

IMPACTOS DA EXPOSIÇÃO A HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO EM MODELO EXPERIMENTAL DE MAMÍFERO

Resumo Expandido

Katiuska Marins¹
Carolinne Sayury Wajima²
Patricia Acordi Cesconetto³
Sandra Joseane Fernandes Garcia⁴
Daiane Cattani⁵
Carla Elise Heinz Rieg⁶
Alessandra Helbrugge⁷
Ariane Zamoner Pacheco de Souza⁸

Resumo

O alto consumo de agrotóxicos historicamente utilizados, em especial os herbicidas a base de glifosato (HBG), faz com o Brasil seja, desde 2008, o maior consumidor mundial desses produtos. Sugere-se que a exposição ocupacional de agricultores, devido o manejo inadequado, falta de utilização de equipamentos de proteção individual e a exposição ambiental da população, devido a presença de resíduos de agrotóxicos na água e/ou alimentos, possam ser relacionadas a diversas situações patológicas e agravos à saúde. O objetivo deste trabalho é relatar dados já obtidos pelo grupo de pesquisa em Bioquímica e Sinalização Celular da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) ao investigar os efeitos da exposição materna ao HBG sob diferentes parâmetros em tecidos da prole. Para tanto, ratas Wistar foram expostas a 1% de HBG na água de beber a partir do 5º dia da gestação até a prole completar 15 dias pós-natal. Nossos resultados demonstraram que a exposição materna ao HBG afeta diferentes tecidos de mamíferos durante o desenvolvimento. Foi demonstrado: 1) neurotoxicidade em células hipocâmpais da prole, o que se sugere estar relacionado a excitotoxicidade glutamatérgica; 2) aumento da atividade das aminotransferase no sangue da prole, sugerindo uma possível hepatotoxicidade; 3) interferência na microbiota e histomorfologia intestinal da prole. Por fim, estas conclusões sugerem que a população pode estar vulnerável aos danos da exposição a HBG. Assim, com este estudo pretende-se alertar a população sobre os riscos da exposição a HBG, e contribuir com a produção de material de divulgação para as agências reguladoras.

Palavras-chave: Herbicida a base de glifosato, mamíferos e intoxicação ambiental.

Introdução

Desde 2008 o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, o que colocou o país entre os maiores produtores mundiais de alimentos. Sendo que muitas

¹ Doutoranda em Farmácia, UFSC, katiuska.marins@posgrad.ufsc.br

² Graduanda em Farmácia, UFSC, carol.wajima@gmail.com

³ Doutoranda em Farmácia, UFSC, pacesconetto@gmail.com

⁴ Doutoranda em Bioquímica, UFSC, sandra.garcia@ifsc.edu.br

⁵ Doutora em Farmácia, UFSC, dadacatt@hotmail.com

⁶ Doutoranda em Farmácia, UFSC, krla_elise@hotmail.com

⁷ Mestre em Bioquímica, UFSC, alessandra.hellbrugge@uol.com.br

⁸ Doutora em Bioquímica, UFSC, ariane.zamoner@ufsc.br

vezes, o aumento da produtividade está aliado a utilização de agrotóxicos (SILVA, 2017; ABRASCO, 2015). Pignati e colaboradores (2017) demonstram que o Estado brasileiro que mais consome agrotóxico é o Mato Grosso, seguido por Paraná e Rio Grande do Sul. Santa Catarina ocupa a 10^o posição neste *ranking*.

A exposição à agrotóxicos está associada ao aparecimento de doenças neurodegenerativas (Wang et al., 2011), ou como fator de risco para linfoma Não-Hodgkin (SCHINASI; LEON, 2014), autismo (ARGOU-CARDOZO; ZEIDAN-CHULIA, 2018) e câncer de cabeça e pescoço (BRASIL et al., 2018).

Entre os vários agrotóxicos utilizados na agricultura, o princípio ativo mais popular é o glifosato [N-(fosfonometil)glicina] sendo não seletivo com amplo espectro de ação, representando cerca de 60% desde mercado mundial e ocupando posição de destaque no *ranking* brasileiro entre os 10 ingredientes ativos mais comercializados.

Em Nota Técnica publicada pela ANVISA, nº 23 de 2018, o glifosato não apresenta características mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas, não é desregulador endócrino e não é tóxico para a reprodução. Neste documento foi determinado que a Ingestão Diária Aceitável de glifosato é de 0,5 mg/Kg pc/dia. Esta ainda aborda o parecer de outras agências reguladoras internacionais, como a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), vinculada a Organização Mundial da Saúde (OMS), que considera o glifosato um provavelmente carcinogênico para humanos, enquanto outras agências, como a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*), o Instituto Federal Alemão de Avaliação de Riscos (BfR, do inglês *German Federal Institute for Risk Assessment*) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*), concluíram que é improvável que o glifosato seja carcinogênico para humanos (ANVISA, 2018).

Os agrotóxicos vêm ganhando destaque nos noticiários devido a detecção da presença dessas substâncias na água e alimentos para consumo humano. Em 2019, foi divulgado relatório do Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Sisagua), que reúne os resultados de testes feitos pelas empresas de abastecimento, no período de 2014 e 2017, sendo detectado na água todos os 27 pesticidas que as empresas de abastecimento têm obrigatoriedade de testar por lei, dentre eles o glifosato. As três capitais do Sul do Brasil estão entre os locais com contaminação múltipla (ARANHA; ROCHA, 2019).

Além da contaminação dos recursos hídricos, os agrotóxicos também podem estar presentes na forma de resíduos em alimentos. O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela ANVISA monitorou entre os anos de 2013 a 2015 amostras de alimentos de origem vegetal, relatando que 19,7% das amostras apresentaram resultados insatisfatórios quanto ao limite permitido para resíduos de agrotóxicos. Vale ressaltar que os agrotóxicos glifosato e 2,4-D, os mais comercializados no Brasil, não foram incluídos nas análises, pois necessitam de metodologia específica (ANVISA, 2016).

O glifosato consta na lista de ingredientes ativos de uso autorizado no Brasil (ANVISA, 2017a), porém em 2019, a ANVISA abriu consulta pública que trata de sua reavaliação, determinado pela RDC nº 10 de 2008 (ANVISA, 2017b). Conforme a Portaria nº 2.914 de 2011, o valor máximo permitido de glifosato e seu metabólito principal ácido aminometilfosfônico (AMPA) em água destinada ao consumo humano é de 500 µg/L (BRASIL, 2011).

Esta frequente detecção de resíduos de agrotóxicos tanto na água de beber como em alimentos demonstra o quanto a população rural e urbana está vulnerável a este “agente invisível”. De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), a exposição humana a agrotóxicos representa um problema de saúde pública, o qual muitas vezes deve ser enfrentado com a implementação de políticas públicas que visem a saúde da população.

Visto esta problemática, o grupo de pesquisa em Bioquímica e Sinalização Celular da UFSC buscou investigar os mecanismos subjacentes à toxicidade induzida pela exposição materna a HBG em modelo de mamífero.

Objetivos

O objetivo deste trabalho é relatar alguns dados já obtidos pelo grupo de pesquisa em Bioquímica e Sinalização Celular da UFSC ao estudar os efeitos e os mecanismos subjacentes à toxicidade induzida pela exposição materna ao HBG durante os períodos de prenhez e aleitamento sobre diferentes sistemas corpóreos da prole.

Delineamento e Métodos

Ratas fêmeas prenhas (linhagem Wistar) foram provenientes do Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e expostos a um ciclo claro/escuro de 12/12 horas em sala climatizada com temperatura de 21°C e com ração e água *ad libitum*. Todos os animais foram monitorados e mantidos conforme as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Sendo que o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob número 8510150517.

As fêmeas foram expostas a 1% de formulação comercial de HBG - equivalente a 0,36% de glifosato, na forma de sal de isopropilamina -, na água de beber a partir do 5º dia de gestação e o tratamento prosseguiu até os filhotes completarem 15 dias pós-natal, o qual corresponde ao período imaturo de desenvolvimento. Os animais controles receberam água da torneira durante o mesmo período. A dose materna de HBG foi equivalente a 70 mg/Kg/dia (NOAEL, nível de dose sem observação de efeito adversos) de glifosato, sendo que a toxicidade materna é de 1000 mg/Kg/dia (EPA, 1993; WILLIAMS, KROES; MUNRO, 2000). Ao completarem o 15º dia pós-natal, a prole foi decapitada, coletado o sangue com posterior dissecação dos tecidos de interesse. Estes foram homogeneizados em tampões específicos dependendo da análise a ser realizada.

Resultados e Discussão

O modelo experimental acima citado é desenvolvido pelo grupo de pesquisa em Bioquímica e Sinalização Celular da UFSC, com o qual já foi possível identificar várias alterações em parâmetros bioquímicas, celulares, morfológicos e de desenvolvimento na prole após exposição materna a HBG. Foi demonstrado inicialmente que a formulação comercial de HBG promove o aumento da liberação e diminuição da captação do aminoácido excitatório glutamato em hipocampo de ratos imaturos, levando a ativação dos receptores glutamatérgicos, em especial o NMDA, com conseqüente aumento no influxo de Ca^{2+} e modulação de diferentes vias de sinalização celular, como demonstrado em estudo já publicado por Cattani (2014) e Cattani (2017). Sendo que estes processos parecem estar induzindo o fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica, corroborado também para as demais alterações que foram observadas no metabolismo de aminoácidos: inibição da glutamina sintetase,

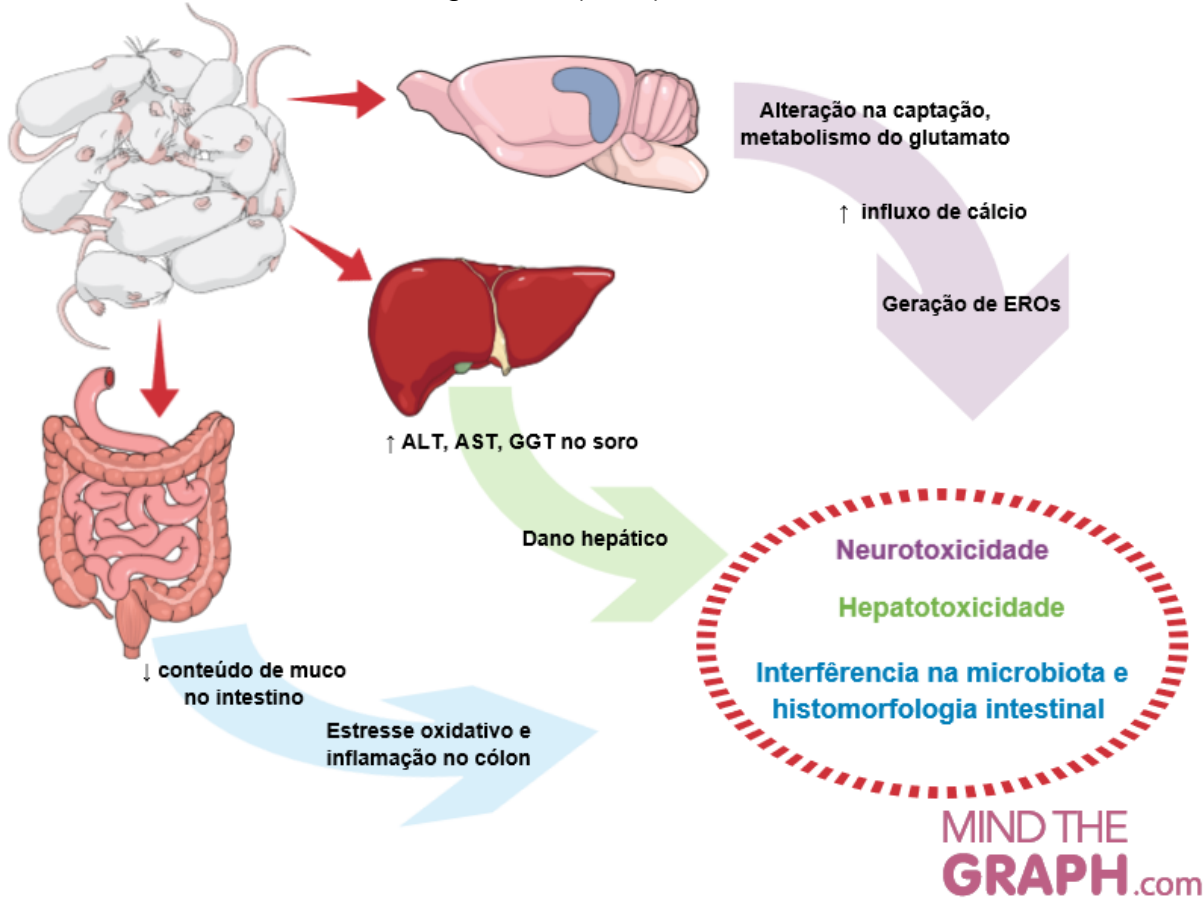
modulação de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), acúmulo de aminoácidos neutros e indução de estresse oxidativo (CATTANI, 2014; CATTANI, 2017).

Concomitantemente, foi estudado a participação do fígado neste processo toxicológico, visto que este tecido é muito susceptível a exposição de contaminantes ambientais e é responsável por funções fundamentais no organismo, como por exemplo eliminar toxinas. Foi demonstrado que a formulação comercial de HBG pode comprometer diferentes vias metabólicas no fígado, pelo aumento na atividade das enzimas hepáticas ALT e AST, importantes na interconversão entre o metabolismo de proteínas e de carboidratos. A exposição materna ao HBG aumentou o influxo de Ca^{2+} no fígado, o que pode levar à ruptura da homeostase do cálcio, promovendo estresse oxidativo e, provavelmente, morte celular. Nos animais expostos a HBG foi detectado aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como elevação no conteúdo de ácido tiobarbitúrico (TBARS) e carbonilação de proteínas, além de alteração na atividade das enzimas antioxidantes e consequente dano oxidativo. A exposição crônica a HBG induziu hepatotoxicidade com elevação na atividade sérica das enzimas ALT, AST e gama glutamil transferase (GGT), considerados marcadores periféricos de dano hepático. Além disso, foi observado que o tratamento com HBG foi capaz de aumentar a concentração de ferro total na prole imatura sugerindo hemocromatose secundária e, também aumentou a concentração de ferro livre no organismo dos animais, de modo que o Fe^{2+} , via reação de Fenton, levou à formação de EROs. Estes eventos foram acompanhados de morfologia hepática inalterada (RIEG, 2016).

A partir destes resultados, foi hipotetizado que poderiam estar ocorrendo alterações também no intestino destes animais, devido sua relevância como via de entrada de compostos toxicantes presentes na água e/ou alimentos contaminados. A relação cérebro-intestino tem interessado muitos pesquisadores, podendo ser chamado de “segundo cérebro” do corpo, devido a presença de neurônios e neurotransmissores. Foi demonstrado que a exposição materna a formulação comercial de HBG causa estresse oxidativo e inflamação no colón final da prole. Dessa forma, após a exposição, a microbiota intestinal (presente nas fezes) estará em contato com este composto. Sendo que os HBG inibem a via do Chiquimato presente em bactérias e essencial para produção de aminoácidos aromáticos. Foi demonstrado que a exposição a HBG interfere com a microbiota intestinal e afetam a histomorfologia intestinal. Os dados demonstram alterações ultra estruturais nas células intestinais. Além disso, observou-se diminuição no conteúdo de muco no intestino (HELLBRUGGE, 2019).

Por fim, a exposição materna ao HBG ocasionou uma perturbação no sistema cerebral, hepático e digestório, o que contribui para o entendimento dos processos relacionados à exposição de agrotóxicos. Sendo que outros estudos ainda devem realizados para investigar os mecanismos subjacentes relacionados a estes processos. A Figura 1 demonstra de forma esquemática os resultados acima citados.

Figura 1. Desenho esquemático de alterações em ratos imaturos após exposição materna a herbicida a base de glifosato (HBG)



A exposição materna a HBG provoca alterações no hipocampo, fígado, intestino e cólon final de ratos com 15 dias pós-natal, causando neurotoxicidade, hepatotoxicidade e interferência na microbiota e histomorfologia intestinal. ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. EROs: espécies reativas de oxigênio. GGT: gama glutamil transferase.

Fonte: Elaborado pelo autor, através do programa “Mind the Graph”. Disponível em: <https://mindthegraph.com/profile/katiuskamarins/infographic-145095>

Considerações Finais

Este trabalho objetivou demonstrar dados já obtidos pelo grupo de pesquisa em Bioquímica e Sinalização Celular da UFSC ao investigar os efeitos da exposição a HBG em organismos não alvo, como os mamíferos. Foi demonstrado que os HBG são danosos aos mamíferos quando na fase de desenvolvimento, por causarem toxicidade no sistema cerebral, hepático e digestivo, o que pode explicar, em parte, o processo de intoxicação decorrentes da exposição a esta classe de agrotóxicos.

Ademais, o entendimento de alvos celulares e moleculares, bem como das vias de sinalização da ação destes agrotóxicos, poderão fornecer futuros alvos para intervenção terapêutica, preventiva e/ou diagnóstica em prol da melhora na qualidade de vida dos indivíduos expostos e na diminuição dos riscos de desenvolvimento de patologias supostamente associadas à sua exposição crônica. Bem como, fornece evidências aos órgãos regulamentadores quanto ao controle do uso destas substâncias.

Referências

ABRASCO. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. **Dossiê ABRASCO**: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Organização: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÜRIGO, A. C. Rio de Janeiro: EPSJV. São Paulo: Expressão Popular, 624 p., 2015.

ANVISA (2016). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA): Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Gerência-Geral de Toxicologia. Brasília, 25 de novembro de 2016. Acessado em: 02/06/2018. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/2782895/Relat%C3%B3rio+PARA+Vers%C3%A3o+Final/1230de7d-306d-4249-a62c-a68708fab153>>.

ANVISA (2017a). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regularização de Produtos – Agrotóxicos**. Acessado em: 03/06/2018. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>>.

ANVISA (2017b). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Glifosato prossegue sob análise na Anvisa**. Acessado em: 03/06/18. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>.

ANVISA (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica nº 23/2018/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA**. Apresenta a Nota Técnica Preliminar sobre as conclusões da reavaliação do Glifosato com as respectivas recomendações e proposta de minuta de RDC a ser submetida à consulta pública. Acessado em 11/07/2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5344168/1.+Nota+T%C3%A9cnica+-+Glifosato.pdf/d071af2d-5cb4-4443-b210-4bc43f2216b8>>.

ARANHA, A.; ROCHA, L. “Coquetel” com 27 agrotóxicos foi achado na água de 1 em cada 4 municípios. **Por trás do alimento**. Acessado em 11/07/2019. Disponível em: <<https://portrasdoalimento.info/2019/04/15/coquetel-com-27-agrotoxicos-foi-achado-na-agua-de-1-em-cada-4-municipios/>>.

BRASIL, V. L. M.; RAMOS PINTO, M. B.; BONAN, R. F.; KOWALSKI, L. P.; DA CRUZ PEREZ, D. E. Pesticides as risk factors for head and neck cancer: A review. **J Oral Pathol Med**. v. 47, n. 7, p. 641-651, 2018.

BRASIL (2016). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 141 p. Acesso em: 11/07/2019. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agrotoxicos_otica_sistema_unico_saude_v1_t.1.pdf>.

BRASIL (2011). **Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2012**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Acessado em: 14/07/2019. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html?mobile>.

CATTANI, D.; CESCINETTO, P. A.; TAVARES, M. K.; PARISOTTO, E. B.; De OLIVEIRA, P. A.; RIEG, CEH.; LEITE, M. C.; PREDIGER, R. D. S.; WENDT, N. C.; RAZZERA, G.; FILHO, D. W.; ZAMONER, A. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**. v. 15, n. 387, p. 67-80, 2017.

CATTANI, D.; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. L.; HEINZ RIEG, C. E.; DOMINGUES, J. T.; DAL-CIM, T.; TASCA, C. I.; MENA BARRETO SILVA, F. R.; ZAMONER, A. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**. v. 5, p. 34-45, 2014.

EPA (1993). U.S. EPA: United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticide, Programs and Toxic Substances. **Reregistration Eligibility Decision (RED) Glyphosate**. EPA-738-R-93-014. Washington, DC, U.S.A. Acesso em: janeiro 2017. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-417300_1-Sep-93.pdf>.

HELLBRUGGE, A. **Exposição materna ao herbicida a base de glifosato e sua relação com a microbiota, histomorfologia intestinal e estado redox no duodeno e cólon da prole**. 2019. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – UFSC, Centro de Ciências Biológicas, Florianópolis.

SCHINASI, L.; LEON, M. E. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 4, p. 4449-527, 2014.

SEALEY, L. A.; HUGHES, B. W.; SRISKANDA, A. N.; GUEST, J. R.; GIBSON, A. D.; JOHNSON-WILLIAMS, L.; PACE, D. G.; BAGASRA, O. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. **Environ Int**, v. 88, p. 288-298, 2016.

SILVA, W. B. da. Os riscos no uso indiscriminado de agrotóxicos: uma contaminação invisível. **Informativo Técnico do Semiárido**. v. 11, n. 1, p. 11-19, 2017.

PIGNATI, W. A.; SOUZA E LIMA, F. A. N. de; LARA, S. S. de; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; COSTA LEÃO, L. H. da; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017.

RIEG, C. E. H. **Consequências da exposição materna à formulação comercial contendo glifosato nos parâmetros bioquímicos e morfológicos em fígado e sangue periférico de ratos imaturos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – UFSC, Centro de Ciências da Saúde, Florianópolis.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, p. 117-165, 2000.