

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 20/02/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



INSTITUTO DE BIOC IÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

ESTUDO EXPERIMENTAL DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO REPETIDA AO HERBICIDA
ATRAZINA SOBRE A ATIVIDADE NEUROCOMPORTAMENTAL, BIOMARCADORES DO
ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA DOPAMINÉRGICO

FÁBIO ANSELMO

Botucatu - SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

FÁBIO ANSELMO

**ESTUDO EXPERIMENTAL DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO REPETIDA AO HERBICIDA
ATRAZINA SOBRE A ATIVIDADE NEUROCOMPORTAMENTAL, BIOMARCADORES DO
ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA DOPAMINÉRGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Angélica Henrique Fernandes

Botucatu - SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Anselmo, Fábio.

Estudo experimental dos efeitos da exposição repetida ao herbicida atrazina sobre a atividade neurocomportamental, biomarcadores do estresse oxidativo e sistema dopaminérgico / Fábio Anselmo. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Antonio Francisco Godinho
Coorientador: Ana Angélica Henrique Fernandes
Capes: 21000000

1. Atrazina. 2. Herbicidas. 3. Estresse oxidativo.
4. Toxicidade - Testes. 5. Sistema dopaminérgico.

Palavras-chave: Atrazina; Comportamento; Estresse oxidativo; Neurotoxicidade; Sistema dopaminérgico.

AUXÍLIO FINANCEIRO



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais.
É uma honra e um privilégio ter pais assim
como vocês: os melhores. Obrigado por tudo.
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho pelos ensinamentos, pela disposição, pela compreensão e paciência, pelo apoio em todos os momentos e principalmente pela amizade. Foi um enorme prazer ser seu aluno.

A minha co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. Ana Angélica Henrique Fernandes pela disposição e pelos ensinamentos.

A todos os funcionários do CEATOX, Dr. Alaor Aparecido Almeida, Fábio Iachel da Silva, João Leandro Chaguri, Sarah Setznagl, Juliano da Silva Otoni, Josie Michelle Juvencio e Rita de Cássia Ferrari pela colaboração na execução deste projeto e pela amizade.

A supervisora do CEATOX Prof^ª. Dr^ª. Valéria Cristina Sandrim e aos coordenadores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia Prof. Dr. José Buratini Junior e Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda pela pronta disposição em ajudar.

Ao antigo coordenador do programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi pela disposição em ajudar, pelos conselhos e amizade.

Aos meus queridos colegas de laboratório, Daniel França Horta, Daniel de Fraia, Juliana Trindade Caleffi, Marina de Oliveira Rodrigues Barbosa, Mariana Lumack do Monte Barretto, Taísa Carla Rizzi Rialto, Vinícius Yudi Akai e Giovana C.N. Martins pela ajuda, disposição e principalmente pela amizade.

Aos amigos da Bioquímica, Igor Otavio Minatel, Marla Silvia Diamante, Gean Charles Monteiro, Matheus Antônio Filiol Belin, Letícia Silva Pereira Basílio e João Pedro Corrêa de Camargo, por terem me recebido tão bem e pela fundamental colaboração com este projeto.

A Prof^ª. Dr^ª. Giuseppina Pace Pereira Lima por toda ajuda, disposição, simpatia e por ter praticamente me “adotado” como seu aluno.

A Prof^ª. Dr^ª. Selma Maria Michelin Matheus e sua aluna de doutorado Viviane da Silva Martins Lopes Corrêa pela excelente parceria estabelecida na execução deste projeto.

Ao Prof. Dr. Celso Acácio Rodrigues de Almeida e a Prof^a Dr^a. Camila Renata Correa por toda ajuda disponibilizada.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A minha irmã Luciana Anselmo e aos meus queridos sobrinhos Laura Bertin e Luiz Fernando Bertin pelo apoio e carinho.

Aos meus pais José Anselmo e Áurea Roso Anselmo pelo incentivo, compreensão, carinho, conselhos e paciência. Por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Sem eles, nada seria possível.

E especialmente a minha noiva Lenita Leme Corrêa que esteve sempre ao meu lado, me apoiando e me dando força nos momentos mais difíceis, sempre com muito carinho e amor.

Muito obrigado nunca será suficiente para demonstrar a grandeza do carinho e dedicação que recebi de todos vocês.

EPÍGRAFE

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

FIGURA 1. Fórmula estrutural da atrazina.....	3
FIGURA 2. Arena de Campo Aberto.....	9
FIGURA 3. Labirinto em Cruz Elevado.....	10
FIGURA 4. Hole-Board.....	11
FIGURA 5. Redução sequencial do O ₂ pelas enzimas antioxidantes.....	12

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Paw-dip number assessed in Hole-Board test in rats exposed during 28 days to ATR, ATR+VE and VE.....	21
FIGURA 2. Malondialdehyde levels in brain tissue of rats exposed during 28 days to ATR, ATR+VE and VE.....	21
FIGURA 3. Hydrophilic antioxidant capacity (%) in brain tissue of rats exposed during 28 days to ATR, ATR+VE and VE.....	22
FIGURA 4. Superoxide dismutase activity assay in brain tissue of rats exposed during 28 days to ATR, ATR+VE and VE.....	22

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Ambulations (A) and rearing (B) behaviors assessed in Open field test in rats Ct and exposed to ATR, ATR+LEV and LEV.....	37
FIGURA 2. Total arms entries (A) and percentage of entries in closed arms (B) assessed in Elevated Plus-Maze test in rats Ct and exposed to ATR, ATR+LEV and LEV.....	37
FIGURA 3. Paw-dip number assessed in Hole-board test in rats Ct and exposed to ATR, ATR+LEV and LEV.....	38

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

TABELA 1. Alguns produtos comercializados no Brasil que possuem a atrazina como ingrediente ativo.....	4
---	---

CAPÍTULO 1

TABELA 1. Neurobehavioral assessment in open field and elevated plus-maze tests in rats exposed during 28 days to ATR, ATR+VE and VE.....	20
--	----

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Dopamine quantification (pg/mg) in specific brain areas in rats Ct and exposed to ATR, ATR+LEV and LEV.....	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH - 2',2'-azobis-(2- amidinopropane) dihydrochloride
ACA - Arena de campo aberto
AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
ANOVA - Analysis of variance
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR - Atrazina/atrazine
ATR+LEV - Atrazine plus levodopa
ATR+VE - Atrazine plus Vitamin E
BODIPY - Boron-dipyrromethene
CAH - Capacidade antioxidante hidrofílica
CAT - Catalase
CEUA - Ethics Committee on Use of Animals
CNS - Central nervous system
CPF - Córtex pré-frontal
Ct - Control
DA - Dopamina/Dopamine
DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano
EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid
EO - Estresse oxidativo
EPA - Environmental Protection Agency
EPM - Elevated plus-maze
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
EU - União Europeia/European Union
FAO - Food and Agricultural Organization of the United Nations
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
FSI - Fotossistema I
FSII - Fotossistema II
GPx - Glutathione peroxidase
HAC - Hydrophilic antioxidant capacity
HB - Hole-Board
HIP - Hipocampo/hippocampus
HPLC - High performance liquid chromatography
IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística
INCA - Instituto Nacional de Câncer
LCE - Labirinto em cruz elevado
LD 50 - Lethal Dose 50
LEV - Levodopa
LOAEL - Lowest observed adverse effect level
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA - Malondialdeído/Malondialdehyde

NADH - Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) carrying two electrons and bonded with a hydrogen (H) ion

NBT - Nitro blue tetrazolium

Nrf2 - Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2

OE - Oxidative stress

OECD - Organisation For Economic Co-Operation and Development

OF - Open field arena

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PC - Phosphatidylcholine

PFC - Prefrontal cortex

ROS - Reactive oxygen species

S.E.M. - Standard error of the mean

SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SNC - Sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase/Superoxide dismutase

TBA - Thiobarbituric acid

USEPA - Agência de Proteção Ambiental Americana

VE - Vitamina E/Vitamin E

VTA - Ventral tegmental área

JUSTIFICATIVA PARA A REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Juntamente com a ampla utilização de praguicidas no mundo, as preocupações sobre seus impactos na saúde cresceram rapidamente. Nas últimas décadas estudos epidemiológicos têm ligado a exposição a praguicidas com o aumento de vários distúrbios neurológicos, como por exemplo a ansiedade, incluindo também uma maior incidência de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e Alzheimer. Além disso, na literatura são encontrados poucos e inconclusivos trabalhos que abordam, em caráter neurocomportamental, a exposição repetida a herbicidas, incluindo a atrazina. A atrazina é usada em muitas culturas que são produzidas em grandes quantidades (milho, soja, sorgo, cana-de-açúcar e outras), a fim de aumentar a produtividade. Devido seu uso comum na agricultura, a atrazina chega à água (de superfície e subterrânea) e afeta organismos não-alvo, inclusive seres humanos. Logo, pesquisar o potencial de neurotoxicidade da atrazina trará informações que podem ser de interesse clínico no que diz respeito ao seu modo de ação e a avaliação de danos causados aos seres humanos. Além disso, espera-se que este trabalho suscite questões pertinentes à relação entre saúde ambiental, saúde ocupacional e saúde pública e possa vir a influenciar as tomadas de decisão quanto aos impactos potenciais da exposição à praguicidas.

RESUMO

ANSELMO, F. **Estudo experimental dos efeitos da exposição repetida ao herbicida atrazina sobre a atividade neurocomportamental, biomarcadores do estresse oxidativo e sistema dopaminérgico.** 2020. 71f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2020.

O herbicida atrazina (ATR) é um praguicida usado intensivamente na agricultura, que persiste no meio ambiente e causa toxicidade em espécies não-alvo, inclusive seres humanos. Considerando o potencial da ATR para produzir efeitos no sistema nervoso central (SNC) e a falta de informações na literatura corrente sobre esse tipo de toxicidade, o objetivo deste projeto de pesquisa foi avaliar os efeitos da exposição subcrônica ao herbicida ATR sobre parâmetros neurocomportamentais específicos e estabelecer sua correlação com o estresse oxidativo (EO) em tecido cerebral de ratos e com o sistema dopaminérgico em regiões específicas do cérebro, nominalmente córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HIP) e corpo estriado. Ratos Wistar machos receberam solução salina (0,3 ml; controle - Ct), atrazina (ATR; 100 mg/kg), atrazina mais vitamina E (ATR; 100 mg/kg + VE; 200 mg/kg), apenas vitamina E (VE; 200 mg/kg), atrazina mais levodopa (ATR; 100 mg/kg + LEV; 20 mg/kg) e apenas levodopa (LEV; 20 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. O comportamento foi avaliado utilizando arena de campo aberto (ACA), labirinto em cruz elevado (LCE) e hole-board (HB). O teste de estresse oxidativo no tecido cerebral avaliou os níveis de malondialdeído (MDA), capacidade antioxidante hidrofílica (CAH) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A dopamina (DA) foi quantificada por HPLC, em áreas cerebrais específicas (CPF, HIP e estriado). Exposição à ATR provocou ansiedade, diminuiu a coordenação motora e não alterou a atividade locomotora dos animais. A ATR não modificou os níveis de MDA, a CAH nem as atividades da SOD e CAT. No entanto, ATR+VE aumentou os níveis de MDA e a CAH enquanto a VE aumentou a atividade da SOD. Além disso, o tratamento com ATR não alterou os níveis de DA no estriado cerebral, mas aumentou sua concentração no CPF e no HIP. Como conclusão, observou-se que a exposição subcrônica ao herbicida ATR foi capaz de prejudicar parâmetros comportamentais específicos, principalmente aqueles relacionados a ansiedade e a coordenação motora. Esses prejuízos não estão relacionados com a indução de EO no tecido cerebral de ratos. Além disso, sugere-se atenção em situações de suplementação oral por VE, pois, quando combinada com substâncias do tipo praguicidas, pode exercer efeitos pró-oxidantes a nível de SNC. Adicionalmente a ATR foi capaz de causar perturbações nos sistemas dopaminérgicos cerebrais de ratos, principalmente nas regiões do CPF e HIP, não alterando os níveis de DA na região do estriado. Esses resultados reforçam a relação entre exposição à praguicidas e efeitos de neurotoxicidade.

Palavras-chave: atrazina; neurotoxicidade; comportamento; estresse oxidativo; sistema dopaminérgico

ABSTRACT

ANSELMO, F. **Experimental study of the effects of repeated exposure to atrazine herbicide on the neurobehavioral activity, oxidative stress biomarkers and dopaminergic system.** 2020. 71f. Thesis (PhD) - Institute of Biosciences, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2020.

Atrazine (ATR) herbicide is a pesticide used intensively in agriculture that persists in environment and causes toxicity on non-target species, include humans. Considering the potential of ATR to produce effects on the central nervous system (CNS) and the lack of information in the current literature about this type of toxicity, the aim of this research project was to evaluate the effects of subchronic exposure to ATR herbicide on specific neurobehavioral parameters and to establish its correlation with oxidative stress (OE) in rat brain tissue and with the dopaminergic system in specific brain regions, nominally prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HIP) and striatum. Male Wistar rats received saline (0.3 ml; control - Ct), atrazine (ATR; 100 mg/kg), atrazine plus vitamin E (ATR; 100 mg/Kg + VE; 200 mg/kg) only vitamin E (VE; 200 mg/kg), atrazine plus levodopa (ATR; 100 mg/Kg + LEV; 20 mg/kg) and only levodopa (LEV; 20 mg/kg), via gavage, during 28 days. Behavior was assessed using open field arena (OF), elevated plus-maze (EPM) and hole-board (HB) apparatus. Oxidative stress assay in brain tissue evaluated malondialdehyde (MDA) levels, hydrophilic antioxidant capacity (HAC), and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes activity. Dopamine (DA) was quantified using HPLC, in specific brain areas (PFC, HIP and striatum). ATR exposure caused anxiety-like behavior, decreased motor coordination and did not alter the locomotor activity of the animals. ATR did not change the MDA levels, the HAC, or SOD and CAT activities. However, ATR+VE increased MDA levels and the HAC while VE increased SOD activity. Additionally, ATR treatment did not change DA levels in the striatum cerebral, but increased its concentration in PFC and HIP. As a conclusion, it was observed that subchronic exposure to ATR herbicide was able to impair specific behavioral parameters, especially those related to anxiety and motor coordination. These impairs are not related to OE induction in brain tissue of the rats. Moreover, attention is suggested in situations of oral VE supplementation, because, when combined with substances like pesticides, it can exert pro-oxidant effects in the CNS. Additionally, ATR was able to cause disturbances in the brain dopaminergic systems of rats, mainly in the regions of PFC and HIP, without altering the DA levels in the striatum region. These results reinforce to relation between pesticides exposure and neurotoxic effects.

Keywords: atrazine; neurotoxicity; behavior; oxidative stress; dopaminergic system

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. Praguicidas.....	1
2. Atrazina.....	3
2.1. Atrazina e meio ambiente.....	4
2.2. Efeitos toxicológicos da atrazina.....	5
3. Bioindicadores e biomarcadores.....	8
3.1. Avaliações neurocomportamentais.....	9
3.2. Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo.....	11
3.3. Quantificação de dopamina.....	12
4. Estrutura da tese.....	13
OBJETIVO	13
CAPÍTULO 1	14
Abstract.....	14
1. Introduction.....	15
2. Material and methods.....	16
3. Results.....	20
4. Discussion.....	23
5. References.....	26
CAPÍTULO 2	31
Abstract.....	31
1. Introduction.....	32
2. Material and methods.....	33
3. Results.....	36
4. Discussion.....	38
5. References.....	42
CONCLUSÃO GERAL	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

INTRODUÇÃO

1. Praguicidas

Praguicida, denominação utilizada para designar um grupo de agentes químicos tóxicos, são substâncias ou misturas de substâncias que tem como objetivo prevenir, destruir ou combater qualquer tipo de praga presente em cultivo agrícola. São frequentemente utilizados no meio agrícola para controlar uma variedade de insetos e pragas, e nos animais, por via tópica ou oral, para o controle de parasitas (Poppenga e Oehme, 2010; Amaral, 2012).

Praga (do latim *plaga*) refere-se a tudo aquilo que ataca, lesa ou transmite enfermidade às plantas, aos animais e ao homem, como ervas daninhas, fungos, insetos, carrapatos, aracnídeos ou qualquer outra forma de vida vegetal ou animal considerada danosa à saúde e ao bem-estar do homem, à lavoura, à pecuária e aos seus produtos e matérias-primas alimentares (Spinosa e Xavier, 2008).

O uso de praguicidas iniciou-se na década de 1920, quando havia pouco conhecimento sobre seu potencial tóxico. Na Segunda Guerra Mundial (1939-1945) essas substâncias foram empregadas como armas químicas (OPAS, 1996). No período do pós-guerra houve um crescimento populacional e econômico que exigiu um aumento pela demanda de alimentos e matérias-primas. Desta forma, o emprego dos praguicidas tornou-se necessário para aumentar a produtividade agrícola (Moragas e Schneider, 2003). Esse aumento no uso de praguicidas, juntamente com o desenvolvimento de novas sementes (resistentes a doenças, com maior rendimento) e aplicação de novas práticas (mudança de irrigação, por exemplo) foram denominados Revolução Verde, a qual ocorreu por volta de 1960 (Raley-Susman, 2014).

As primeiras substâncias utilizadas como praguicidas foram agentes tóxicos de origem natural, tais como nicotina, piretro, além de substâncias inorgânicas como o mercúrio e o enxofre. O uso de praguicidas mais modernos teve seu início por volta de 1940, quando Paul Müller descobriu o inseticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). O DDT era muito eficaz, transformando-se rapidamente no praguicida mais utilizado no mundo. Entretanto, na década de 1960, descobriu-se que o DDT provocava danos à saúde de diversas espécies de aves, prejudicando sua reprodução e oferecendo grandes riscos à biodiversidade (Amaral, 2012).

No Brasil, os praguicidas tiveram primeiramente seu uso em programas de saúde pública, no combate a vetores de parasitas, sendo mais utilizados de forma intensiva na agricultura somente a partir de 1960 (OPAS, 1996). Atualmente, grandes empresas

produtoras de praguicidas, fertilizantes e sementes, dominam o agronegócio (Raley-Susman, 2014).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, em 2008 o Brasil alcançou o primeiro lugar no *ranking* de maior consumidor de praguicidas do mundo, ultrapassando os Estados Unidos. No ano de 2009 o consumo continuou aumentando, observando-se uma média de uso de 5,2 Kg de agrotóxicos por habitante. O consumo não parou de crescer e no ano de 2011 foram consumidos 852,8 milhões de litros. (ANVISA, 2012; IBGE, 2012). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, em 2017, as exportações brasileiras do agronegócio somaram US\$ 96,01 bilhões, registrando 13% de crescimento em relação ao ano de 2016. O setor foi responsável por 44,1% do total das vendas externas do Brasil. O superávit foi de US\$ 81,86 bilhões sendo o segundo maior da história, inferior apenas ao registrado em 2013 (R\$ 82,91 bilhões). Este crescente consumo é alarmante, pois já são conhecidos os efeitos deletérios causados por estes produtos (MAPA, 2018).

Os praguicidas de uso agrícola somados aos de uso doméstico foram causadores de 5,67% dos casos de intoxicações registrados no ano de 2016 no Brasil. Com relação aos óbitos provocados por intoxicação humana, os praguicidas foram responsáveis por 45,07% dos casos (SINITOX, 2016). Em 2016, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) registrou mais de trinta e nove mil casos de intoxicação humana e mais de cem casos de óbitos decorrentes de intoxicação, sendo os praguicidas os agentes de maior taxa de letalidade. Esses dados, entretanto, mostram parcialmente a realidade do Brasil, uma vez que segundo o Ministério da Saúde, para cada evento de intoxicação por praguicidas, existem outros cinquenta casos não notificados (FIOCRUZ, 2015).

Em consequência da sua elevada utilização no Brasil e aos seus comprovados efeitos deletérios, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) se posicionou contra as atuais práticas de uso de praguicidas e ressaltou seus riscos à saúde e principalmente à exposição crônica, a qual pode gerar infertilidade, impotência, abortos, malformações, desregulação hormonal, neurotoxicidade, efeitos sobre o sistema imunológico e câncer (INCA, 2015).

Os praguicidas mais aplicados atualmente no Brasil são os herbicidas, seguido pelos inseticidas, fungicidas e acaricidas. Diversas formulações utilizadas aqui são proibidas em países da Europa, em decorrência da sua toxicidade ou às alterações que promovem no ambiente (IBGE, 2012; Carneiro, 2015). Os herbicidas estão entre as

substâncias mais tóxicas devido à sua elevada estabilidade química, resistência ao metabolismo, e a sua eficiência em penetrar em ambientes celulares em razão das suas propriedades lipofílicas (El-Amrani et al., 2012). Neste contexto, um problema que surge da utilização generalizada de herbicidas é a bioacumulação, o que afeta a estabilidade dos ecossistemas, a cadeia alimentar, e também a saúde animal e humana (Bolle et al., 2004). Segundo a União Europeia (EU) e a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), o herbicida atrazina é um dos compostos que estão na lista de poluentes prioritários por causa da sua persistência ambiental e sua toxicidade (Oliveira, 2008).

2. Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-isopropilamino-s-triazina) (figura 1) é um herbicida sistêmico pertencente ao grupo das cloro-s-triazinas amplamente utilizado como pré e pós-emergente no controle de ervas daninhas. (LeBaron et al., 2008). A ATR age nas plantas alvo como inibidor da fotossíntese, mais precisamente inibindo o fotossistema II (FSII) que faz parte da fase fotoquímica da fotossíntese, quando a energia luminosa é absorvida e convertida em energia química. O FSII é o primeiro sistema de proteínas envolvido na fotossíntese e está associado a um complexo de proteínas receptoras e doadoras de elétrons (Roman, 2005).

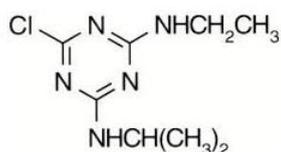


Figura 1. Fórmula estrutural da atrazina (Prade et al., 1998)

Simplificadamente, o mecanismo de ação da ATR consiste no bloqueio do processo fotossintético da planta a ser controlada, através da interferência no fluxo fisiológico normal de elétrons do FSII para o fotossistema I (FSI) nos cloroplastos. Além da inibição da fotossíntese, como a captação de energia solar é contínua e não há transferência de elétrons, as clorofilas atingem uma carga energética elevada, resultando na produção de radicais livres que atuam desencadeando a peroxidação de lipídios de membrana. Como consequência destes processos, ocorre clorose e subsequente necrose de tecidos levando à planta a morte. Nas espécies tolerantes a ATR, como é o caso do

milho por exemplo, o herbicida é eficientemente metabolizado em formas não tóxicas (Marchi et al., 2008).

A ATR possui massa molecular de 215,7 g/mol, sendo considerada uma base fraca (pKa ~1,7), com grau de volatilização, expresso em pressão de vapor, igual a 4×10^{-5} Pa (a 20 °C). Apresenta solubilidade em água de 33 mg/L (a 20 °C), que está vinculada à sua baixa polaridade (log Kow de 2,2-2,7). As propriedades da ATR resultam em moderada mobilidade e elevada persistência, contribuindo para a acumulação a níveis contaminantes tanto na superfície como em profundidade nos solos e potencialmente atingindo águas superficiais e subterrâneas (Prosen, 2012).

A Tabela 1 apresenta alguns produtos comercializados no Brasil, juntamente com a dosagem recomendada, e suas classificações toxicológicas e de risco ambiental. Os acréscimos de rendimento, oriundos do eficiente controle de plantas daninhas por meio do uso da ATR, variam de acordo com o sistema de cultivo sendo que, segundo Carlson (1998), o impacto parece ser maior em sistema de plantio direto do que no plantio convencional. Além do sistema de cultivo, a dosagem e a época de aplicação da ATR também devem considerar o tipo de solo, conteúdos de matéria orgânica e argila e também o clima (Pike et al., 2008).

Tabela 1. Alguns produtos comercializados no Brasil que possuem a atrazina como ingrediente ativo

Nome comercial	Dosagem recomendada*	Classificação toxicológica**	Classificação de risco ambiental***
Atrazina Nortox 500 SC®	1,5 a 4 Kg/ha	III - Medianamente tóxico	II - Produto muito perigoso ao meio ambiente
Proof®	2 a 2,5 Kg/ha	IV - Pouco tóxico	II - Produto muito perigoso ao meio ambiente
Atrazina Atanor 50 SC®	2 a 3 Kg/ha	III - Medianamente tóxico	III - Produto perigoso ao meio ambiente

* As doses podem variar de acordo com o tipo de solo a cultivar.

** Os produtos são classificados em ordem decrescente de toxicidade, de I (extremamente tóxico) a IV (pouco tóxico).

*** Os produtos são classificados em ordem decrescente de risco, de I (produto altamente perigoso) a IV (produto pouco perigoso).

Fonte: AGROFIT (2020).

2.1. Atrazina e meio ambiente

As abordagens ambientais no estudo da ATR visam avaliar o risco ambiental do herbicida, seus resíduos e sua acumulação na água e em solos (Hang et al., 2007). Usualmente, quanto maior o tempo de meia-vida no solo, maior tende a ser o potencial de contaminação das águas (Rebello e Caldas, 2014). Tradicionalmente, o tempo de

meia-vida da ATR no solo, ou seja, o tempo necessário para que 50% do herbicida aplicado sejam dissipados, é considerado como sendo 60 dias. No entanto, os valores de meia-vida podem variar de alguns dias até anos, dependendo das condições e fatores do meio (Graymore et al., 2001; Krutz et al., 2010). Problemáticas surgem pelo fato de muitos estudos de persistência serem realizados em laboratório e/ou em condições de campo, com o tempo de meia-vida sendo estimado a partir de experimentos de curta duração. Neste sentido, a persistência da ATR no solo pode ser subestimada.

Em estudos na Alemanha, a ATR e seus resíduos foram extraídos de solos mesmo depois de mais de duas décadas após a sua última aplicação (Jablonowski et al., 2009; Vonberg et al., 2014). Assim, quando aplicada por muitos anos, solos agrícolas potencialmente acumulam ATR e seus resíduos, que podem ser mobilizados, por exemplo, através de ciclos entre períodos secos e úmidos, e então ser lixiviados e contaminar águas subterrâneas (Jablonowski et al., 2009). Portanto, considerando as elevadas quantidades aplicadas anualmente, juntamente com pesquisas que demonstram sua elevada persistência nos solos, a ATR representa potencial ameaça ao ambiente (Jablonowski et al., 2011).

Nesse mesmo sentido, estudos mostram que a ATR e/ou seus metabólitos são frequentemente detectados no solo, águas subterrâneas, superficiais e na água de beber, (Mosquin et al., 2012), em famílias de agricultores (Lozier et al., 2012), em amostras de urina de aplicadores de praguicidas, além da população em geral (Curwin et al., 2007). Logo, sua ampla utilização e detecção frequente origina preocupações sobre seus potenciais efeitos adversos a saúde.

2.2. Efeitos toxicológicos da atrazina

Embora haja muito a aprender sobre os efeitos da atrazina, muitos trabalhos demonstram uma série de efeitos adversos consistentes da ATR que devem ser pesados contra qualquer um de seus benefícios, ou seja, ela causa efeitos negativos para diversas espécies (Rohr e McCoy, 2010).

A ATR é absorvida por via oral, inalatória e dérmica, somente penetrando na pele numa área muito limitada. Em ratos, a meia vida é de 1,3 dias, e 95% da dose é eliminada dentro de sete dias. Mesmo doses baixas, administradas diariamente em ratos, possibilitou a detecção da substância nos tecidos desses animais. É biotransformada principalmente no fígado e sua excreção ocorre pela urina (75%) e pelas fezes (20%) (Coutinho, 2005).

Estudos mostraram que a ATR é capaz de causar diversas alterações graves em anfíbios, principalmente alterações hormonais, sendo comum ocorrer o fenômeno da feminilização ou até a “castração química” desses animais. Nestes casos a ATR interferiu no desenvolvimento sexual favorecendo a conversão da testosterona em estradiol causando efeitos estrogênicos e levando os anfíbios feminilizados a serem capazes de produzir ovos viáveis. (Carr et al., 2003; Kloas et al., 2009; Hayes et al., 2010).

Estudos com ratos também mostraram que a exposição à ATR é prejudicial para diversos sistemas do organismo, incluindo o sistema imune (Filipov et al., 2005), sistema endócrino (Ghiselli e Jardim, 2007) e principalmente sistema reprodutor com adição para alterações de caráter genotóxico (Feyzi-Dehkharghani et al., 2012). Existem muitas evidências de que em roedores, a ATR produz efeitos adversos tanto no sistema reprodutor masculino quanto no feminino (Kale et al., 2018).

Além disso, vários estudos têm demonstrado certa relação entre a contaminação por ATR ou seus produtos de degradação e anomalias pré-natais na população humana em geral como nascimentos prematuros e/ou abortos espontâneos, interferência no ciclo menstrual e redução da fertilidade (Hase et al., 2008; Chevrier et al., 2011; Cragin et al., 2011). Munger et al. (1997) constataram altas taxas de nascimento de crianças prematuras em Iowa (EUA) em comunidades que consumiam água com altas concentrações de ATR. Cragin et al. (2011) mostraram que a ATR pode ter provocado desregulação no ciclo menstrual das mulheres que consumiam água contaminada por este herbicida sendo evidenciada sua ação antiestrogênica e Hase et al. (2008) relataram que a exposição a ATR pode levar a redução da qualidade do sêmen. Adicionalmente, inúmeros relatórios sugerem exposição prolongada à ATR como um potencial fator de risco para distúrbios neurológicos particularmente entre trabalhadores agrícolas (Dardiotis et al., 2013; Abarikwu e Farombi, 2015; Song et al., 2015; Liu et al., 2016).

Por outro lado, se tratando de efeitos neurotóxicos, a quantidade de estudos relacionando esses efeitos com a exposição à ATR são ainda pouco encontrados. Bardullas et al. (2011) mostraram que exposição oral à ATR em roedores produz alterações neurocomportamentais que são acompanhadas por uma diminuição dos níveis de dopamina no corpo estriado do cérebro. Lin et al. (2013) também chegaram a conclusões parecidas, mostrando que a exposição durante um curto período à ATR causou diminuição na concentração de DA na região estriada do cérebro de roedores. Adicionalmente, Li et al. (2014) demonstraram que no caso de alta exposição, como por

exemplo a ocupacional, a ATR pode inibir a captação vesicular e o armazenamento de DA. Logo, as reduções de DA sugerem que a ATR é um tóxico dopaminérgico e pode ser um fator de risco para doença de Parkinson, uma vez que esta doença caracteriza-se pelo déficit de dopamina nas vias nigroestriatais do cérebro.

A levodopa ou L-dopa é um medicamento destinado ao tratamento da doença de Parkinson. A L-dopa, sendo um precursor da dopamina entra no cérebro através da barreira hemato-encefálica e após ser catalisada pela enzima dopa-descarboxilase forma a DA, aumentando assim, a concentração intracraniana deste neurotransmissor e restaurando o sistema de transmissão dopaminérgico (Wang et al., 2017). Como a dopa-descarboxilase existe tanto periféricamente quanto centralmente, a L-dopa é combinada com um inibidor da dopa-descarboxilase (a carbidopa, por exemplo) para evitar os efeitos periféricos.

Embora os efeitos da ATR sobre a dopamina no estriado e células produtoras de catecolaminas serem relatados em alguns estudos (Filipov et al., 2007; Bardullas et al., 2011; Lin et al., 2013; Li et al., 2014), pouco se sabe sobre os seus efeitos nas outras monoaminas, como a serotonina. Também é desconhecido se ATR afeta outras estruturas cerebrais, tais como o córtex pré-frontal e hipocampo, que recebem projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral (Alcaro et al., 2007).

Se tratando de comportamento, a exposição crônica de ratos a ATR prejudica a coordenação motora, diminui a atividade locomotora espontânea e altera a memória espacial desses animais (Bardullas et al., 2011). Kale et al. (2018) também observaram prejuízo nas funções motoras dos animais expostos à ATR. Já os resultados de Lin et al. (2013) indicaram que exposição a curto prazo à ATR induz múltiplas anomalias comportamentais envolvendo alterações motoras, cognitivas e também emocionais.

O fato do desempenho alterado no teste de reconhecimento de um novo objeto, utilizado para avaliar memória cognitiva, ocorrer em doses que não alteraram a atividade motora e o sistema de monoaminas cerebrais, indica que determinados efeitos comportamentais podem ser particularmente sensíveis à ATR e poderia haver o envolvimento de outras regiões do cérebro, além da parte estriada. Contudo, a dose-dependência dos efeitos da ATR em diferentes comportamentos em roedores adultos não foi ainda muito bem investigada (Lin et al., 2013).

Adicionalmente, alguns estudos demonstraram que a ATR pode promover estresse oxidativo, aumentando a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e produtos de danos oxidativos, tais como peróxidos de lipídios e malondialdeído e

consequentemente influenciando a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (Abarikwu et al., 2010; Adesiyun et al., 2011). Singh et al. (2011) mostraram que a ATR pode induzir respostas ao estresse oxidativo no fígado de ratos após administração por um período de vinte e oito dias. Além disso, Griboff et al. (2014) observaram em um estudo com camarões que a suplementação na dieta com vitamina E pode aumentar a resistência a exposição ATR, como indicado pela reversão nas respostas dos biomarcadores do EO avaliados, uma vez que a VE é um dos antioxidantes mais eficazes encontrado no sistema biológico.

Apesar desses estudos mostrarem que a ATR causa estresse oxidativo, este efeito de toxicidade foi observado principalmente em tecidos como fígado e rins, havendo ainda carência de estudos que avaliem o EO no tecido cerebral e sua relação com efeitos neurocomportamentais, uma vez que o cérebro pode ser vulnerável ao EO pois consome grandes quantidades de oxigênio, resultando em aumento da produção de EROs (Patel, 2016). Além disso, a maioria dos estudos em animais utiliza altas concentrações de ATR, concentrações essas que normalmente não são encontradas no meio ambiente (Semren, 2018).

Portanto, de maneira geral, existem ainda poucos trabalhos de pesquisa relacionando exposição à ATR com possíveis efeitos de neurotoxicidade e os que existem são ainda pouco conclusivos. Por isto tornam-se necessários mais dados experimentais no sentido de comprovar estes achados ou encontrar outros efeitos ligados à neurotoxicidade provocada pela atrazina.

3. Bioindicadores e biomarcadores

Estudos de alterações fisiológicas, comportamentais ou de sobrevivência em um organismo, ou em uma população, constituem-se como bioindicadores (Jonsson e Castro, 2005). Esta determinação deve estabelecer uma relação entre a exposição a agentes químicos e os seus efeitos tóxicos refletidos em alterações pré-clínicas e ainda permitir entender os mecanismos relacionados à ação tóxica nos indivíduos (Castro, 2006). Estas investigações neurofisiológicas são importantes, nos casos em que os indivíduos (animais ou humanos) são expostos a produtos químicos tanto a baixas doses durante um longo período, quanto a uma única dose elevada (Szegedi et al., 2005).

Já biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação ou ainda qualquer alteração bioquímica precoce cuja determinação possa ser realizada

nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado. Há várias evidências experimentais mostrando que, na progressão de doenças neurotóxicas, os eventos bioquímicos precedem as alterações estruturais e danos permanentes ao sistema nervoso central (Castro, 2006).

3.1. Avaliações neurocomportamentais

Comportamento tem sido utilizado como um bioindicador de função para estudar efeitos tóxicos de agentes químicos. Alterações do comportamento em animais expostos a um determinado agente químico podem servir como indicativo de que a substância provoca neurotoxicidade. A importância de estudos neurocomportamentais reside no fato de que comportamento é considerado como um produto final funcional de vários processos sensoriais, motores e integrativos, que ocorrem no sistema nervoso (Terçariol, 2007). Embora vários estudos procurem compreender os mecanismos de neurotoxicidade dos praguicidas em mamíferos, há poucos relacionados aos efeitos neurocomportamentais e estes podem ser úteis para avaliar os efeitos das exposições às substâncias químicas (Martins, 2009).

Um dos aspectos da neurotoxicidade que pode ser estudado através dos testes comportamentais é o da ansiedade/emocionalidade. Algumas tarefas experimentais têm sido utilizadas para estudar este componente comportamental. A arena de campo aberto (Figura 2) é o mais antigo dos testes de ansiedade que são baseados na exploração espontânea de um novo ambiente (Behr et al., 2009). O campo aberto foi criado em 1934 e é utilizado para avaliar principalmente a atividade locomotora, exploração e emocionalidade de roedores, porém também pode ser utilizado para avaliar ansiedade (Martins, 2009).



Figura 2. Arena de Campo Aberto. **Fonte:** Arquivo pessoal

Um dos fatores relevantes na observação do comportamento do animal é a sua tendência a movimentar-se, conhecida como atividade geral. A quantificação dessa locomoção pode refletir o comportamento, uma vez que o animal tenderá a permanecer imóvel (*freezing*) quando apresentar alto grau de ansiedade. Nesse sentido, a exploração do roedor é inversamente proporcional ao medo ou emocionalidade (Udo, 2012). Os organismos, quando expostos a situações de ameaça e perigo, respondem com uma série de respostas adaptativas, físicas e mentais que se opõe aos estímulos estressores na tentativa de manter a homeostasia (Benetti, 2005).

Além da locomoção, o comportamento de levantar (animal apoiado nas patas traseiras, eleva o tronco para farejar o ambiente verticalmente) é a manifestação de um processo exploratório de aproximação das regiões modificadas do ambiente (Silva, 2008; Martins, 2009; Udo, 2012). Além disso, o teste em ACA é comumente utilizado para triagem farmacológica de drogas que atuam sobre o sistema nervoso central (Terçariol, 2007).

O teste do labirinto em cruz elevado (Figura 3) foi criado por Montgomery em 1955 e é um dos principais modelos usados no estudo da ansiedade. Esse teste é baseado no comportamento exploratório de locais novos e na observação de respostas comportamentais em situações que poderiam ou não provocar perigo. Ele consiste em analisar o grau de aversão do animal aos braços abertos, em conflito com o comportamento exploratório (Udo, 2012), já que ambientes abertos, sem proteção lateral, são naturalmente aversivos para o roedor (Martins, 2009).



Figura 3. Labirinto em Cruz Elevado. **Fonte:** Arquivo pessoal

A exposição aos braços abertos do LCE produz significativamente mais ansiedade quando comparada à exposição aos braços fechados. Drogas ansiolíticas

elevam a procura dos roedores pelos braços abertos quando comparadas com a procura pelos braços fechados e, em contraste, drogas ansiogênicas diminuem a procura pelos braços abertos (Silva, 2008; Martins, 2009).

O aparelho Hole-Board (Figura 4) oferece um método simples de medir as respostas de um rato a um ambiente novo e tem sido amplamente utilizado para avaliar os efeitos de drogas (File e Wardill, 1975). Trata-se de um aparelho que tem sido utilizado para avaliar comportamentos de coordenação motora (deslizamento de patas) e comportamento exploratório (introduções de cabeça) frente à exposição a agentes químicos neurotóxicos (Kuc et al., 2006; Godinho et al. 2014).



Figura 4. Hole-Board. **Fonte:** Arquivo pessoal

3.2. Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo

Na experimentação animal, esta avaliação bioquímica pode ajudar a entender e às vezes, caracterizar a relação de processos danosos que compõem o quadro geral de intoxicação. A estimulação da produção de radicais livres, prejuízo da capacidade antioxidante e a peroxidação lipídica são mecanismos de toxicidade dos praguicidas, e tem sido associado ao desenvolvimento de doenças causadas pela exposição a estes agentes tóxicos. Além disso, é reconhecido que o estresse oxidativo tem papel importante na etiologia e progressão de doenças crônicas (Abdollahi et al., 2004; Soltaninejad e Abdollahi, 2009; Rajendran, 2014; Gallegos et al., 2018).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante da célula. Esse desequilíbrio resulta na produção de radicais livres e danos a componentes celulares, como lipídios de membrana, proteínas, ácidos nucleicos e outras pequenas moléculas (Mostafalou e Abdollahi, 2013; Rajendran, 2014).

O sistema antioxidante é dividido em enzimático e não enzimático sendo responsável por neutralizar as espécies reativas de oxigênio. As enzimas superóxido dismutase, catalase, e glutathiona peroxidase pertencem ao sistema antioxidante enzimático, e estão envolvidas na manutenção do balanço REDOX e por neutralizar as ERO, como vemos na Figura 5. Porém, quando ocorre aumento do estresse oxidativo a capacidade de defesa contra as ERO pode colapsar (Birben et al., 2012; Nwani et al., 2016).

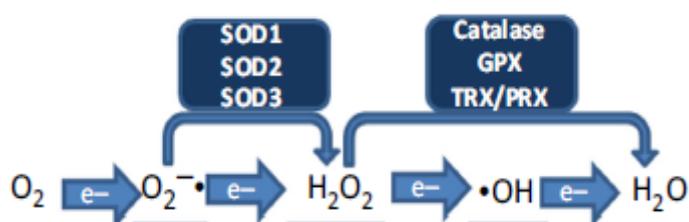


Figura 5. Redução sequencial do O_2 pelas enzimas antioxidantes (Patel, 2016).

3.3. Quantificação de dopamina

Da mesma maneira que o estresse oxidativo é reconhecido como um dos mecanismos de toxicidade dos praguicidas, diversos estudos mostram que a alteração dos níveis de dopamina em partes específicas cerebrais pode indicar efeito de neurotoxicidade e estar associado a diversos tipos de doenças (Filipov et al., 2007; Bardullas et al., 2011; Lin et al., 2013; Li et al., 2014).

Os sistemas dopaminérgicos são conhecidos por participarem do controle motor do indivíduo (Schultz, 2007), desse modo, não é surpreendente que a exposição à agentes tóxicos do tipo praguicidas induzam a déficits motores, provavelmente devido a perturbações nos circuitos de DA, principalmente pela via nigroestriatal (Lin et al., 2013). Dentre as funções da dopamina produzida na via nigroestriatal estão, além do controle motor, a regulação do humor, do estresse, da ansiedade entre outras (Delucia, 2006).

Além disso, a DA é um neurotransmissor produzido em várias regiões cerebrais, além da via nigroestriatal, como por exemplo a via mesolímbica e mesocortical, logo várias funções podem ser comprometidas em decorrência de perturbações nos circuitos dopaminérgicos (Standaert, 2009). Desta maneira, fica evidente a importância de investigar possíveis alterações deste neurotransmissor em estudos de exposição à agentes tóxicos.

CONCLUSÃO GERAL

Como conclusão desta tese de doutorado, observou-se que a exposição subcrônica ao herbicida atrazina foi capaz de prejudicar parâmetros comportamentais específicos, principalmente aqueles relacionados a ansiedade e a coordenação motora.

O primeiro artigo demonstrou que os prejuízos dos parâmetros comportamentais não estão relacionados com a indução de estresse oxidativo no tecido cerebral de ratos. Além disso, sugere-se atenção em situações de suplementação oral por vitamina E, uma vez que a vitamina E, quando combinada com substâncias do tipo praguicidas, pode exercer efeitos pró-oxidantes a nível de sistema nervoso central.

O segundo artigo demonstrou que além dos prejuízos neurocomportamentais, a exposição à atrazina foi capaz de causar perturbações nos sistemas dopaminérgicos cerebrais de ratos, principalmente nas regiões do córtex pré-frontal e hipocampo, não alterando os níveis de dopamina na região do estriado.

Esses resultados reforçam a relação entre exposição à praguicidas e efeitos de neurotoxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarikwu, S.O., Adesiyan, A.C., Oyeloja, T.O., Oyeyemi, M.O., Farombi, E.O., 2010. Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, atrazine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 874-882.
- Abarikwu, S.O., Farombi, E.O., 2015. Atrazine induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3-dependent pathway. *Pestic. Biochem. Physiol.* 118, 90-98.
- Abdollahi, M. et al., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.* 10, 141-147.
- Adesiyan, A.C., Oyeloja, T.O., Abarikwu, S.O., Oyeyemi, M.O., Farombi, E.O., 2011. Selenium provides protection to the liver but not the reproductive organs in an atrazine-model of experimental toxicity. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63, 201-207.
- AGROFIT. Ministério da Agricultura. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em: 06 jan. 2020.
- Alcaro, A., Huber, R., Panksepp, J., 2007. Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective. *Brain Res. Rev.* 56, 283-321.
- Amaral, R.B. Investigação do comportamento eletroquímico do inseticida fipronil e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica. 2012. 124f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Carlos.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Seminário volta a discutir mercado de agrotóxicos em 2012, Brasília; 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br> Acesso em: 03 dez. 2019.
- Bardullas, U., Giordano, M., Rodriguez, V.M., 2011. Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicol Teratol.* 33, 263-272.
- Behr, G.A., Motta, L.L., Oliveira, M.R., Oliveira, M.W.S., Hoff, M.L.M., Silvestrin, R.B., Moreira, J.C.F., 2009. Decreased anxiety-like behavior and locomotor/exploratory activity, and modulation in hypothalamus, hippocampus, and frontal cortex redox profile in sexually receptive female rats after short-term exposure to male chemical cues. *Behav. Brain Res.* 199, 263-270.

- Benetti, F. Intervenções na relação mãe-filhote e seus efeitos nas respostas comportamentais e endócrinas na vida adulta. 2005. 87f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Birben, E. et al., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. Journal* 5, 9-19.
- Bolle, P., Mastrangelo, S., Tucci, P., Evandri, M.G., 2004. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. *Environ Mol Mutagen.* 43, 137-141.
- Carlson, G.A., 1998. Costs impacts if atrazine or triazines were not available to growers (Cap. 4). In: Ballantine, L.G., McFarland, J.E., Hackett, D.S. (Eds.). *Triazine herbicides: risk assessment.* ACS Symposium Series 683. Washington: American Chemical Society, p.35-48.
- Carneiro, F.F. (Coord) et al., 2015. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 624 p.
- Carr, J. et al., 2003. Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: Assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environ Toxicol Chem.* 22, 396-405.
- Castro, V.L., 2006. Biomarcadores e Desenvolvimento Neurocomportamental: Aspectos Experimentais. *Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.*
- Chevrier, C., Limon, G., Monfort, C., Rouget, F., Garlantézec, R., Petit, C. et al., 2011. Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE Birth Cohort. *Environmental Health Perspectives* 119, 1034-1041.
- Coutinho, C. et al., 2005. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 5, 65-72.
- Cragin, L.A., Kesner, J.S., Bachand, A.M., Barr, D.B., Meadows, J.W., Krieg, E.F. et al., 2011. Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. *Environ. Res.* 111, 1293-1301.
- Curwin, B.D., Hein, M.J., Sanderson, W.T., Striley, C., Heederik, D., Kromhout, H. et al., 2007. Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa. *Ann Occup Hyg.* 51, 53-65.

- Dardiotis, E., Xiromerisiou, G., Hadjichristodoulou, C., Tsatsakis, A.M., Wilks, M.F., Hadjigeorgiou, G.M., 2013. The interplay between environmental and genetic factors in Parkinson's disease susceptibility: the evidence for pesticides. *Toxicology* 307, 17-23.
- DeLucia, R. et al., 2006. Capítulo 28 - Fármacos Usados no Tratamento de Doenças Neurodegenerativas. *Farmacologia Integrada*, p.279-286.
- El-Amrani, S., Pena-Abaurrea, M., Sanz-Landaluze, J., Ramos L., Guinea, J., Cámara, C., 2012. Bioconcentration of pesticides in zebrafish eleutheroembryos (*Danio rerio*). *Sci Total Environ.* 425, 184-190.
- Feyzi-Dehkhargani, S. et al., 2012. Atrazine in sub-acute exposure results in sperm DNA disintegrity and nuclear immaturity in rats. *Veterinary Research Forum* 3, 19-26.
- File, S.E., Wardill, G., 1975. The reliability of the Hole-Board Apparatus. *Psychopharmacologia* 44, 47-51.
- Filipov, N.M., Pinchuk, L.M., Boyd, B.L., Crittenden, P.L., 2005. Immunotoxic effects of short-term atrazine exposure in young male C57BL/6 mice. *Toxicol Sci.* 86, 324-332.
- Filipov, N.M., Stewart, M.A., Carr, R.L., Sistrunk, S.C., 2007. Dopaminergic toxicity of the herbicide atrazine in rat striatal slices. *Toxicology* 232, 68-78.
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. Artigo relaciona morte de trabalhadores por agrotóxicos e sua subnotificação. 2015. Disponível em: < <https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/artigo-relaciona-morte-de-trabalhadores-por-agrotoxicos-e-sua-subnotificacao>>. Acesso em: 04 dez. 2019.
- Gallegos, C.E., Baier, C.J., Bartos, M., Bras, C., Domínguez, S., Mónaco, N., Gumilar, F., Giménez, M.S., Minetti, A., 2018. Perinatal glyphosate-based herbicide exposure in rats alters brain antioxidant status, glutamate and acetylcholine metabolism and affects recognition memory. *Neurotox Res.* 34(3), 363-374.
- Ghiselli, G., Jardim, W.F., 2007. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova* 30, 695-706.
- Godinho, A.F., Stanzani, S.L., Ferreira, F.C., Braga, T.C., Silva, M.C., Chaguri, J.L., Dias-Júnior, C.A., 2014. Permethrin chronic exposure alters motor coordination in rats: effect of calcium supplementation and amlodipine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 878-884.

- Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson, G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International* 26, 482-495.
- Griboff, J., Morales, D., Lidwina Bertrand, L., Bonansea, R.I., Monferrán, V., Asis, R., Wunderlin, D.A., Amé, M.V., 2014. Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes argentinus*: The protective effect of vitamin E. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 108, 1-8.
- Hang, S., Nassetta, M., Cañas, A.I., Rampoldi, E.A., Fernández-Canigia, M.V., Díaz-Zorita, M., 2007. Changes in the atrazine extractable residues in no-tilled Mollisols. *Soil & Tillage Research* 96, 243-249.
- Hase, Y., Tatsuno, M., Nishi, T., Kataoka, K., Kabe, Y., Yamagushi, Y. et al., 2008. Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366, 66-72.
- Hayes, T.B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T. et al., 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *PNAS* 107, 4612-4617.
- IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. Indicadores de desenvolvimento sustentável Brasil 2012. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Acerca dos Agrotóxicos. Ministério da Saúde, 06 de abril de 2015. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2019.
- Jablonowski, N.D., Köppchen, S., Hofmann, D., Schäffer, A., Burauel, P., 2009. Persistence of 14C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. *Environmental Pollution* 157, 2126-2131.
- Jablonowski, N.D., Schäffer, A., Burauel, P., 2011. Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environmental Science and Pollution Research* 18, 328-331.
- Jonsson, C.M., Castro, V.L., 2005. Bioindicadores e Biomarcadores de Agroquímicos no Contexto da Relação Saúde-Ambiente. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.
- Kale, O.E., Oyesola, T.O., Raji, F.S., 2018. Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, offers chemoprevention against reproductive and neurobehavioural abnormalities induced by atrazine in male Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 58, 84-97.

- Kloas, W. et al., 2009. Does atrazine influence larval development and sexual differentiation in *Xenopus laevis*? *Toxicol Sci.* 107, 376-384.
- Krutz, L.J., Shaner, D.L., Weaver, M.A., Webb, R.M.T., Zablutowicz, R.M., Reddy, K.N., Huang, Y., Thomson, S.J., 2010. Agronomic and environmental implications of enhanced s-triazine degradation. *Pest Management Science* 66, 461-481.
- Kuc, K.A., Gregersen, B.M., Gannon, K.S., Dodart, J.C., 2006. Holeboard discrimination learning in mice. *Genes, Brain and Behavior* 5, 355-363.
- LeBaron, H.M., MacFarland, J.E., Burnside, O.C., 2008. The triazine herbicides 50 years revolutionizing agriculture. Amsterdam: Elsevier; pp.1-44m.
- Li, Y., Sun, Y., Yang, J., Wu, Y., Yu, J., Li, B., 2014. The long-term effects of the herbicide atrazine on the dopaminergic system following exposure during pubertal development. *Mutation Research* 763, 23-29.
- Lin, Z., Dodd, C.A., Filipov, N.M., 2013. Short-term atrazine exposure causes behavioral deficits and disrupts monoaminergic systems in male C57BL/6 mice. *Neurotoxicology and Teratology* 39, 26-35.
- Liu, Z., Wang, Y., Zhu, Z., Yang, E., Feng, X., Fu, Z., Jin, Y., 2016. Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 148, 163-170.
- Lozier, M.J., Curwin, B., Nishioka, M.G., Sanderson, W., 2012. Determinants of atrazine contamination in the homes of commercial pesticide applicators across time. *J Occup Environ Hyg.* 9, 289-297.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Superávit de US\$ 81,86 bilhões do agronegócio foi o segundo maior da história. 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/superavit-de-us-81-86-bilhoes-do-agronegocio-foi-o-segundo-maior-da-historia>>. Acesso em: 03 dez. 2019.
- Marchi, G., Marchi, E.C.S., Guimarães, T.G., 2008. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. Planaltina: Embrapa Cerrados, 36 p.
- Martins, A.P. Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Moragas, W.M., Schneider, M.O., 2003. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. *Caminhos de Geografia* 3, 26-40.

- Mosquin, P., Whitmore, R.W., Chen, W., 2012. Estimation of upper centile concentrations using historical atrazine monitoring data from community water systems. *J Environ Qual.* 41, 834-844.
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 157-177.
- Munger, R., Isacson, P., Hu, S., Burns, T., Hanson, J., Lynch, C.F., Cherryholmes, K., Van Dorpe, P., Hausler Jr, W.J., 1997. Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicide-contaminated drinking water supplies. *Environmental Health Perspectives* 105, 308-314.
- Nwani, C.D. et al., 2016. Toxicological effects of carbosulfan in rats: antioxidant, enzymological, biochemical, and hematological responses. *Toxicol and Industrial Health* 32, 1335-1343.
- Oliveira, J.L.M. Comportamento do dicofol e da atrazina nos processos de tratamento de esgoto por lodo ativado e de pós-tratamento do lodo por biodigestores anaeróbios. 2008. 138f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Representação do Brasil. Brasília, 1996.
- Patel, M., 2016. Targeting oxidative stress in central nervous system disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 768-778.
- Pike, D.R., Knake, E.L., McGlamery, M.D., 2008. Weed control trends and practices in North America (Cap 4). In: Lebaron, H.M., McFarland, J.E., Burnside, O.C. (Eds.). *The triazine herbicides*. Amsterdam: Elsevier, p.45-56.
- Poppenga, R.H., Oehme, F.W., 2010. Pesticide use and associated morbidity and mortality in veterinary medicine. In: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Ed. Robert Krieger. Chapter 7, p.285-301. Academic Press, San Diego.
- Prade, L. et al., 1998. Herbicide detoxification by glutathione S-transferases as implicated from X-ray structures. *Pesticide Sciences* 55, 248-252.
- Prosen, H., 2012. Fate and determination of triazine herbicides in soil (Cap. 3). In: Hasaneen, M.N.A.E. (Ed.). *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*. Rijeka: Intech, p. 43-58.

- Rajendran, P. et al., 2014. Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta* 36, 332-347.
- Raley-Susman, K.M., 2014. Like a canary in the coal mine: behavioral change as an early warning sign of neurotoxicological damage. In: Larramendy, M.L., Soloneski, S. *Pesticides - Toxic Aspects*. InTech.
- Rebello, R.M., Caldas, E.D., 2014. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. *Química Nova* 37, 1199-1208.
- Rohr, J.R., McCoy, K.A., 2010. Qualitative Meta-Analysis Reveals Consistent Effects of Atrazine on Freshwater Fish and Amphibians. *Environ Health Perspect.* 118(1), 20-32.
- Roman, E.S., Vargas, L., 2005. Como funcionam os herbicidas: da biologia á aplicação. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 152 p.
- Schultz W., 2007. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci.* 30, 259-288.
- Semren, T.Ž., Žunec, S., Pizent, A., 2018. Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings. *Arh Hig Rada Toksikol.* 69, 109-125.
- Silva, A.S. Efeitos neurocomportamentais da exposição prolongada de ratos ao fipronil. 2008. 108f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Singh, M., Sandhir, R., Kiran, R., 2011. Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63, 269-276.
- SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas). Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento. 2016. Disponível em: <<https://sinitox.iciet.fiocruz.br/dados-nacionais>>. Acesso em: 04 dez. 2019.
- Soltaninejad, K., Abdollahi, M., 2009. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Med. Sci. Monit.* 15, 75-90.
- Song, X.Y., Li, J.N., Wu, Y.P., Zhang, B., Li, B.X., 2015. Atrazine causes autophagy- and apoptosis-related neurodegenerative effects in dopaminergic neurons in the rat nigrostriatal dopaminergic system. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 13490-13506.

- Spinosa, H.S., Xavier, F.G., 2008. Considerações gerais sobre os praguicidas. In: Spinosa, H.S., Górnaiak, S.L., Palermo-Neto, J. In: Toxicologia aplicada à medicina veterinária. São Paulo: Manole. Capítulo 9. 942p.
- Standaert, D.G., Galanter, J.M., 2009. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatologia da Farmacoterapia, p.166-185.
- Szegedi, V., Bárdos, G., Détári, L., Tóth, A., Banczerowski-Pelyhe, I., Világi, I., 2005. Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. Toxicology 214, 67-76.
- Terçariol, P.R.G. Avaliação neurocomportamental de ratos expostos agudamente ao fipronil - influência de diazepam e flumazenil. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.
- Udo, M.S.B. Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição pré-natal ao fipronil na prole de ratas Wistar. 2012. 146f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Vonberg, D., Hofmann, D., Vanderborght, J., Lelickens, A., Köppchen, S., Pütz, T., Burauel, P., Vereecken, H., 2014. Atrazine soil core residue analysis from an agricultural field 21 years after its ban. Journal of Environmental Quality 43, 1450-1459.
- Wang, W., Liu, L., Jiang, P., Chen, C., Zhang, T., 2017. Levodopa improves learning and memory ability on global cerebral ischemia-reperfusion injured rats in the Morris water maze test. Neuroscience Letters 636, 233-240.