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5569148/>

MELLO, F. A. *et al.* Avaliação da cavidade nasal de camundongos submetidos à exposição ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético. **Med. (Ribeirão Preto)**. v.51, n.4, p.247-253, 2018. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-970921>

MESSAGE, R. *et al.* Genotoxicity evaluation of 2,4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response. **Food Chem Toxicol**. v. 157, p.112601, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112601>

MIRANDA-FILHO, A. L.; MONTEIRO, G. T. R.; MEYER, A. Brain cancer mortality among farm workers of the State of Rio de Janeiro, Brazil: a population-based case-control study, 1996-2005. **Int J Hyg Environ Health**. v.215, n.5, p.496-501, set. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22118878/>

MONSANTO. Roundup Original DI. **Agrolinkfito**. 2019. Acesso em: 05 jan. 2023. Disponível em: http://www.roundup.com.br/videos/pdf/roundup_di/roundup-original-di-bula.pdf

NAGY, K. *et al.* Comparative Cyto- and Genotoxicity Assessment of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides in Human Peripheral White Blood Cells. **Environ. Res**. v.179, p.108851, 2019. Acesso em: 14 jan. 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013935119306486>

NIEMANN, L. *et al.* A Critical Review of Glyphosate Findings in Human Urine Samples and Comparison with the Exposure of Operators and Consumers. **J. Verbr. Lebensm**. v.10, p.3-12, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00003-014-0927-3>

PANDHER, U. *et al.* Pulmonary inflammatory response from co-exposure to LPS and glyphosate. **Environ Toxicol Pharmacol**. v.86, p.103651, 2021. Acesso em: 24 jan. 2023. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1382668921000697?token=76E426B4A5CF3E1EDA36AD63CACE64F9D698FDC20F0C4F0D5A0E55DBA1BC46B00EFD4D9C57B74A66BC9055A3983CE722&originRegion=us-east-1&originCreation=20230124224900>

PATIL, J. A.; PATIL, A. J.; GOVINDWAR, S. P. Biochemical effects of various pesticides on sprayers of grape gardens. **Indian J. Clin. Biochem**. v. 18, n. 2, p. 16-22, jul. 2003. Acesso em: 19 jan. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3453870/>

PEILLEX, C.; PELLETIER, M. The Impact and Toxicity of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides on Health and Immunity. **J. Immunotoxicol**. v.17, p.163–174, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32897110/>

PEIRIS-JOHN, R. J. *et al.* Low-level exposure to organophosphate pesticides leads to restrictive lung dysfunction. **Respir Med**. v.99, n.10, p.1319-1324, out. 2005. Acesso em: 26 mar. 2023. Disponível em: [https://www.resmedjournal.com/article/S0954-6111\(05\)00028-4/fulltext](https://www.resmedjournal.com/article/S0954-6111(05)00028-4/fulltext)

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. 1.ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. Acesso em: 10 dez. 2022. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/sg3mt/pdf/peres-9788575413173.pdf>

PIERCE, J. S. *et al.* Pilot study evaluating inhalation and dermal glyphosate exposure resulting from simulated heavy residential consumer application of

Roundup®. **Inhal Toxicol.** v.32, n.8, p.354-367, jul. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32892662/>

PIGNATI, W. A. *et al.* Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciênc Saúde Colet.** v.22, n.10, p.3281-3293, 2017. Acesso em: 15 dez. 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/grnBRDjmtcBhm6CLprQvN/?lang=pt>

PORTIER, C. J. *et al.* Differences in the Carcinogenic Evaluation of Glyphosate between the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the European Food Safety Authority (EFSA). **J. Epidemiol. Community Health.** v.70, p.741–745, 2016. Acesso em: 14 jan. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4975799/>

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cad. Saude Publ.** v.30, n.7, p.1-3, 2014. Acesso em: 05 jan. 2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/7ZdQTpMhCT5n6Gvv9ZHKnqK/?lang=pt>

ROSENFELD, R. Hemograma. **J Bras Patol Med Labor.** v.48, n.2, p.244, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/VXTmhzBwSsmRFN8ZkRHBZ7P/?lang=pt>

RUDEL, R. A. *et al.* Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. **Cancer.** v.109, n.12, p.2635-2666, 15 jun. 2007. Suplemento. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17503434/>

RUIZ, J. M. O.; GARCÍA, A. E. G. Síndrome hipoxêmica crônica. **Rev Esp Cardiol.** v.9, p.13E-22E, 2009. Suplemento. Disponível em: <https://www.revespcardiol.org/es-sindrome-hipoxemico-cronico-articulo-S1131358709732935>

SACHS, R. C.C.; MARTINS, V. A. Análise da cultura de cana-de-açúcar, por escritório de desenvolvimento rural, estado de São Paulo, 1995-2006. **Inform. Econom.** v.37, n.9, p.41-52, set. 2007. Acesso em: 18 jan. 2023. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/ftpiea/ie/2007/tec4-0907.pdf>.

SAMPAIO, L. R. *et al.*. Avaliação bioquímica do estado nutricional. *In*: SAMPAIO, L. R. **Avaliação nutricional.** Salvador: EDUFBA, 2012. p. 42-79.

SÃO PAULO (Estado). Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados. **Anuário Estatístico do Estado de São Paulo.** São Paulo: SEADE, 2013. Acesso em: 19 jan. 2023. Disponível em: <https://www.seade.gov.br/produtos/anuario-estatistico-estado-de-sao-paulo/>

SAPBAMRER, R.; NATA, S. Health symptoms related to pesticide exposure and agricultural tasks among rice farmers from northern Thailand. **Environ Health Prev Med.** v.19, n.1, p.12-20, jan. 2014. Acesso em: 26 mar. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3890077/>

SERRA, F. M. *et al.* Subchronic exposure to a glyphosate-based herbicide causes dysplasia in the digestive tract of Wistar rats. **Environ Sci Pollut Res.** v.28, n.43, p.61477-61496, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34173954/>

SHAFEEQ, S.; MAHBOOD, T. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid induced hepatic and renal toxicological perturbations in rat model: Attenuation by selenium supplementation. **Toxicol Ind Health.** v.37, n.3, p.152-163, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33689533/>

SIDTHILAW, S. *et al.* Effects of exposure to glyphosate on oxidative stress, inflammation, and lung function in maize farmers, Northern Thailand. **BMC Public Health.** v.22, p.1343, 2022. Acesso em: 24 jan. 2023. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9281059/>

STURTZ, N. *et al.* Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on rat maternal behavior. **Toxicol.** v.247, n.2-3, p. 73-79, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18420331/>

SWANSON, N. L. *et al.* Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America. **J. Organic Syst.** v.9, n.2, p.6-37, 2014. Acesso em: 16 jan. 2023. Disponível: https://www.researchgate.net/publication/283462716_Genetically_engineered_crops_glyphosate_and_the_deterioration_of_health_in_the_United_States_of_America/link/563fde7d08aec6f17ddb8426/download

TEAM, R. Core. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, 2019. Acesso em: 13 out. 2022. Disponível em: www.r-project.org .

TORRETTA, V. *et al.* Critical Review of the Effects of Glyphosate Exposure to the Environment and Humans through the Food Supply Chain. **Sustainability.** v.10, p.950, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/10/4/950>

VAN BRUGGEN, A. H. C. *et al.* Environmental and Health Effects of the Herbicide Glyphosate. **Sci. Total Environ.** v.616-617, p.255–268, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>

WARNER, W. A.; WARNER, M. A.; DIVERTIE, M. B. Open lung biopsy in patients with pulmonary infiltrates and acute respiratory failure. **Am Ver Resp Dis.** v.137, n.1, p.90-94, 1998.

YAOYU, P. *et al.* Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.117, n.21, p.11753-11759, mai. 2020. Acesso em: 13 jan. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32398374/>

ZUÑIGA-VENEGAS, L. A. *et al.* Health Effects of Pesticide Exposure in Latin American and the Caribbean Populations: A Scoping Review. **Environ Health Perspect.** v.130, n.9, p.096002, set. 2022. Acesso em: 26 mar. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9521041/>

ANEXO A - PARECER FINAL DA COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)

17/02/2022 21:25

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA PULMONAR DE RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE POR VIA INALATÓRIA E ORAL AOS HERBICIDAS GLIFOSATO E ÁCIDO 2,4 DICLOROFENOXIACÉTICO", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5684 e tendo como participante(s) GABRIELA VIDOTTO CAVALIERI (discente), RENATA MARGARIDA ETCHEBERERE (participante externo), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), ANA PAULA ALVES FAVARETO (docente), RENATA CALCIOLARI ROSSI (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 realizada em 13/11/2019.

Vigência do projeto: 01/2020 a 01/2023.

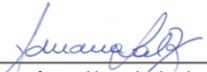
ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Ratos Wistar	112	250 gramas	90 dias	M	Biotério central da UNOESTE

Presidente Prudente, 9 de Dezembro de 2019.



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



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

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação – CPDI – 18 3229-2079 – cpdi@unoeste.br
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP – 18 3229-2079 – cep@unoeste.br
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – 183229-2079 – ceua@unoeste.br

valide este documento em www.unoeste.br/sgp informando o código de segurança 522f5c4b2ecd5a1af989c9aca7f7fd7e