



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE A ESTABILIDADE
DE ERITRÓCITOS HUMANOS E DE *RATTUS NORVEGICUS*
EM SOLUÇÃO SALINA FISIOLÓGICA**

Estudante: **Humberto Gabriel Rodrigues**
Orientador: Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**
Co-orientador: Professor Dr. **Tales Alexandre Aversi-Ferreira**

UBERLÂNDIA, MG

2008

 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE A ESTABILIDADE
DE ERITRÓCITOS HUMANOS E DE *RATTUS NORVEGICUS*
EM SOLUÇÃO SALINA FISIOLÓGICA**

Estudante: **Humberto Gabriel Rodrigues**
Orientador: Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**
Co-orientador: Professor Dr. **Tales Alexandre Aversi-Ferreira**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética e Bioquímica (área de Bioquímica)

UBERLÂNDIA, MG
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R696e Rodrigues, Humberto Gabriel, 1983-
Efeito do glifosato sobre a estabilidade de eritrócitos humanos e de *Rattus norvegicus* em solução salina fisiológica / Humberto Gabriel Rodrigues. - 2008.
53 f.: il.

Orientador: Nilson Penha-Silva.

Co-orientador: Tales Alexandre Aversi-Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Membranas (Biologia) - Teses. 2. Eritrócitos - Teses. 3. Glifosato - Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II. Aversi-Ferreira, Tales Alexandre. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 576.314

 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE A ESTABILIDADE
DE ERITRÓCITOS HUMANOS E DE *RATTUS NORVEGICUS*
EM SOLUÇÃO SALINA FISIOLÓGICA**

Estudante: Humberto Gabriel Rodrigues

Comissão examinadora

Presidente: Prof. Dr. **Nilson Penha-Silva** (Orientador)

Examinador: Prof. Dr. **Cirano José Ulhoa**

Examinador: Prof^a Dr^a **Neide Maria da Silva**

Data da defesa: 28/02/2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para elaboração da dissertação de mestrado foram contempladas.

Prof. Dr. Nilson Penha-Silva
(Orientador)

DEDICATÓRIA

À Deus,
à minha mãe **Leonor David Rodrigues**,
às minhas irmãs **Isabel David Rodrigues** e **Israelita David Rodrigues**
e ao meu amigo e professor Dr. **Tales Alexandre Aversi-Ferreira**,
por permitir a realização de mais um sonho.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, todo poderoso, meu grande mestre, criador de todas as coisas, por iluminar meu caminho, prover minhas necessidades e me dar forças para seguir sempre em frente;

Aos meus **familiares** que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais;

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. **Nilson Penha-Silva**, por ter participado do meu crescimento científico, por toda ajuda e também pelas oportunidades oferecidas;

Ao meu co-orientador e amigo, Prof. Dr. **Tales Alexandre Aversi-Ferreira**, pelo grande privilégio de conviver e receber, no dia a dia, lições de ciência e de vida, que levarei comigo sempre;

À minha querida amiga **Maria Thereza Alves Batista**, que muito me ajudou nos ensaios práticos e pela ajuda oportuna em Goiânia;

À querida amiga **Lúbia Cristina Fonseca**, pelo apoio nos momentos difíceis e pela ajuda oportuna em Uberlândia;

Ao Amigo **Guilherme Nobre Lima do Nascimento** e aos colegas do LABINE (UFG), **Laryssa Campos**, **Rafael Nunes**, **Cristiene**, pela importante ajuda na finalização deste trabalho;

Às **Faculdades Integradas Pitágoras** e às **Faculdades Santo Agostinho**, de Montes Claros, por entenderem as minhas ausências e pelo incentivo;

Ao **Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica** da Universidade Federal de Uberlândia, que me acolheu como estudante e permitiu a realização deste trabalho;

E a todos os outros que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho;

Deixo aqui registrado meu muito obrigado!

SUMÁRIO

Abreviaturas	viii
Lista de figuras	ix
Apresentação	1
Capítulo 1- Fundamentação Teórica	3
Praguicidas e estabilidade de membranas biológicas	3
Introdução	4
Estrutura das membranas biológicas	4
Praguicidas	7
Glifosato	8
Fragilidade osmótica de eritrócitos	10
Considerações finais	12
Referências bibliográficas	14
Capítulo 2 - trabalho experimental	26
Efeito do glifosato sobre a estabilidade de eritrócitos humanos e de <i>Rattus</i> <i>norvegicus</i> em solução salina fisiológica	26
Resumo	27
Abstract	28
Introdução	29
Material e métodos	33
Coleta das amostras de sangue	33
Reagentes e equipamentos	33
Determinação da estabilidade de eritrócitos em solução salina Fisiológica sob concentrações crescentes de glifosato	33
Determinação das curvas de transição de lise dos eritrócitos	34
Análise dos eritrócitos por microscopia de luz	34
Edições de gráficos e análises estatísticas	34
Resultados	35
Discussão	41
Conclusões	44
Referências bibliográficas	45

ABREVIATURAS

A ₁	Absorvância com valor mínimo de hemólise
A ₂	Absorvância com valor máximo de hemólise
A ₅₄₀	Absorvância a 540 nm
AChE	Acetilcolinesterase
AIA	Ácido indolacético
D	Desnaturante (concentração de glifosato)
D ₅₀	Concentração de glifosato que produz 50% de hemólise
dD	Amplitude da transição sigmoidal entre A ₁ e A ₂
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPSPS	5-enolpiruvoil-shikimato-3-fosfato-sintetase
FOE	Fragilidade osmótica de eritrócitos
OCP	Pesticida organoclorado
Salina	Solução de NaCl a 0,9 g.dL ⁻¹

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estabilidade de eritrócitos humanos em função da concentração de glifosato em solução salina fisiológica. As amostras de sangue foram colhidas usando-se heparina (A) ou EDTA (B) como anti-coagulante. 37

Figura 2: Fotomicrografias, em aumento original, de eritrócitos humanos (400x) em solução salina fisiológica de glifosato a 5 (A, 400x), 26 (B, 1000x) e 30 $\mu\text{L/dL}$ (C, 400x e D, 1000x). Sob concentrações de glifosato anteriores à transição sigmoidal de lise (A e B), os eritrócitos estão íntegros, porém com menores volumes sob a concentração mais alta de glifosato (B). Em glifosato a 30 $\mu\text{L/dL}$, bem próximo à linha de lise, os eritrócitos estão também murchos (C), mas apresentam espículas visíveis à microscopia de luz (D). 38

Figura 3: Estabilidade de eritrócitos de ratos em função da concentração de glifosato em solução salina fisiológica. As amostras de sangue foram colhidas usando-se heparina como anti-coagulante. 39

Figura 4: Fotomicrografias, em aumento original, de eritrócitos de ratos em solução salina fisiológica de glifosato a 12 (A, 400x), 26 (B, 1000x), 36 (C, 1000x) e 40 $\mu\text{L/dL}$ (D, 1000x). Os eritrócitos estão íntegros sob concentração de glifosato anterior à transição sigmoidal de lise (A), mas lisados nas demais concentrações (B, C e D). 40

APRESENTAÇÃO

Os praguicidas são agentes bioativos que podem prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis que interferem na produção, processamento, armazenamento e transporte de alimentos, agroprodutos, madeira e seus derivados. Eles compreendem várias substâncias com diferentes grupos funcionais, cada uma com seu modo particular de ação sobre alvos biológicos e ação danosa à natureza.

Atualmente os praguicidas são encontrados contaminando todo o planeta, em diferentes nichos ecológicos, onde ameaçam a sobrevivência de várias espécies. É a agricultura seu principal meio de introdução no ambiente. Eles causam vários problemas à saúde humana quando inalados, absorvidos pela pele ou pelo sistema digestivo, a partir da ingestão gradativa de praguicidas presentes na água e nos alimentos.

A integridade de membrana de células animais pode ser afetada por vários fatores que, particularmente para a membrana de eritrócitos, compreendem o atrito contra a parede do vaso determinado pela velocidade do fluxo sanguíneo, a temperatura e a presença de agentes químicos. A presença de agentes químicos pode interferir na estrutura ou função da membrana por alteração nas propriedades físico-químicas do plasma, como pH, osmolaridade ou comportamento dielétrico, ou pela oxidação de constituintes da membrana, dentre outros mecanismos.

Os eritrócitos constituem um modelo de fácil obtenção, barato e conveniente, pela natureza cromogênica da hemoglobina, para estudo do comportamento das membranas biológicas.

Eles podem ser utilizados para avaliação dos efeitos de praguicidas sobre a saúde humana e animal, o que é considerado um tema de elevada prioridade por autoridades científicas e governamentais, particularmente nos países em desenvolvimento, onde estes agentes químicos são utilizados de forma ampla e muitas vezes abusiva na produção agrícola.

O Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia padronizou técnicas de análise da estabilidade de membranas de eritrócitos

contra choque hipotônico e agentes caotrópicos naturais, como o etanol, a uréia e a temperatura.

Neste trabalho, a estabilidade de eritrócitos contra choque hipotônico, é analisada em função da concentração do praguicida glifosato.

O **capítulo 1** dessa dissertação faz uma revisão da literatura, buscando contextualizar os efeitos dos praguicidas sobre as membranas biológicas e o uso da estabilidade de eritrócitos como ferramenta para sua avaliação.

O **capítulo 2** apresenta os estudos dos efeitos agudos de um praguicida (glifosato), nas concentrações recomendadas pelo fabricante, sobre a estabilidade de eritrócitos humanos e de ratos Wistar.

CAPÍTULO 1

Fundamentação teórica

PRAGUICIDAS E ESTABILIDADE DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

INTRODUÇÃO

A ampla utilização de praguicidas na atualidade, o desconhecimento de seus riscos, o desrespeito às normas básicas de segurança, a livre comercialização e o conseqüente agravamento dos quadros de contaminação humana e ambiental, tornam importante o estudo e a avaliação dessas substâncias na saúde humana e animal. Nessa revisão da literatura, procuramos mostrar quais são as implicações dos praguicidas e principalmente do herbicida glifosato na saúde humana e no ambiente. A estabilidade de membrana dos eritrócitos é essencial para a preservação das funções dessas células sanguíneas, e, conseqüentemente, para todo o metabolismo aeróbico nos tecidos. Isso torna o estudo do efeito de agentes químicos, como os praguicidas comerciais, sobre a estabilidade de membrana dos eritrócitos uma tarefa essencial para caracterização da toxicidade dessas substâncias.

ESTRUTURA DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

As células, bem como suas organelas sub-celulares, são delimitadas por membranas, que geram compartimentos especializados em diferentes funções metabólicas [LODISH et al., 2003].

Segundo o modelo do mosaico fluido, a membrana biológica é um fluido constituído por uma bicamada de lipídios, onde se acham inseridas várias moléculas de proteínas [SINGER e NICOLSON, 1972]. As proteínas podem constituir de 20 a 80% da composição das membranas [DE WEER, 2000].

Dentre os principais lipídios presentes nas membranas podemos citar os fosfolipídios, os esfingolipídios e os esteróis [CASCIO, 2005]. Os lipídios das membranas são moléculas anfipáticas, ou seja, que possuem uma porção polar juntamente com uma porção apolar em sua estrutura. Os lipídios estão dispostos em dupla camada, sendo que as porções polares dos lipídios ficam expostas para o meio aquoso, seja o meio citoplasmático ou o meio extracelular; já as porções apolares dos lipídios se dirigem umas para as outras no interior da bicamada lipídica [BOON e SMITH, 2002].

As proteínas estão mergulhadas na bicamada (proteínas intrínsecas) ou estão na superfície interna ou externa da bicamada lipídica (proteínas extrínsecas) [LAGUE et al., 2001].

As proteínas são constituintes importantes na estrutura e propriedades da membrana dos eritrócitos. A rede de proteínas que formam o citoesqueleto e proteínas integrais de membranas está envolvida na manutenção da integridade e da forma da célula [BENNETT, 1981; CHASIS, 1986; PALEK, 1983].

A glicoforina A e a proteína banda 3 são as principais proteínas transmembrânicas. A glicoforina A é rica em carboidratos, que conferem carga negativa aos eritrócitos e impedem sua aglutinação. A proteína banda 3 está inserida na dupla camada lipídica, onde funciona como transportador de ânions e água para a célula, além de manter ligações com as proteínas periféricas anquirina e espectrina, que fixam a membrana ao citoesqueleto [ALBERTS et al, 1997; LORENZI, 1999].

A estabilidade da membrana do eritrócito depende de proteínas associadas ao citoesqueleto, tais como a espectrina, a actina (proteína banda 5), a anquirina (proteína banda 2.1), proteína banda 4.1, proteína banda 4.2 e a proteína banda 4.9 [BENNETT, 1981; LORENZI, 1999; PALEK, 1983].

A proteína mais abundante na membrana é a espectrina, a qual tem uma forma cilíndrica longa, fina e flexível. Ela é o principal componente da rede protéica no lado interno da membrana do eritrócito. Ela mantém a integridade estrutural e a forma bicôncava do eritrócito além de estar intimamente relacionada à rigidez da membrana [ALBERTS et al, 1997].

As membranas de organelas subcelulares tais como mitocôndrias e núcleos raramente contêm colesterol [HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1999]. O colesterol desempenha um papel fundamental em muitos processos biológicos tais como: permeabilidade da membrana, organização lateral de lipídios, transdução de sinais e passagem de substâncias através da membrana [WUSTNER, 2007]. Quanto maior a quantidade de esteróis menor é a fluidez da membrana (facilidade de movimento) e maior é a rigidez da membrana [TSUDA e NISHIO, 2003], devido à presença do núcleo rígido do anel esteróide, o qual diminui a liberdade de rotação das ligações carbono-carbono [MURRAY e GRANNER, 2002].

As duas monocamadas da membrana não possuem a mesma composição lipídica, glicídica e protéica, os que as tornam estruturas assimétricas [DI et al., 2006]. Em geral, os glicídios encontram-se na face externa [ROBERTSON, 1957; ROBERTSON, 1960] e as cargas elétricas se distribuem diferentemente, sendo a face citoplasmática aquela que em geral tem maior carga líquida negativa.

A fluidez da membrana é essencial para várias funções celulares [GARCÍA et al., 2005]. Ser uma estrutura fluida significa dizer que os seus componentes não ocupariam posições definidas e seriam susceptíveis de sofrer difusão lateral no plano da membrana [FRICK et al., 2007; SINGER, 1974], além de translação e rotação [GOLDSTEIN, 1984]. Isso acontece devido ao fato de não ocorrer ligações fortes (covalentes) entre as moléculas, mas sim ligações fracas (ligações de van der Waals e pontes de hidrogênio) [MURRAY e GRANNER, 2002].

As membranas biológicas são semi-permeáveis, ou seja, apresentam permeabilidade diferenciada, sendo impermeável aos íons, quem demandam canais iônicos de transporte através da membrana [GODBERG et al., 2004], mas permeável à moléculas lipossolúveis, à água [AGRE, 2006] e a gases como o oxigênio e o gás carbônico [WANG et al., 2007].

A integridade da membrana animal pode ser afetada por vários diferentes fatores principalmente por ela não possuir parede celular como as células vegetais e bacterianas. A ausência dessa integridade pode comprometer a fisiologia celular e até levar a célula afetada a morte [MCNEIL e STEINHARDT, 1997].

Os eritrócitos ou células vermelhas do sangue são utilizados em muitos estudos relacionados com estrutura, composição e ao comportamento de membrana. Alterações na estrutura, composição e comportamento da membrana dos eritrócitos, ocorrem em decorrência de diversos tipos de hemoglobinopatias, de envelhecimento, exercícios físicos, dieta, ingestão de etanol e interação com praguicidas [BATISTA et al., 2006; FIRMINO, 2007; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; MARIGLIANO et al., 1999; MARRA et al., 1996; MAZZANTI et al., 2002; PENHA-SILVA et al., 2007; SRINIVASAN e KEMPAIAH, 2006].

PRAGUICIDAS

Apesar da sua aplicação em outros setores, a agricultura tem sido a maior fonte de contaminação ambiental por praguicidas [BASTOS, 1999]. Alguns praguicidas e seus metabólitos têm sido encontrados como poluentes no fundo e superfície de águas, no solo [FAVA et al., 2005; KOLPIN et al., 2004; WORRALL e BESIEN, 2005], e na atmosfera [DUBUS et al., 2000; DUYZER, 2003] e são provavelmente responsáveis pela perda da biodiversidade e pela deterioração de *habitats* naturais [PAULI et al., 1999].

O aumento da consciência dos riscos relacionados ao uso intensivo de praguicidas tem levado a própria sociedade agrícola a uma atitude mais crítica, assumindo mudanças no seu uso para evitar danos ambientais e gerar maior segurança alimentar [SABA e MESSINA, 2003]. Os praguicidas compreendem uma grande variedade de substâncias químicas, com diferentes grupos funcionais e diferentes mecanismos de ação biológica e de eliminação. Dentre as classes químicas encontradas há compostos organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, ditiocarbamatos, organoestênicos, dicarboximidas, biperidílios, dinitrofenóis, além de outros [INCA, 2005].

Os praguicidas oferecem vários riscos à saúde humana [HAPEMAN et al., 2003; SORENSEN et al., 2003].

Os pesticidas organoclorados (OCPs) têm sido associados a distúrbios na reprodução [SAFE, 2004], na embriogênese e desenvolvimento fetal [GARRY et al., 1996], na imunidade [HANDY et al., 2002], na respiração, e neurogênese e atividade do sistema neural, com predisposição ao desenvolvimento de doença de Parkinson [KAMEL e HOPPIN, 2004]. Apesar de terem sido banidos a mais de 30 anos, os praguicidas organoclorados ainda estão presentes no ambiente, onde permanecem por décadas devido à sua longa meia-vida e concentração biológica através da cadeia alimentar [VON MUHLENDAHL, 1999].

Estudos “in vitro” mostraram que o praguicida organoclorado lindano despolariza a membrana de espermatozóides humanos e inibe sua resposta à progesterona, um agonista fisiológico que estimula um passo da reação do acrossomo no local da fertilização. O lindano se intercala na membrana do

espermatozóide e altera a dinâmica molecular da bicamada [SILVESTRONI e PALLESCHI, 1999].

Envenenamento de crianças tem sido associado com exposição materna aos praguicidas nas residências ou local de trabalho [CERRILLO et al., 2005; RIBAS-FITÓ et al., 2005; WHYATT et al., 2002], com detecção da presença de praguicidas organofosforados no leite humano [SANGHI et al., 2003].

O potencial neurotóxico de inseticidas organofosforados tem sido descrito [FARAHAT et al., 2003; SMULDERS et al., 2004]. Praguicidas organofosforados, conhecidos por seu efeito inibitório sobre a acetilcolinesterase, demonstraram em modelos experimentais animais, utilizando doses que são baixas para produzir sinais colinérgicos, uma variedade de outros efeitos, que variaram desde dificuldades na aprendizagem à retardamento da condução nervosa [PEEPLES et al., 2005].

O praguicida clorotalonil pode causar danos hepáticos e renais [SUZUKI et al., 2004] e, conseqüentemente, alterar o metabolismo e a excreção de drogas.

Em estudos feitos com ratos tratados oralmente com concentrações baixas e altas de piretróides, foram constatadas mudanças nas propriedades físico-químicas das membranas de eritrócitos e modificações na atividade de enzimas antioxidantes [NASUTI et al. 2003].

GLIFOSATO

Dentre os herbicidas, o Roundup® é o mais comum no Brasil [BAYLIS, 2000]. Ele tem como princípio ativo o glifosato (N-fosfometilglicina), cujo grupo funcional é uma glicina substituída. O uso desse herbicida na agricultura teve início em 1974 para o controle seletivo de ervas daninhas em lavouras de arroz, milho e soja [SMITH e OEHME, 1992].

O glifosato é vendido em concentrações de 48% (m/v) e as doses aplicadas são em torno de 5 L/ha [AMARANTE JUNIOR et al., 2002].

Atualmente, uma variedade de formulações contendo glifosato é produzida nos Estados Unidos, Europa, Ásia e América do Sul [BUKOWSKA et al., 2002] e

estão registradas em mais de 100 países, onde são comercializadas sob diferentes nomes [WILLIAMS et al., 2000].

A agência de proteção ambiental norte-americana [EPA-US, 1992], que classifica os herbicidas pela sua toxicidade aguda em quatro categorias, onde I é a categoria mais tóxica e IV é a menos tóxica, classifica o glifosato como um herbicida de categoria IV.

Embora a toxicidade aguda do glifosato seja considerada baixa, alguns autores [DALLEGRAVE et al., 2003; SAWADA, 1988; WHO, 2003] têm sugerido que o herbicida pode causar defeitos crônicos de nascimento em determinadas espécies de animais, quando administrado em doses elevadas e por um período prolongado; considerando sua bioacumulação no organismo, ele se torna potencialmente tóxico.

Os produtos à base de glifosato são mais tóxicos se inalados que absorvidos por via oral. A inalação de "Roundup" por ratos provocou toxicidade em todos os grupos testados com sintomas que consistiram de falta de ar, congestionamento nos olhos, redução da atividade e perda de peso [EPA-US, 1992].

Os sintomas da toxicidade aguda de glifosato em humanos incluem dores abdominais, vômitos, excesso de líquido nos pulmões, dores de cabeça, perda de consciência, destruição de células vermelhas do sangue [SAWADA, 1988], palpitações cardíacas, dormência facial, coceiras, formigamento [TEMPLE e SMITH, 1992], disfunção pulmonar, erosão do trato gastrointestinal [TALBOT, 1991; TEMPLE e SMITH, 1992; TOMINACK, 1991], alterações eletrocardiográficas, danos renais [MENKES et al, 1991; TEMPLE e SMITH, 1992; TOMINACK, 1991], danos na laringe [HUNG, 1997], riscos de ocorrência de linfoma não-Hodgkin, que pode dar metástases em muitos órgãos, e tumores intestinais [WHO, 2003].

Há também estudos que relacionaram o glifosato ao aumento da incidência de abortos entre a 12^a e a 19^a semana de gravidez em mulheres de fazendeiros expostas a esse herbicida, em Ontário, no Canadá [ARBACKIE et al, 2001].

O glifosato é um herbicida, não-seletivo, que inibe o crescimento de plantas através de interferência na produção de aminoácidos aromáticos essenciais. Ele inibe a enzima 5-enolpiruvato-shikimato-3-fosfato-sintetase (EPSPS), que é

responsável pela biossíntese do corismato, um intermediário na biossíntese da fenilalanina, triptofano e tirosina, fontes de metabólitos secundários como folatos, ubiquinonas e naftoquinas. O glifosato também inibe a síntese de clorofila, estimula a produção de etileno, reduz a síntese de proteínas e eleva a concentração do ácido indolacético (AIA) em vegetais [COLE, 1985; KRUSE et al., 2000; WILLIAMS et al., 2000].

O glifosato tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$. Na forma de sal de isopropilamônio, apresenta-se acrescido do grupo $(CH_3)_2CHNH_3^+$ [BCPC, 1994]. Em condições ambientais, tanto glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos, muito solúveis em água (12 g/L a 25 °C, para glifosato) e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, dentre outros. O glifosato funde-se a 200 °C, possui densidade de 0,5 g/cm³ e se apresenta bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60 °C [BCPC, 1994].

O glifosato é um “zwitterion” [CIKALO et al., 1996], com quatro grupos ionizáveis, cujos valores de pK são de 0,8; 2,16; 5,46 e 10,14 [AMARANTE JUNIOR et al., 2002; BCPC, 1994; MALLAT et al., 1998; PASTORE et al., 1990; WAUCHOPE, 1976]. Nas primeiras dissociações, saem os prótons ligados a oxigênio e, apenas na última dissociação, sai o próton ligado ao nitrogênio [CIKALO et al., 1996].

FRAGILIDADE OSMÓTICA DE ERITRÓCITOS

Para obter informações sobre a composição e a estrutura das membranas eritrocitárias, assim como averiguar os efeitos de substâncias na sua integridade, geralmente os pesquisadores usam várias abordagens bioquímicas, como o SDS-PAGE [ROSSI et al., 2006; WAGNER, 2002], impedância elétrica [IVANOV, 2007], aplicação de enzimas específicas [NASUTI et al., 2003], calorimetria [WAGNER, 2002], além de técnicas morfológicas, dentre as quais se incluem a microscopia óptica e as microscopias eletrônicas [MURRAY e GRANNER, 2002].

Um teste também bastante utilizado, de baixo custo e elevada eficiência na avaliação da estabilidade das membranas [ALDRICH, 2001; ELIAS et al., 2004;

IVANOV, 2007; MOECKEL et al., 2002], assim como na avaliação de efeitos toxicológicos de substâncias como os praguicidas sobre sua estabilidade, é a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) [BARAKAT, 2005; BATISTA et al., 2006; BHALLA e AGRAWAL, 1998; BLASIAK et al., 1991; NARENDRA, 2007; NASUTI et al., 2003; NISHIHARA e UTSUMI, 1983].

A FOE é constantemente usada no diagnóstico de hemoglobinopatias, principalmente esferocitoses, na avaliação do efeito de drogas sobre a hematopoiese [SIRICHOTIYAKUL et al., 2004] e na identificação de alterações de membrana em portadores de câncer cervical e de apnéia obstrutiva do sono [OZTÜRK et al., 2003].

A FOE expressa a habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico [ALDRICH, 2001]. Nesse tipo de teste é conveniente fazer um monitoramento da lise de eritrócitos mediante a leitura de absorvância da hemoglobina em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 540 nm [MOECKEL et al., 2002].

A osmolaridade com que a célula sofre lise relaciona-se a fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos destaca-se a forma e tamanho celular, razão área/volume, espécie e propriedades inerentes às membranas [BAUTISTA, 2003]. Segundo Maede [1980], em pacientes humanos, a FOE é influenciada pela quantidade de colesterol presente na membrana citoplasmática, tornando-se os eritrócitos mais resistentes à medida que aumenta o nível de colesterol sanguíneo. Eritrócitos nucleados são mais resistentes que eritrócitos não-nucleados. Os eritrócitos maiores são proporcionalmente mais resistentes que eritrócitos menores. Eritrócitos de animais ectotérmicos possuem maior resistência osmótica que os endotérmicos [ALDRICH, 2001]. A idade também exerce influência na FOE. Em humanos verifica-se que eritrócitos de prematuros possuem maior resistência do que de recém-nascidos e adultos [BAUTISTA, 2003]. O tempo de vida da célula também é muito importante, já que os eritrócitos senescentes, que correspondem a 30% da população eritrocitária, são mais frágeis do que os eritrócitos jovens [PERK et al., 1964].

Os fatores extrínsecos responsáveis pela redução da FOE compreendem variações fisiológicas, como as pós-prandiais, e também variações patológicas,

que incluem a presença de hematozoários, uremia, cirrose e processos autoimunes [MAKINDE e BOBADE, 1994].

Outro fator extrínseco cujos efeitos podem ser avaliados pela FOE são os praguicidas, principalmente os inseticidas e herbicidas [BARAKAT, 2005; BATISTA et al., 2006; BHALLA e AGRAWAL, 1998; BLASIAK et al., 1991; NARENDRA, 2007; NASUTI et al., 2003; NISHIHARA e UTSUMI, 1983].

A resistência osmótica diminuída em decorrência da exposição ao DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) já foi observada [NISHIHARA e UTSUMI, 1983] assim como mudanças na fragilidade osmótica de eritrócitos de ratos expostos a hexaclorocicloexano, um outro inseticida organoclorado [BHALLA e AGRAWAL, 1998].

Em 2005, Barakat utilizando-se de FOE, averiguou os efeitos de quatro inseticidas, “dursban” (organofosfatado), “lannate” (carbamato), “lindane” (organoclorado) e “decastrin” (piretróide), sobre eritrócitos humanos e de peixes (*Tilapia niloticus*) com concentrações variando de 10^{-10} a 10^{-4} M. Ele observou a ocorrência de hemólise em baixas concentrações de “lindane” e “decastrin” e em altas concentrações de “dursban” e “lannate”.

Em 2006, Batista e colaboradores observaram efeitos deletérios do herbicida glifosato sobre a estabilidade das membranas de eritrócitos humanos e de ratos Wistar mesmo dentro das concentrações indicadas pelo fabricante. Isso poderia justificar o aparecimento de sintomas como hipóxia, tontura, dores de cabeça, dentre outros, presentes em indivíduos que se expõem a àquele herbicida [DELGADO e PAUMGARTTEN, 2004].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos recentes têm demonstrado que o glifosato, o herbicida mais utilizado na agricultura e considerado de baixo risco pela associação de proteção ambiental dos Estados Unidos da América (EPA-US), afeta a estabilidade de eritrócitos dentro das concentrações indicadas pelos fabricantes. As características da intoxicação por esse praguicida podem pelo menos em parte ser explicadas pela hipóxia decorrente da lise de eritrócitos. Como todos os

estudos sobre praguicidas têm demonstrado, cuidados na utilização e precauções para se evitar contaminação do ambiente são essenciais. É ainda incipiente, mas os pesticidas podem estar associados com a aquisição de demências associadas ao envelhecimento. A bioacumulação desses pesticidas no ambiente e organismo humano deve ser considerada um grande problema de saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRE, P. The aquaporin water channels. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 3, n. 1, p. 5-13, 2006.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ALDRICH, K.; SAUNDERS, D.K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 26, p. 179-182, 2001.

AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ARBACKIE, T.E.; LIN, Z.; MERT, L.S. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population, **Environ. Health Perspect.**, v. 109, p. 851-857, 2001.

BARAKAT, K.K. Effect of certain insecticides on the stabilization and lysis of human and fish erythrocyte. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 1, n. 2, p. 195-199, 2005.

BASTOS, L. H. **Investigação da contaminação do solo por organoclorados, na Cidade dos Meninos, Duque de Caxias, RJ, avaliação dentro de um novo cenário, após adição de cal**. 1999. 175 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

BATISTA, M.T.A.; RODRIGUES, H.G.; FONSECA, L.C.; BONETTI, A.M.; PENHA-SILVA, N.; NERES, A.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3 (supl.), n. 2, p. 22-24, 2006.

BAUTISTA, M.L.G.; ALTAF, W.; LALL, R.; WAPNIR, R.A. Corde blood red cell osmotic fragility: a comparison between preterm and full-term newborn infants. **Early Human Development**, v. 72, p. 37-46, 2003.

BAYLIS, A.D. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. **Pest Manag. Sci.**, v. 56, p. 299-308, 2000.

BCPC (British Crop Protection Council). **The Pesticide Manual**: incorporating the agrochemicals handbook; 10 ed., Surrey: Tomlin, 1994.

BENNETT, V. Proteins involved in membrane-cytoskeleton association in human erythrocytes: spectrin, ankyrin, and band 3. **Meth. Enzymol.**; v. 96, p. 313-324, 1981.

BHALLA, P.; AGRAWAL, D. Alterations in rat erythrocyte membrane due to hexachlorocyclohexane (technical) exposure. **Hum Exp Toxicol.**; v. 17, n. 11, p. 638-42, nov. 1998.

BLASIAK, J.; WALTER, Z.; GAWRONSKA, M. The changes of osmotic fragility of pig erythrocytes induced by organophosphorus insecticides. **Acta Biochim Pol.**, v. 38, n. 1, p. 75-8, 1991.

BOON, J.M.; SMITH, B.D. Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, n. 3, p. 251-128, maio, 2002.

BUKOWSKA, B.; PIENIAZEK, D.; DUDA, W. Hemolysis and lipid peroxidation in human erythrocytes incubated with roundup. **Current Topics in Biophysics**, v. 26, n. 2, p. 245-249, 2002.

CASCIO, M. Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1711, n. 2, p. 142-153, jun., 2005.

CERRILLO, I.; GRANADA, A.; LÓPEZ-ESPINOSA, M. J.; OLMOS, B.; JIMÉNEZ, M.; CANÓ, A.; OLEA, N.; OLEA-SERRANO, M. F. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. **Environmental Research**, v. 98, n. 2, p. 233–239, jun., 2005.

CHASIS, J.A.; MOHANDAS, N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. **J. Cell Biol.**, v. 103, p.343-350, 1986.

CIKALO, M. G.; GOODAL, D. M.; MATHEWS, W. Analysis of glyphosate using capillary electrophoresis with indirect detection. **Journal of Chromatography**, v. 745, n.12, p.189-200, 1996.

COLE, D. J. **Mode of action of glyphosate - a literature analysis**. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). The herbicide glyphosate, p. 49-54. Londres: Butterworths, 1985.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F.D.; COELHO, R.S.; PEREIRA, J.D.; DALSENTER, P.R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 45-52, 2003.

DE WEER, P. A century of thinking about cell membranes., **Annual Review of Physiology**, v. 62, n.1, p. 919-926, 2000.

DELGADO, I.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Intoxicações e usos de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, p. 180-185, jan-fev, 2004.

DI, L.; LIU, W.; LIU, Y.; WANG, J.Y. Effect of asymmetric distribution of phospholipids ghost membrane from rat blood on peroxidation induced by ferrous ion. **FEBS Letters**, v. 580, p. 685-690, dezembro, 2006.

DUBUS, I.G.; HOLLIS, J.M.; BROWN, C.D. Pesticides in rainfall in Europe. **Environmental Pollution**, v.110, n. 2, p.331-344, nov., 2000.

DUYZER, J. Pesticide concentrations in air and precipitation in the Netherlands. **Journal of Environmental Monitoring**. v.5, n.4, p.77N-80N, 2003.

ELIAS, F.; LUCAS, S.R.R.; HAGIWARA, M.K.; KOGIKA, M.M.; MIRANDOLA, M.S. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 413-418, mar-abr, 2004.

EPA-US (Environmental Protection Agency U.S). Pesticide Tolerance for Glyphosate, **Federal Register**. v. 57, p. 8739-8740, 1992.

FARAHAT, T.M.; ABDELRASOUL, G.M.; AMIR, M.M.; SHEBL, M.M.; FARAHAT, F.M.; ANGER, W.K. Neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides. **Occupacional Environmental Medicine**, v. 60, n. 4, p. 279-286, april, 2003.

FAVA, L.; ORRÙ, M.A.; CROBE, A.; CARACCILOLO, A.B.; BOTTONI, P.; FUNARI, E. Pesticide metabolites as contaminants of groundwater resources: assessment of the leaching potential of endosulfan sulfate, 2,6-dichlorobenzoic acid 3,4-dichloroaniline 2,4-dichlorophenol and 4-chloro-2-methylphenol. **Microchemical Journal**, v.79, n. 1-2, p. 207-211, jan., 2005.

FIRMINO, C.B. **Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos**. Uberlândia, 2007. 89f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

FRICK, M.; SCHMIDT, K.; NICHOLS, B.J. Modulation of Lateral Diffusion in the Plasma Membrane by Protein Density. **Current Biology**, v. 17, n. 5, p. 462-467, mar., 2007.

GARCÍA, J.J.; MARTÍNEZ-BALLARÍN, E.; MILLÁN-PLANO, S.; ALLUÉ, J.L.; ALBANDEA, C.; FUENTES, L.; ESCANERO, J.F. Effects of trace elements on membrane fluidity. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 19, n. 1, p. 19-22, sep., 2005.

GARRY, V.F.; SCHREINEMACHERS, D.; HARKINS, M.E.; GRIFFITH, J. Pesticide applicers, biocides, and birth defects in rural Minnesota. **Environmental Health Perspectives**, v.104, n.4, p. 394-399, april, 1996.

GOLDBERG, G.S., VALIUNAS, V.; BRINK, P.R. Selective permeability of gap junction channels. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1662, n. 1-2, p. 96-101, mar., 2004.

GOLDSTEIN, D.B. The effects of drugs on membrane fluidity. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 24, p. 43-64, 1984.

GOUVÊA-E-SILVA, L.F. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol**. Uberlândia, 2006, 53f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

HALLIWEL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. **Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death**. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York: OxfordUniversity Press; 1999. p. 246-350.

HANDY, R.D.; ABD-EL SAMEI, H.A.; BAYOMY, M.F.F.; MAHRAN, A.M.; ABDEEN, A.M.; EL-ELAIMY, E.A. Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. **Toxicology**, v. 172, n. 1, p. 13-34, mar., 2002.

HAPEMAN, C.J.; MCCONNELL, L.L.; RICE, C.P.; SADEGHI, A.M.; SCHMIDT,W.F.; MCCARTY, G.W.; STARR, J.L.; RICE, P.J.; ANGIER, J.T.; HARMAN-FETCHO, J.A. Current United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service research on understanding agrochemical fate and transport to prevent and mitigate adverse environmental impacts. **Pest Management Science**. v. 59, n. 6-7, p. 681–690, jun.-jul., 2003.

HUNG, D.; DENG. J.; WU, T. Laryngeal survey in glyphosate intoxication: a athophysiological investigation. **Hum. Exp. Toxicol**. v. 16, p. 596-599, 1997.

INCA - Instituto Nacional do Câncer - **Vigilância do Câncer Ocupacional e Ambiental**. Ministério da Saúde, 2005 [on line]. Disponível: <http://www.inca.gov.br/inca/arquivos/publicações/vigilanciadocancerocupacional.pdf>, [capturado em fevereiro de 2006].

IVANOV, IT.; TOLEKOVA, A.; CHAKAAROVA, P. Erythrocyte membrane defects in hemolytic anemias found through derivative thermal analysis of electric impedance. *J. Biochem.* **Biophys. Methods**, v. 70, p. 641–648, 2007.

KAMEL, F; HOPPIN, J.A. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environmental Health Perspectives*, v. 112, n. 9, jun., 2004.

KOLPIN, D.W.; SCHNOEBELEN, D.J.; THURMAN, E.M. Degradates provide insight to spatial and temporal trends of herbicides in ground water. **Ground Water**, v. 42, n. 4, p. 601-608, jul.-aug., 2004.

KRUSE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 139-146, 2000.

LAGUE, P.; ZUCKERMANN, M.J.; ROUX, B. Lipid-Mediated Interactions between Intrinsic Membrane Proteins: Dependence on Protein Size and Lipid Composition. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 1, p. 276-284, 2001.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSKY, S.L.; DARNELL, J. **Molecular cell biology**. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2003.

LORENZI, T.F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999.

MAEDE, Y. Studies on feline haemobartonellosis. VI. Changes of erythrocyte lipids concentration and their relation to osmotic fragility. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.42, n. 3, p. 281-288, 1980.

MAKINDE, M.O.; BOBADE, P.A. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Research in Veterinary Science**, v. 57, n. 3, p. 343-348, 1994.

MALLAT, E.; BARCELO, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ionexchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography – postcolumn derivatization with fluorescence detection. **J. Chromatogr. A.**, v. 823, p. 129-136, 1998.

MARIGLIANO, V.; TARZIA, A.; MODESTI, D.; MASELLA, R.; CANTAFORA, A.; BAUCO, C.; SALVATI, A.M.; SCUTERI, A.; CAPRARI, P. Aging and red blood cell

membrane: a study of centenarians. **Experimental Gerontology**, v. 34, n. 1, p., 47-57, 1999.

MAZZANTI, L.; FRANCESCHI, C.; NANETTI, L.; SALVOLINI, E.; STAFFOLANI, R.; MORETTI, N.; RABINI, R.A. Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 657-663, 2002.

MCNEIL, P.L.; STEINHARDT, R.A. Loss, restoration, and maintenance of plasma membrane integrity. **J. Cell Biol.**, 137, 1-4, 1997.

MENKES, D.B.; TEMLE, W.A.; Edwards, I.R. Intentional self-poisoning with glyphosate-containing herbicides. **Human Exp. Toxicol.** v. 10, n. 1, p.103-107, 1991.

MOECKEL, G.W., SHADMAN R., FOGEL J.M., SADRZADEH S.M.H. Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocytes membrane ATPase. **Life Sciences**, v. 71, n. 20, p. 2413-2424, 2002.

MURRAY, RK.; GRANNER, DK. **Membranas: estrutura, montagem e função.** In: Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. Harper's Biochemistry. 9a. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 919 p., cap. 43, p. 505-533, 2002.

NARENDRA, M.; BHATRACHARYULU, NC., PADMAVATHI, P.; VARADACHARYULU, NC. Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers. **Chemosphere**, v. 67, n. 6, p. 1065-1071, april, 2007.

NASUTI, C. CANTALAMESSA F. FALCIONI G. GABBIANELLI R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, v. 191, n. 2, p. 233-244, sep., 2003.

NISHIHARA, Y.; UTSUMI, K.; Diminished osmotic fragility and shape alterations of human erythrocytes following the treatment with 1,1,1-trichloro-2,2-bis(P-chlorophenyl) ethane (DDT). **Cell Mol Biol.**, v. 29, n. 1, p. 103-11, 1983.

OZTÜRK, L.; MANSOUR, B.; YÜKSEL, M.; GÖKHAN, N. Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 332, p. 83-88, 2003.

PALEK, J.; LUX, S. Red cell membrane skeleton defects in hereditary and acquired hemolytic anemias. **Semin. Hematol.**, v. 20, p.189-224, 1983.

PASTORE, P.; LAVAGNINI, I.; BOARETTO, A.; MAGNO, F. Ion Chromatographic Determination of N-nitrosoglyphosate in a Glyphosate Matrix. **Anal. Chim. Acta**, v. 230, p.29-34, 1990.

PAULI, B.D.; COULSON, D.R.; BERRILL, M. Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to Mimic ® 240 LV insecticide following single or double exposures. **Environmental Toxicology Chemical**. v. 18, n. 11, p. 2538-2544, nov., 1999.

PEEPLES, E. S.; SCHOPFER, L.M.; DUYSSEN, E. G.; SPAULDING, R.; VOELKER, T.; THOMPSON, C.M.; LOCKRIDGE, O. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry. **Toxicological Sciences**, v. 83, n. 2, p. 303-312, nov., 2004.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B.; REIS, F.G.F.; DA COSTA HUSS, J. C.; DE SOUZA, T. M. T.; DE FREITAS, M. V.; NETTO, R. C. M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. Mechanisms of ageing and development, v. 128, p. 444-449, 2007.

PERK, K.; FREI, Y.F.; HERZ, A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. **American Journal Veterinary Research**, v.25, p.1241-1248, 1964.

RIBAS-FITÓ, N.; GRIMALT, J.O.; MARCO, E.; SALA, M.; MAZÓN, C.; SUNYER, J. Breastfeeding and concentrations of HCB and p,p'-DDE at the age of 1 year. **Environmental Research**, v. 98, n. 1, p. 8-13, maio, 2005.

ROBERTSON, J. D. The cell membrane concept. **J. Physiol**, v. 140, p. 58-59, 1957.

ROBERTSON, J. D. The molecular structure and contact relationship of cell membranes. **Prog. Biophys. Biophys. Chem.**, v.10, p. 344-418, 1960.

ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. Membrane skeletal protein S-glutathionylation and hemolysis in human red blood cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 37, p. 180-187, 2006.

SABA, A.; MESSINA, F. Attitudes towards organic foods and risk/benefit perception associated with pesticides. **Food Quality and Preference**. v. 14, n. 8, p. 637-645, dec., 2003.

SAFE, S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. **Toxicology**, v. 205, n. 1-2, p. 3-10, dec, 2004.

SANGHI, R.; PILLAI, M. K.; JAYALEKSHMI, T. R.; NAIR, A. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. **Human & Experimental Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 73-76, feb., 2003.

SAWADA, Y. Probable toxicity of surface-active agent in commercial herbicide containing glyphosate, **Lancet**, v. 1, n. 8580, p. 299, 1988.

SILVESTRONI, L.; PALLESCHI, S. Effects of organochlorine xenobiotics on human spermatozoa. **Chemosphere**, v. 39, n. 8, p. 1249-1252, oct., 1999.

SINGER S. J. The molecular organization of membranes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 43, n. 1, p. 805-833, 1974.

SINGER, S.J.; NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p. 720-731,1972.

SIRICHOTIYAKUL, S.; TANTIPALAKON, C.; SANGUANSEMSRI, T.; WANAPIRAK, C.; TONGSONG, T. Erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia trait in pregnancy. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 86, p. 347-350, 2004.

SMITH, E.A., OEHME, F.W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 34, p. 531-543, 1992.

SMULDERS, C.J.G.M.; BUETERS, T.J.H.; VAILATI, S., VAN-KLEEF, R.G.D.M.; VIJVERBERG, H. P. M. Block of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by organophosphate insecticides. **Toxicological Sciences**, v. 82, n. 2, p. 545-554, sep., 2004.

SÖRENSEN, S.R., BENDING, G.D., JACOBSON, C.S., WALKER, A., AAMAND, J. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. **FEMS Microbiology Ecology**. v.45, n.1, p.1-11, jul., 2003.

SRINIVASAN, K.; KEMPAIAH, R.K. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 471-478, 2006.

SUZUKI, T., NOJIRI, H., ISONO, H., OCHI, T., 2004. Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil. **Toxicology**, v. 204, n. 2–3, p. 97-107, nov., 2004.

TALBOT, A.R.; SHIAW, M.H.; HUANG, J.S.; YANG, S.F.; GOO, T.S.; WANG, S.H.; CHEN, C.L.; SANFORD, T.R. Acute poisoning with a glyphosate-surfactant herbicide ('Roundup'): A review of 93 cases. **Human Exp. Toxicol.**, v. 10, n.1, p.1-8, 1991.

TEMPLE, W.A.; SMITH N.A. Glyphosate herbicide poisoning experience in New Zealand. **N.Z. Med. J.**, v. 105, p. 173-174, 1992.

TOMINACK, R.L.; YANG, G.Y.; TSAI, W.J.; CHUNG, H.M.; DENG, J.F. Taiwan National Poison Center: Survey of glyphosate-surfactant herbicide ingestions. **Clin. Toxicol.** V. 29, n. 1, p. 91-109, 1991.

TSUDA, K.; NISHIO, I. Membrane fluidity and hypertension. **American journal of hypertension**, v. 16, n. 3, p. 259-261, mar., 2003.

WAGNER, C.T.; MARTOWICZ, M.L.; LIVESEY, S.A.; CONNOR, J. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 45, p. 153-166, 2002.

WANG, Y.; COHEN, J.; BORON, W.F.; SCHULTEN, K.; TAJKHORSHID, E. Exploring gas permeability of cellular membranes and membrane channels with molecular dynamics. **Journal of Structural Biology**, v. 157, p. 534-544, jan., 2007.

WAUCHOPE, D. Acid dissociation constants of arsenic acid, methylarsonic acid (MAA), dimethylarsinic acid (cacodylic acid), and N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate). **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, n. 4, p. 717-721, 1976.

WHO (World Health Organization). **Glyphosate, Environmental Health Criteria**, v. 159, p. 1-177, 2003.

WHYATT, R.M.; CAMANN, D.E.; KINNEY, P.L.; REYES, A.; RAMIREZ, J.; DIETRICH, J.; DIAZ, D.; HOLMES, D.; PERERA, F.P. Residential pesticide use during pregnancy among a cohort of urban minority women. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n.5, p.507-514, 2002.

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

WORRALL, F.; BESIEN, T. The vulnerability of groundwater to pesticide contamination estimated directly from observations of presence or absence in wells. **Journal of Hydrology**, v. 303, n.1/4 , p. 92-107, mar., 2005.

WUSTNER, D. Fluorescent sterols as tools in membrane biophysics and cell biology. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 146, p. 1-25, dec., 2007.

CAPÍTULO 2

Trabalho experimental

**EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE A ESTABILIDADE
DE ERITRÓCITOS HUMANOS E DE *RATTUS NORVEGICUS*
EM SOLUÇÃO SALINA FISIOLÓGICA**

RESUMO

[EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS E DE *RATTUS NORVEGICUS* EM SOLUÇÃO SALINA FISIOLÓGICA]

A bio-acumulação de pesticidas pode afetar a saúde dos organismos vivos, segundo vários mecanismos diferentes, como a desnaturação de membranas. A avaliação dos efeitos deletérios de agentes químicos sobre as membranas pode ser feita pela análise da estabilidade de eritrócitos contra um gradiente de concentração de um determinado agente químico em solução salina fisiológica. Este trabalho analisou o efeito do herbicida glifosato sobre a membrana de eritrócitos humanos e de ratos contidos em amostras de sangue colhidas com EDTA ou heparina como anti-coagulante. Os resultados foram analisados por espectrofotometria a 540 nm e microscopia de luz. Houve coerência entre as análises espectrofotométricas e as análises morfológicas. Dentro da faixa de concentração recomendadas para uso na agricultura, o glifosato promoveu 100% de lise dos eritrócitos tanto em ratos como em humanos. A concentração de glifosato capaz de promover 50% de lise dos eritrócitos (D_{50}) foi significativamente menor em ratos do que em humanos. Os valores de D_{50} do glifosato obtidos para as amostras de sangue humano colhidas com EDTA não foram significativamente diferentes daqueles obtidos para amostras colhidas com heparina. Entretanto, as curvas de lise tiveram valores de absorvância em 540 nm mais baixos na presença de sangue colhido com EDTA em relação àquele colhido com heparina, provavelmente por precipitação de hemoglobina pelo EDTA.

Palavras chave: Glifosato, membranas, estabilidade, eritrócitos.

ABSTRACT

[EFFECT OF GLYPHOSATE ON THE STABILITY OF ERYTHROCYTES FROM HUMANS AND *RATTUS NORVEGICUS* IN PHYSIOLOGIC SALINE SOLUTION]

The bioaccumulation of pesticides can affect living organisms' health through several different mechanisms, such as membranes denaturation. The evaluation of the deleterious effects of chemical agents on biological membranes can be done by analysis of the erythrocytes stability against a concentration gradient of certain chemical agent in physiologic saline solution. This work analyzed the effect of the herbicide glyphosate on hemolysis of human and rats' bloods collected in EDTA or heparin as an anti-coagulant. The results were analyzed by spectrophotometry at 540 nm and light microscopy. There was an agreement between the spectrophotometric and the morphologic analyzes. At the concentration range recommended for agricultural purposes, glyphosate promoted 100% of hemolysis both in rats and in humans. The glyphosate concentration capable of promoting 50% of hemolysis (D_{50}) was significantly lower in rats than in humans. The D_{50} values of glyphosate obtained for the samples of human blood collected in EDTA were not significantly different than those obtained for the samples collected in heparin. However, the lysis curves presented lower values of absorbance at 540 nm in the presence of blood collected in EDTA in relation to that collected in heparin, probably due hemoglobin precipitation by EDTA.

Key-words: Glyphosate, membranes, stability, erythrocytes, toxicity.

INTRODUÇÃO

Apesar da sua utilização em outros setores, a agricultura tem sido a maior fonte de contaminação ambiental por praguicidas [BASTOS, 1999]. Alguns praguicidas e seus metabólitos têm sido encontrados como poluentes no fundo e na superfície de águas, no solo [FAVA et al., 2005; KOLPIN et al., 2004; WORRALL e BESIEN, 2005] e na atmosfera [DUBUS et al., 2000; DUYZER, 2003]. Eles são os prováveis responsáveis pela perda da biodiversidade e a deterioração de *habitats* naturais [PAULI et al., 1999]. O aumento da consciência dos riscos relacionados ao uso intensivo de praguicidas tem levado a uma atitude mais crítica pela sociedade agrícola para evitar futuros danos ambientais [SABA e MESSINA, 2003].

Os praguicidas oferecem risco à saúde humana [HAPEMAN et al., 2003; SÖRENSEN et al., 2003] e de animais.

Pesticidas organoclorados (OCPs) têm sido associados com disfunções reprodutivas [SAFE, 2004], embrionárias, respiratórias [GARRY et al., 1996], imunológicas [HANDY et al., 2002] e neurogênicas e neurais [FARAHAT et al., 2003; SMULDERS et al., 2004], com predisposição à doença de Parkinson [KAMEL e HOPPIN, 2004]. A ação neurotóxica de organofosforados [FARAHAT et al., 2003; SMULDERS et al., 2004] está associada ao próprio mecanismo de ação desses pesticidas, que inibem a acetilcolinesterase em doses e exarcebam os estímulos colinérgicos, gerando retardamento da condução nervosa e prejuízos cognitivos [PEEPLES et al., 2005]. As crianças lactentes podem ser envenenadas até mesmo pela ingestão do leite de mães expostas a estes pesticidas em suas residências ou locais de trabalho [CERRILLO et al., 2005; RIBAS-FITÓ et al., 2005; SANGHI et al., 2003; WHYATT et al., 2002].

Apesar de terem sido banidos a mais de 30 anos, como os praguicidas organoclorados permanecem no ambiente por décadas, devido a sua longa vida média, eles podem tornar-se biologicamente concentrados, pois movem-se através da cadeia alimentar [VON MUHLENDAHL, 1999]. Estudos “in vitro” têm mostrado que praguicidas organoclorados como o lindano despolarizam a membrana de espermatozóides humanos por se intercalar na membrana plasmática e alterar a dinâmica molecular da bicamada, inibindo a resposta à

progesterona, um agonista fisiológico que estimula um passo da reação do acrossomo no local da fertilização [SILVESTRONI e PALLESCHI, 1999]. O clorotalonil causa danos hepáticos e renais [SUZUKI et al., 2004], alterando o metabolismo e a excreção de drogas. Os piretróides geram mudanças nas propriedades físico-químicas da bicamada dos eritrócitos e modificações na atividade de enzimas antioxidantes [NASUTI et al., 2003].

Dentre os herbicidas, o Roundup[®] é o mais comum [BAYLIS, 2000] é o mais utilizado no Brasil. Ele tem como princípio ativo o glifosato (N-fosfonometilglicina), um derivado do aminoácido glicina. Suas propriedades foram descobertas e patenteadas em 1970 pela empresa Monsanto e o uso desse herbicida na agricultura iniciou-se em 1974 para o controle seletivo de ervas daninhas em lavouras de arroz, milho e soja [SMITH e OEHME, 1992].

Em geral, o glifosato é vendido em concentrações de 48% (m/v) e as doses aplicadas são em torno de 5 L/ha [AMARANTE et al, 2002].

A agência de proteção ambiental norte americana classifica o glifosato como um herbicida de categoria IV, menos tóxico [EPA-US, 1992].

Esse herbicida, não-seletivo, inibe o crescimento de plantas pela interferência na produção de aminoácidos aromáticos essenciais, especificamente por inibição da enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato-sintetase (EPSPS), que é responsável pela biossíntese do corismato, um intermediário na biossíntese da fenilalanina, triptofano e tirosina. A inibição da síntese de aminoácidos aromáticos afeta não só a síntese protéica, mas também a produção de outros metabólitos como folatos, ubiquinonas e naftoquinas, o que gera um impacto no metabolismo em geral e no processamento da informação genética, deprimindo a geração de energia e a síntese de clorofila e de proteínas. O glifosato também estimula a produção de etileno ácido indol acético (AIA) [COLE, 1985]. As inibições dessas vias metabólicas são exclusivamente efetivas nas plantas, pois não estão presentes em indivíduos do reino animal e em muitas bactérias [BUKOWSKA et al., 2002; KRUSE et al., 2000; WILLIAMS et al., 2000]. Mas como os animais, inclusive os humanos, se alimentam dessas plantas, alterações no valor nutricional dessas plantas poderiam ser causa de desnutrições seletivas.

Para se obter informações sobre a composição e a estrutura das membranas eritrocitárias, assim como averiguar os efeitos de substâncias na sua

integridade, geralmente usa-se várias abordagens bioquímicas, como o SDS-PAGE [ROSSI et al., 2006; WAGNER, 2002], impedância elétrica [IVANOV, 2007], aplicação de enzimas específicas [NASUTI et al., 2003], calorimetria [WAGNER, 2002], além de técnicas morfológicas, dentre as quais se incluem a microscopia óptica e as microscopias eletrônicas [MURRAY e GRANNER, 2002].

Um teste de baixo custo e elevada eficiência é a avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos (FOE), que avalia a quantidade de hemólise obtida na presença de um gradiente salino [ALDRICH, 2001; ELIAS et al., 2004; IVANOV, 2007; MOECKEL et al., 2002].

A FOE é constantemente usada no diagnóstico de hemoglobinopatias, principalmente esferocitoses, na avaliação do efeito de drogas sobre a hematopoiese [SIRICHOTIYAKUL et al., 2004] na identificação de alterações de membrana em portadores de câncer cervical e de apnéia obstrutiva do sono [OZTÜRK et al., 2003].

A FOE expressa a habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico [ALDRICH, 2001]. Nesse tipo de teste faz-se o monitoramento da lise de eritrócitos mediante a leitura de absorbância da hemoglobina em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 540 nm [MOECKEL et al., 2002].

A FOE também pode ser usada na avaliação dos efeitos tóxicos de praguicidas [BARAKAT, 2005; BATISTA et al., 2006; BHALLA e AGRAWAL, 1998; BLASIAK et al., 1991; NARENDRA, 2007; NASUTI et al., 2003; NISHIHARA e UTSUMI, 1983].

Um aumento na fragilidade osmótica de eritrócitos humanos em decorrência da exposição ao DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) já foi observado [NISHIHARA e UTSUMI, 1983]. Também já foram reportadas mudanças na fragilidade osmótica de eritrócitos de ratos expostos a hexaclorocicloexano, um outro inseticida organoclorado [BHALLA e AGRAWAL, 1998].

Barakat [2005] usou a FOE para avaliar os efeitos osmóticos de quatro inseticidas: (1) “dursban” (organofosfatado), (2) “lannate” (carbamato), (2) “lindane” (organoclorado) e (4) “decametrin” (piretróide) sobre eritrócitos humanos e de peixes (*Tilapia niloticus*) com concentrações variando de 10^{-10} a 10^{-4} mol.L⁻¹,

tendo observado ocorrência de hemólise em baixas concentrações de “lindane” e “deca-metrin” e em altas concentrações de “dusban” e “lannate”.

Um teste que constitui uma variação da FOE é a medida da estabilidade de membrana de eritrócitos em solução salina fisiológica sob um gradiente de concentração do agente químico a ser avaliado [AVERSI-FERREIRA, 2004; BATISTA, 2006; BERNARDINO NETO, 2006; CUNHA et al., 2007; CUNHA, 2007; DE FREITAS et al., 2008; FINOTTI, 2006; FIRMINO, 2007; GOUVEA-E-SILVA, 2006; PENHA-SILVA et al., 2007; REIS, 2007].

Esse teste foi utilizado para avaliação da estabilidade de membrana de eritrócitos humanos e de ratos em função do herbicida glifosato. Houve hemólise intensa na própria faixa de concentração indicadas pelo fabricante [BATISTA et al., 2006]. A ocorrência de hemólise, com prejuízo ao transporte de oxigênio para o cérebro, pode justificar o aparecimento de sintomas como hipóxia, tontura, dores de cabeça, dentre outros, presentes em indivíduos expostos a esse herbicida [DELGADO e PAUMGARTTEN, 2004].

Neste trabalho, nós estudamos o efeito do glifosato sobre estabilidade de membrana de eritrócitos humanos e de ratos, avaliando a ocorrência de hemólise por espectrofotometria a 540 nm e microscopia de luz. O efeito da natureza do anti-coagulante (EDTA ou heparina) foi também avaliado.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras de sangue

Amostras de 3 mL de sangue foram colhidas de 8 voluntários humanos do gênero masculino (com idade média de 24 ± 3 anos, saudáveis, não fumantes, não usuárias de medicamentos ou drogas e, especialmente, não consumidoras de bebidas alcoólicas) por punção endovenosa, após jejum noturno de 8 a 14 horas, e de 8 machos de ratos Wistar, por punção cardíaca.

Os ratos, com massa média de 300 g e idade média de 4 meses, foram mantidos agrupados em gaiola plástica em sala climatizada sob temperatura constante (26 ± 2 °C), com ciclos de luminosidade e escuridão de 12 h cada. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecida *ad libitum*.

As coletas de sangue foram feitas em tubos evacuados (Vacuntainer®) contendo 50 µL de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 1 g/dL, ou 50 µL de heparina como anti-coagulante.

Reagentes e equipamentos

O NaCl utilizado foi da marca Synth e tinha grau de pureza de 99,5%, o qual foi devidamente corrigido no preparo das soluções. As medidas de volume foram realizadas em bureta de vidro refratário e pipetas automáticas da marca Labsystems, modelo Finnpiette Digital. As medidas de massa foram feitas em uma balança digital da marca AND, modelo 870. As incubações foram feitas em banho termostático Marconi, modelo MA 184. As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro Micronal modelo B-442.

Determinação da estabilidade de eritrócitos em solução salina fisiológica sob concentrações crescentes de glifosato

Soluções com concentrações de 0 a 40 µL de glifosato em 100 mL de solução, com intervalo de 0,5 µL/dL até 5 µL/dL e, posteriormente, 2 µL/dL de solução, foram preparadas em solução salina fisiológica (NaCl a 0,9%). Esta faixa de concentração que está dentro do limite aceitável para uso do herbicida na agricultura, segundo o fabricante.

Baterias de tubos de ensaio (Eppendorff®) em triplicatas para as amostras de sangue contendo EDTA e em duplicata para as amostras de sangue contendo heparina, foram preparadas com 1 mL da solução teste e 10 µL de sangue. Após homogeneização e incubação a 37 °C por 30 minutos, os frascos foram centrifugados por 10 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi analisado por espectrofotometria visível a 540 nm. O sobrenadante e o precipitado foram usados para a confecção de esfregaços, corados com Leishman, para a análise por microscopia de luz.

Determinação das curvas de transição de lise dos eritrócitos

As dependências dos valores de A_{540} com as concentrações do glifosato foram ajustadas por linhas de regressão sigmoidal, dadas pela equação de Boltzmann,

$$A_{540} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(D - D_{50})/dD}} + A_2 \quad (1),$$

em que A_1 e A_2 representam os valores mínimo e máximo de hemólise, D é a concentração do glifosato, D_{50} representa a concentração do glifosato que causa 50% de hemólise e dD é a amplitude da transição sigmoidal entre A_1 e A_2 .

Análise dos eritrócitos por microscopia de luz

As análises microscópicas foram realizadas em microscópio Olympus, modelo CX-41, acoplado a uma câmera fotográfica Sonny. As imagens foram transferidas para um microcomputador, analisadas e impressas. Somente as fotomicrografias do experimento tendo heparina como anticoagulante foram analisadas.

Edições de gráficos e análises estatísticas

As edições de gráficos e análises estatísticas foram realizadas com o programa Origin 7.5 Professional (Microcal Inc., Massachusetts, EUA).

As linhas de regressão somente foram consideradas significantes quando P era menor do que 0,05. A comparação dos valores de D_{50} foi feita por análise de variância (ANOVA), com $P < 0,05$ indicando diferença estatisticamente significativa entre as médias.

RESULTADOS

A **Figura 1** apresenta os resultados obtidos para a dependência da absorvância em 540 nm, que reflete a intensidade de hemólise, com a concentração de glifosato em solução salina fisiológica, utilizando amostras de sangue humano colhidas com heparina (**Figura 1A**) e com EDTA (**Figura 1B**). Os valores de D_{50} ($N = 8$), que representam a concentração de glifosato capaz de promover 50% de hemólise, não foram significativamente diferentes ($P = 0,91$) quando foram determinados com amostras de sangue colhidas com heparina ($D_{50} = 30,01 \pm 3,62 \mu\text{L/dL}$) em relação às amostras colhidas com EDTA ($D_{50} = 29,83 \pm 2,86 \mu\text{L/dL}$), quando comparados por análise de variância (ANOVA).

Algumas das soluções consideradas na **Figura 1A**, que contém amostras de sangue humano colhidas com heparina, foram também analisadas por microscopia de luz. Os resultados foram mostrados na **Figura 2**. Numa concentração anterior à transição de lise ($5 \mu\text{L/dL}$) da curva sigmoidal (**Figura 1A**), os eritrócitos aparecem com aspecto murcho, alguns com forma oval, mas com limite celular intacto (**Figura 2A**). A $26 \mu\text{L/dL}$ de glifosato, concentração que também antecede o ponto de meia-transição de lise (D_{50}), os eritrócitos estão também íntegros, mas ainda menores, devido ao aumento da concentração de glifosato (**Figura 2B**). A $30 \mu\text{L/dL}$, bem próximo do valor de D_{50} ($30,01 \pm 3,62 \mu\text{L/dL}$), os eritrócitos aparecem com limites celulares espiculados (**Figura 2C**), junto com eritrócitos lisados (**Figura 2D**).

A **Figura 3** apresenta os resultados obtidos para a dependência da absorvância em 540 nm, com a concentração de glifosato em solução salina fisiológica, utilizando amostras de sangue de ratos colhidas com heparina (**Figura 3**). O valor médio de D_{50} foi de $25,75 \pm 1,53 \mu\text{L/dL}$.

Os valores de D_{50} obtidos para a ação do glifosato sobre eritrócitos de ratos ($N=8$) foram significativamente menores ($P = 0,0031$) do que os valores de D_{50} obtidos para as amostras de sangue humano ($N = 8$) colhidas com heparina ($30,01 \pm 3,62 \mu\text{L/dL}$), quando comparados por análise de variância (ANOVA).

Algumas das soluções consideradas na **Figura 3A**, que contém amostras de sangue de ratos colhidas com heparina, foram também analisadas por microscopia de luz. A uma concentração de glifosato anterior à transição da curva

sigmoidal (12 $\mu\text{L/dL}$), os eritrócitos aparecem com aspecto murcho, mas com limite celular intacto (**Figura 4A**). Nas concentrações de 26 (**Figura 4B**), 30 (**Figura 4C**) e 40 (**Figura 4D**) $\mu\text{L/dL}$ de glifosato, que estão além de D_{50} , os eritrócitos aparecem destruídos e com limite celular disforme (**Figura 4B, 4C e 4D**).

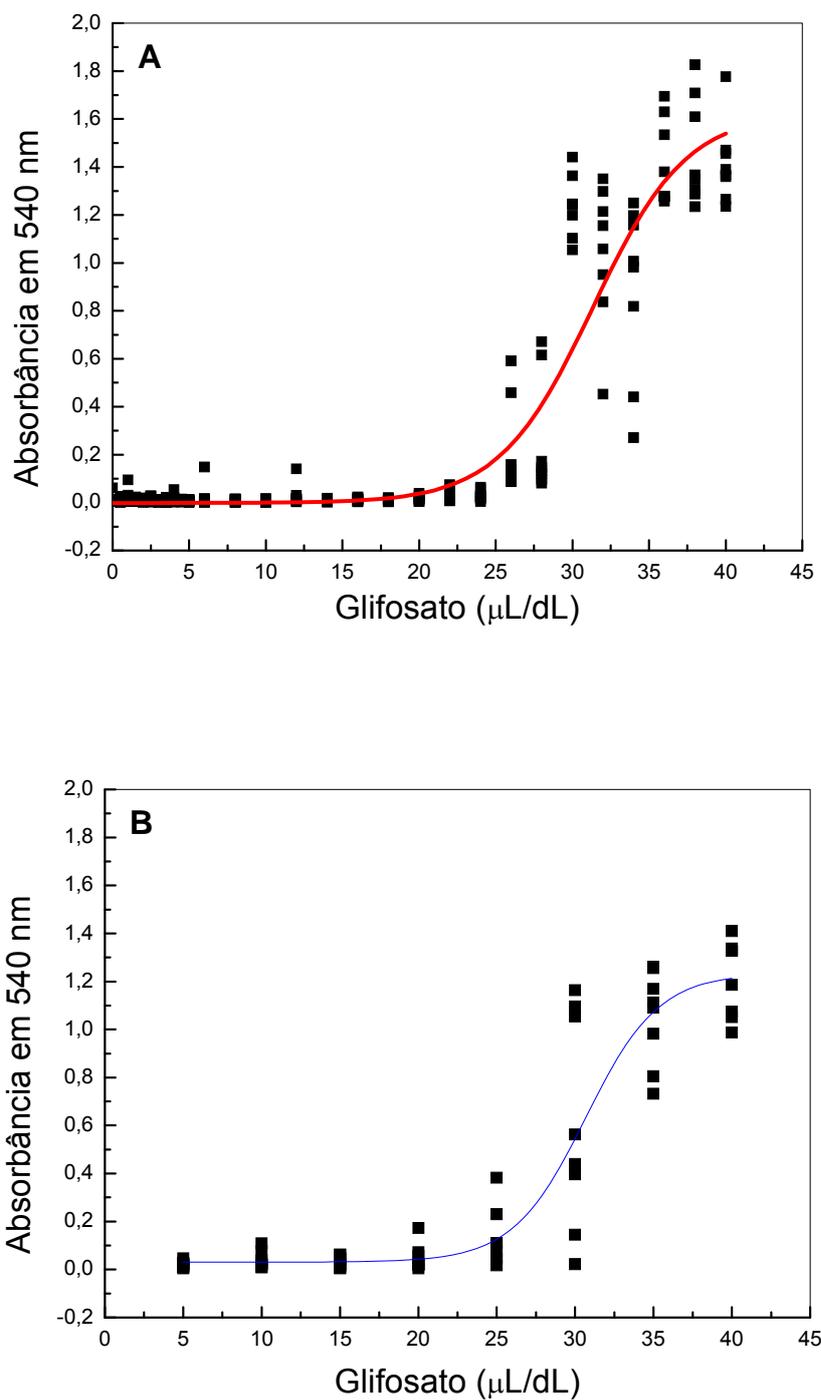


Figura 1: Estabilidade de eritrócitos humanos em função da concentração de glifosato em solução salina fisiológica. As amostras de sangue foram colhidas usando-se heparina (A) ou EDTA (B) como anti-coagulante.

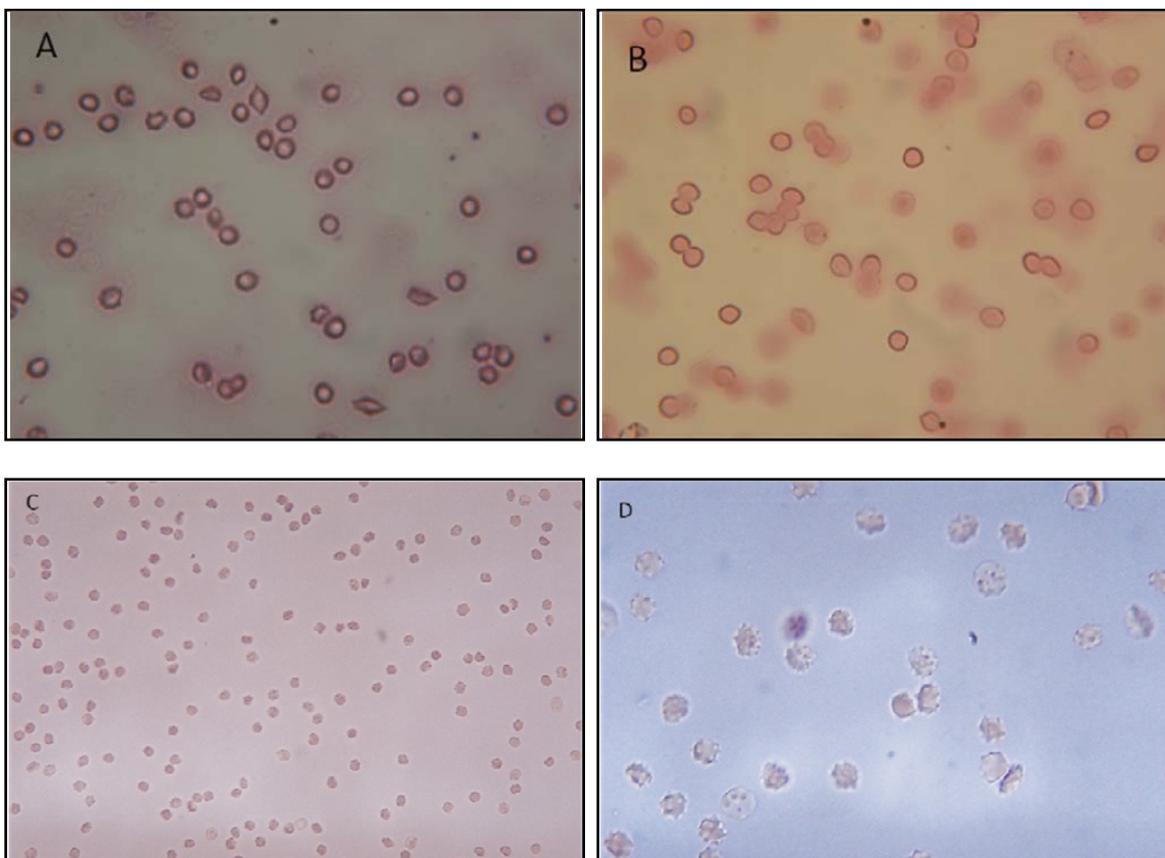


Figura 2: Fotomicrografias, em aumento original, de eritrócitos humanos em solução salina fisiológica de glifosato a 5 (**A**, 400x), 26 (**B**, 1000x) e 30 $\mu\text{L/dL}$ (**C**, 400x e **D**, 1000x). Sob concentrações de glifosato anteriores à transição sigmoidal de lise (**A** e **B**), os eritrócitos estão íntegros, porém com menores volumes sob a concentração mais alta de glifosato (**B**). Em glifosato a 30 $\mu\text{L/dL}$, bem próximo à linha de lise, os eritrócitos estão também murchos (**C**), mas apresentam espículas visíveis à microscopia de luz (**D**).

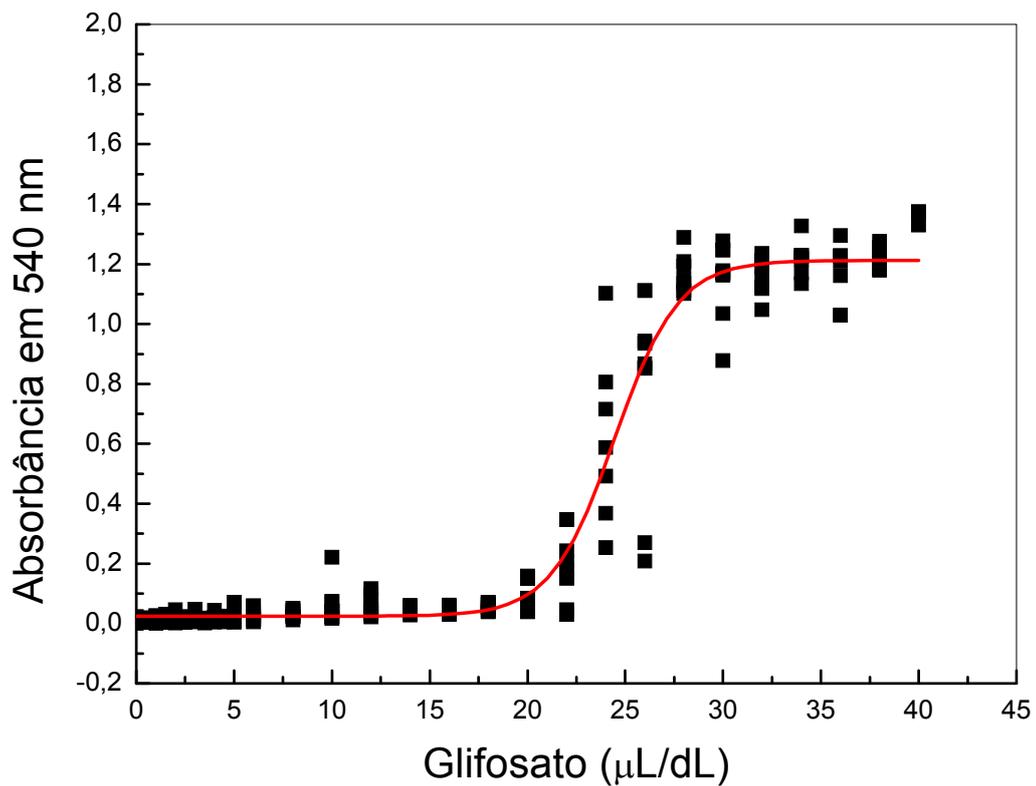


Figura 3: Estabilidade de eritrócitos de ratos em função da concentração de glifosato em solução salina fisiológica. As amostras de sangue foram colhidas usando-se heparina como anti-coagulante.

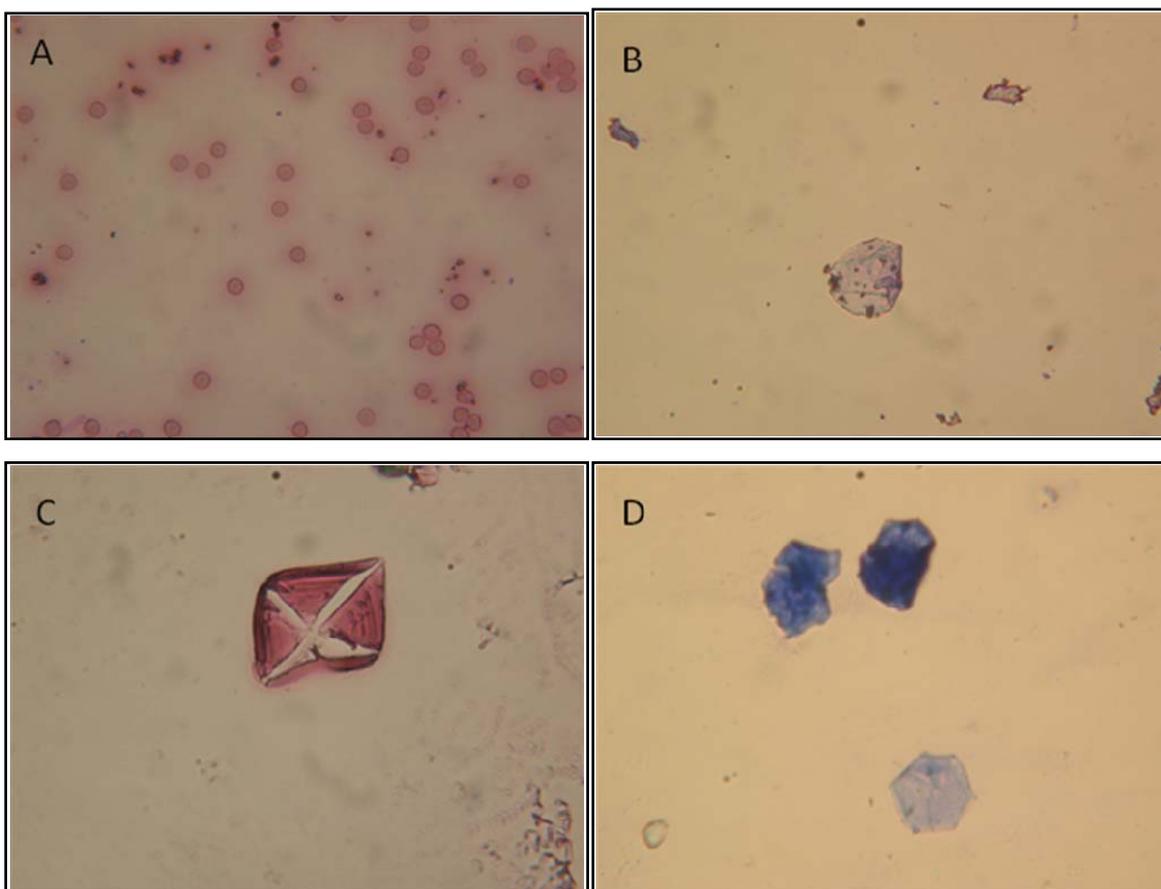


Figura 4: Fotomicrografias, em aumento original, de eritrócitos de ratos em solução salina fisiológica de glifosato a 12 (**A**, 400x), 26 (**B**, 1000x), 36 (**C**, 1000x) e 40 $\mu\text{L/dL}$ (**D**, 1000x). Os eritrócitos estão íntegros sob concentração de glifosato anterior à transição sigmoide de lise (**A**), mas lisados nas demais concentrações (**B**, **C** e **D**).

DISCUSSÃO

As concentrações de glifosato utilizadas neste trabalho estavam dentro do limite de concentração recomendado pelo seu fabricante no Brasil (0,5 a 4,0%L/100L de água).

Nesse limite (400 ppm), houve 100% de lise dos eritrócitos humanos (**Figura 1A** e **Figura 1B**) e de ratos (**Figura 3**), de acordo com análises espectrofométricas.

Essas análises mostraram que os eritrócitos humanos e de ratos sofrem 50% de lise (D_{50}) em concentrações de glifosato de $30,01 \pm 3,62$ e $25,75 \pm 1,53$ $\mu\text{L/dL}$, respectivamente.

Realmente, à microscopia de luz, os eritrócitos estão íntegros em concentrações de glifosato bem menores do que a região de meia-transição de lise (**Figura 1A** e **Figura 4A**), mas sofrem contração de volume, deformação e lise à medida que a concentração de glifosato aumenta no sentido (**Figura 1B**, **Figura 1C** e **Figura 1D**) ou além de D_{50} (**Figura 4B**, **Figura 4C** e **Figura 4D**).

Esse efeito é devido à ação do glifosato e não é decorrente da natureza do anticoagulante utilizado na coleta do sangue, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de D_{50} obtidos para a ação do glifosato sobre eritrócitos de sangue humano colhido tanto com heparina quanto com EDTA.

Entretanto, uma observação mais atenta da **Figura 1A** em relação à **Figura 1B** mostra que os valores de absorvância em 540 nm são em geral menores na presença de sangue colhido com EDTA do que com sangue colhido com heparina. A explicação para essa diferença seria a ocorrência de precipitação de parte da população de moléculas de hemoglobina induzida pelo EDTA. Essa explicação concorda com a diminuição da concentração de hemoglobina no sangue de carpas quando a amostra de sangue é colhida em EDTA [WALENCIK e WITESKA, 2007].

A maior resistência ao glifosato observada para eritrócitos humanos em relação aos eritrócitos de ratos deve ser consequência de diferenças que determinam a diferença de longevidade entre essas espécies. A maior capacidade humana de resistir a danos de origem ambiental permite aos

humanos atingir uma maior longevidade em relação ao rato e várias outras espécies. Essa diferença de comportamento deve ser decorrente de diferenças estruturais nos eritrócitos dessas duas espécies. Diferenças estruturais foram observadas nas membranas mitocondriais humanas em relação a outras espécies. As membranas mitocondriais humanas apresentam um menor índice de insaturação e uma maior capacidade de resistir a lipoperoxidação em relação a outras espécies [PAMPLONA, BARJA e PORTERO-OTIN, 2002; PAMPLONA e BARJA, 2003].

A origem da diferença observada poderia ser decorrente de diferenças na composição relativa de lipídeos de membrana [PENHA-SILVA et al., 2007] ou simplesmente a diferenças no volume dos eritrócitos, pois os eritrócitos maiores são proporcionalmente mais resistentes que eritrócitos menores [ALDRICH, 2001].

Os resultados obtidos nesse trabalho são relevantes na atenção à saúde das pessoas que estão em contato direto ou indireto com glifosato, que é considerado um dos herbicidas menos tóxicos do mercado [EPA-US, 1992]. Eles podem justificar parte dos sintomas da intoxicação por glifosato, que incluem dores abdominais, vômitos, excesso de líquidos nos pulmões, dores de cabeça, perda de consciência, palpitações cardíacas, dormência facial, coceiras e formigamentos [SAWADA, 1988; TEMPLE e SMITH, 1992; DELGADO e PAUMGARTTEN; 2004]. A destruição de eritrócitos diminui a capacidade de carreamento de oxigênio no sangue e causa hipóxia em vários tecidos, inclusive no cérebro.

Exacerbação da lise de eritrócitos, em amostras de sangue de banco de sangue, já havia sido reportada na literatura por Bukowska et al. [2002], que também reportaram ocorrência de aumento da atividade da acetil-colinesterase (AChE), da lipoperoxidação de membranas e dos níveis de meta-hemoglobina por ação do glifosato. Aqueles autores utilizaram concentrações de glifosato entre 100 e 1500 ppm e detectaram que 500 ppm era a dose que causava alterações nos eritrócitos. Essa dose está um pouco acima do valor de D_{50} (equivalente a cerca de 313 ppm) que nós obtivemos para as amostras de sangue humano.

Concentrações dessa ordem no sangue dificilmente seriam atingidas no usuário final dos alimentos cultivados sob a ação herbicida do glifosato,

considerando a acumulação do glifosato nos alimentos e no próprio usuário (BUKOWSKA, 2002), mas com certeza esses níveis podem ser mais facilmente atingidos nas pessoas que manipulam esse herbicida na agricultura.

CONCLUSÕES

Análises feitas por espectrofotometria a 540 nm e microscopia de luz mostraram que, dentro da faixa de concentração recomendada pelo fabricante para uso de glifosato na agricultura, há 100% de lise dos eritrócitos tanto em ratos quanto em humanos.

Os valores de D_{50} do glifosato foram sempre significativamente menores para os eritrócitos de ratos do que os de humanos.

Os valores de D_{50} do glifosato sobre eritrócitos humanos não foram significativamente diferentes para as amostras de sangue colhidas em EDTA em relação àquelas colhidas em heparina. Entretanto, os valores de absorbância em 540 nm foram menores na presença de sangue colhido com EDTA do que de sangue colhido com heparina, provavelmente por precipitação de uma pequena fração de moléculas de hemoglobina pelo EDTA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRICH, K.; SAUNDERS, D.K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 26, p. 179-182, 2001.

AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

AVERSI-FERREIRA, T.A. **Efeitos pós-natais do etanol sobre o desenvolvimento do neocórtex de ratos Wistar**. Uberlândia, 2004. 70f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

BARAKAT, K.K. Effect of certain insecticides on the stabilization and lysis of human and fish erythrocyte. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 1, n. 2, p.195-199, 2005.

BASTOS, L. H. **Investigação da contaminação do solo por organoclorados, na Cidade dos Meninos, Duque de Caxias, RJ, avaliação dentro de um novo cenário, após adição de cal**. 1999. 175 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

BATISTA, M.T.A.; RODRIGUES, H.G.; FONSECA, L.C.; BONETTI, A.M.; PENHA-SILVA, N.; NERES, A.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3 (supl.), n. 2, p. 22-24, 2006.

BAYLIS, A.D. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. **Pest Manag. Sci.**, v. 56, p. 299-308, 2000.

BERNARDINO NETO, M. **Origem da estabilização de eritrócitos por sorbitol**. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, 2006. Nilson Penha-Silva (Orientador).

BHALLA, P.; AGRAWAL, D. Alterations in rat erythrocyte membrane due to hexachlorocyclohexane (technical) exposure. **Hum Exp Toxicol.**; v. 17, n. 11, p.

638-42, nov. 1998.

BLASIAK, J.; WALTER, Z.; GAWRONSKA, M. The changes of osmotic fragility of pig erythrocytes induced by organophosphorus insecticides. **Acta Biochim Pol.**, v. 38, n. 1, p. 75-8, 1991.

BUKOWSKA, B.; PIENIAZEK, D.; DUDA, W. Hemolysis and lipid peroxidation in human erythrocytes incubated with roundup. **Current Topics in Biophysics**, v. 26, n. 2, p. 245-249, 2002.

CERRILLO, I.; GRANADA, A.; LÓPEZ-ESPINOSA, M. J.; OLMOS, B.; JIMÉNEZ, M.; CANÓ, A.; OLEA, N.; OLEA-SERRANO, M. F. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. **Environmental Research**, v. 98, n. 2, p. 233–239, jun., 2005.

CHASIS, J.A.; MOHANDAS, N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. **J. Cell Biol.**, v. 103, p.343-350, 1986.

COLE, D. J. **Mode of action of glyphosate - a literature analysis**. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). The herbicide glyphosate, p. 49-54. Londres: Butterworths, 1985.

CUNHA ARVELOS, C. C. **Efeitos do glicerol sobre a dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos**. Uberlândia, 2007. 51f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

CUNHA, C. C.; ARVELOS, L. R.; COSTA, J. O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 341-347, 2007.

DE FREITAS, M. V.; NETTO, R. C. M.; DA COSTA HUSS, J. C.; DE SOUZA, T. M. T.; COSTA, J. O.; FIRMINO, C. B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 1, 219-224, Feb 2008.

DELGADO, I.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Intoxicações e usos de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, p. 180-185, jan-fev, 2004.

DUBUS, I.G.; HOLLIS, J.M.; BROWN, C.D. Pesticides in rainfall in Europe. **Environmental Pollution**, v.110, n. 2, p.331-344, nov., 2000.

DUYZER, J. Pesticide concentrations in air and precipitation in the Netherlands. **Journal of Environmental Monitoring**. v.5, n.4, p.77N-80N, 2003.

ELIAS, F.; LUCAS, S.R.R.; HAGIWARA, M.K.; KOGIKA, M.M.; MIRANDOLA, M.S. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 413-418, mar-abr, 2004.

EPA-US (Environmental Protection Agency U.S). Pesticide Tolerance for Glyphosate, **Federal Register**. v. 57, p. 8739-8740, 1992.

FARAHAT, T.M.; ABDELRASOUL, G.M.; AMIR, M.M.; SHEBL, M.M.; FARAHAT, F.M.; ANGER, W.K. Neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides. **Occupational Environmental Medicine**, v. 60, n. 4, p. 279-286, april, 2003.

FAVA, L.; ORRÙ, M.A.; CROBE, A.; CARACCILO, A.B.; BOTTONI, P.; FUNARI, E. Pesticide metabolites as contaminants of groundwater resources: assessment of the leaching potential of endosulfan sulfate, 2,6-dichlorobenzoic acid 3,4-dichloroaniline 2,4-dichlorophenol and 4-chloro-2-methylphenol. **Microchemical Journal**, v.79, n. 1-2, p. 207-211, jan., 2005.

FINOTTI, C.J. **Dependência térmica da osmoestabilização de eritrócitos por glicerol**. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, 2006. Nilson Penha-Silva (Orientador).

FIRMINO, C.B. **Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos**. Uberlândia, 2007. 89f. Tese (Doutorado)

Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

GARRY, V.F.; SCHREINEMACHERS, D.; HARKINS, M.E.; GRIFFITH, J. Pesticide applicers, biocides, and birth defects in rural Minnesota. **Environmental Health Perspectives**, v.104, n.4, p. 394-399, april, 1996.

GOUVÊA E SILVA, L.F. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol**. Uberlândia, 2006, 53f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

HANDY, R.D.; ABD-EL SAMEI, H.A.; BAYOMY, M.F.F.; MAHRAN, A.M.; ABDEEN, A.M.; EL-ELAIMY, E.A. Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. **Toxicology**, v. 172, n. 1, p. 13-34, mar., 2002.

HAPEMAN, C.J.; MCCONNELL, L.L.; RICE, C.P.; SADEGHI, A.M.; SCHMIDT, W.F.; MCCARTY, G.W.; STARR, J.L.; RICE, P.J.; ANGIER, J.T.; HARMAN-FETCHO, J.A. Current United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service research on understanding agrochemical fate and transport to prevent and mitigate adverse environmental impacts. **Pest Management Science**. v. 59, n. 6-7, p. 681-690, jun.-jul., 2003.

HERNÁNDEZ, A.A.A.; BLANCO, R.V. Organización de la membrana celular: banda 3, estructura y función. **Rev. Cubana Hematol. Inmunol. hemoter.**, v. 3, p. 00-00, 2005.

IVANOV, IT.; TOLEKOVA, A.; CHAKAAROVA, P. Erythrocyte membrane defects in hemolytic anemias found through derivative thermal analysis of electric impedance. *J. Biochem.* **Biophys. Methods**, v. 70, p. 641-648, 2007.

KAMEL, F; HOPPIN, J.A. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environmental Health Perspectives*, v. 112, n. 9, jun., 2004.

KOLPIN, D.W.; SCHNOEBELEN, D.J.; THURMAN, E.M. Degradates provide insight to spatial and temporal trends of herbicides in ground water. **Ground Water**, v. 42, n. 4, p. 601-608, jul.-aug., 2004.

KRUSE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 139-146, 2000.

MOECKEL, G.W., SHADMAN R., FOGEL J.M., SADRZADEH S.M.H. Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocytes membrane ATPase. **Life Sciences**, v. 71, n. 20, p. 2413-2424, 2002.

MURRAY, RK.; GRANNER, DK. **Membranas: estrutura, montagem e função**. In: Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. Harper's Biochemistry. 9a. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 919 p., cap. 43, p. 505-533, 2002.

NARENDRA, M.; BHATRACHARYULU, NC., PADMAVATHI, P.; VARADACHARYULU, NC. Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers. **Chemosphere**, v. 67, n. 6, p. 1065-1071, april, 2007.

NASUTI, C. CANTALAMESSA F. FALCIONI G. GABBIANELLI R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, v. 191, n. 2, p. 233-244, sep., 2003.

NISHIHARA, Y.; UTSUMI, K.; Diminished osmotic fragility and shape alterations of human erythrocytes following the treatment with 1,1,1-trichloro-2,2-bis(P-chlorophenyl) ethane (DDT). **Cell Mol Biol.**, v. 29, n. 1, p. 103-11, 1983.

OZTÜRK, L.; MANSOUR, B.; YÜKSEL. M.; GÖKHAN, N. Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 332, p. 83-88, 2003.

PAMPLONA, R.; BARJA, G. (2003). Aging rate, mitochondrial free radical production, and constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from

comparative studies. In: VON ZGLINICKI, T. (ed.) **Aging at the molecular level**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 47-64.

PAMPLONA, R.; BARJA, G.; PORTERO-OTIN, M. (2002). Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 959, 475-470.

PAULI, B.D.; COULSON, D.R.; BERRILL, M. Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to Mimic ® 240 LV insecticide following single or double exposures. **Environmental Toxicology Chemical**. v. 18, n. 11, p. 2538-2544, nov., 1999.

PEEPLES, E. S.; SCHOPFER, L.M.; DUYSSEN, E. G.; SPAULDING, R.; VOELKER, T.; THOMPSON, C.M.; LOCKRIDGE, O. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry. **Toxicological Sciences**, v. 83, n. 2, p. 303-312, nov., 2004.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B.; REIS, F.G.F.; DA COSTA HUSS, J. C.; DE SOUZA, T. M. T.; DE FREITAS, M. V.; NETTO, R. C. M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. Mechanisms of ageing and development, v. 128, p. 444-449, 2007.

REIS, F.G.F. **Influência de glicerol e sorbitol sobre a dependência térmica da estabilização e desestabilização in vitro de eritrócitos humanos**. 2007. 74f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, 2007. Nilson Penha-Silva (Orientador).

RIBAS-FITÓ, N.; GRIMALT, J.O.; MARCO, E.; SALA, M.; MAZÓN, C.; SUNYER, J. Breastfeeding and concentrations of HCB and p,p'-DDE at the age of 1 year. **Environmental Research**, v. 98, n. 1, p. 8-13, maio, 2005.

ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. Membrane skeletal protein S-glutathionylation and hemolysis in human red blood cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 37, p. 180-187, 2006.

SABA, A.; MESSINA, F. Attitudes towards organic foods and risk/benefit perception associated with pesticides. **Food Quality and Preference**. v. 14, n. 8, p. 637-645, dec., 2003.

SAFE, S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. **Toxicology**, v. 205, n. 1-2, p. 3-10, dec, 2004.

SANGHI, R.; PILLAI, M. K.; JAYALEKSHMI, T. R.; NAIR, A. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. **Human & Experimental Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 73-76, feb., 2003.

SAWADA, Y. Probable toxicity of surface-active agent in commercial herbicide containing glyphosate, **Lancet**, v. 1, n. 8580, p. 299, 1988.

SILVESTRONI, L.; PALLESCHI, S. Effects of organochlorine xenobiotics on human spermatozoa. **Chemosphere**, v. 39, n. 8, p. 1249-1252, oct., 1999.

SIRICHOTIYAKUL, S.; TANTIPALAKON, C.; SANGUANSEMSRI, T.; WANAPIRAK, C.; TONGSONG, T. Erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia trait in pregnancy. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 86, p. 347-350, 2004.

SMITH, E.A., OEHME, F.W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 34, p. 531-543, 1992.

SMULDERS, C.J.G.M.; BUETERS, T.J.H.; VAILATI, S., VAN-KLEEF, R.G.D.M.; VIJVERBERG, H. P. M. Block of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by organophosphate insecticides. **Toxicological Sciences**, v. 82, n. 2, p. 545-554, sep., 2004.

SÖRENSEN, S.R., BENDING, G.D., JACOBSON, C.S., WALKER, A., AAMAND, J. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. **FEMS Microbiology Ecology**. v.45, n.1, p.1-11, jul., 2003.

SUZUKI, T., NOJIRI, H., ISONO, H., OCHI, T., 2004. Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil. **Toxicology**, v. 204, n. 2–3, p. 97-107, nov., 2004.

TEMPLE, W.A.; SMITH N.A. Glyphosate herbicide poisoning experience in New Zealand. **N.Z. Med. J.**, v. 105, p. 173-174, 1992.

VON MÜHLEND AHL, K. E. V. Hormonally active organochlorines and breast cancer: don't believe every abstract. **European Journal Pediatrics**, v.158, n.7, p.603-604, julho, 1999.

WAGNER, CT.; MARTOWICZ, ML.; LIVESEY, SA.; CONNOR, J. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 45, p. 153-166, 2002.

WALENCIK, J.; WITESKA, M. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, n. 146, p. 331- 335, april, 2007.

WHYATT, R.M.; CAMANN, D.E.; KINNEY, P.L.; REYES, A.; RAMIREZ, J.; DIETRICH, J.; DIAZ, D.; HOLMES, D.; PERERA, F.P. Residential pesticide use during pregnancy among a cohort of urban minority women. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n.5, p.507-514, 2002.

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

WORRALL, F.; BESIEN, T. The vulnerability of groundwater to pesticide contamination estimated directly from observations of presence or absence in wells. **Journal of Hydrology**, v. 303, n.1/4 , p. 92-107, mar., 2005.