

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

CHRISTIAN LIMBERGER

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CENTRAIS DO GLIFOSATO EM RATOS WISTAR

PORTO ALEGRE

2019

CHRISTIAN LIMBERGER

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CENTRAIS DO GLIFOSATO EM RATOS WISTAR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadores:

Marco Antônio Záchia Ayub

Débora Guerini de Souza

PORTO ALEGRE

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Limberger, Christian
Investigação dos Efeitos Centrais do Glifosato em
Ratos Wistar / Christian Limberger. -- 2019.
80 f.
Orientadores: Marco Antônio Záchia Ayub, Débora
Guerini de Souza.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curso de
Engenharia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

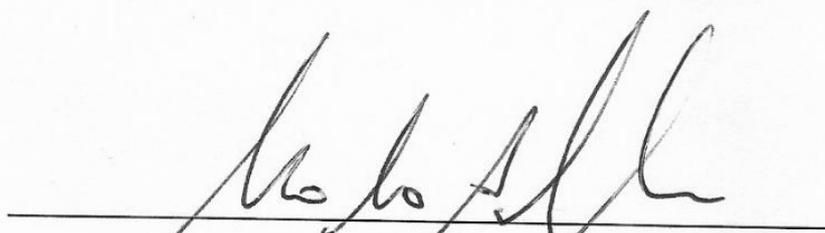
1. Glifosato. 2. Neurotoxicidade. 3. Astrócitos. 4.
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. I. Záchia
Ayub, Marco Antônio, orient. II. Guerini de Souza,
Débora, orient. III. Título.

CHRISTIAN LIMBERGER

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CENTRAIS DO GLIFOSATO EM RATOS WISTAR

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos

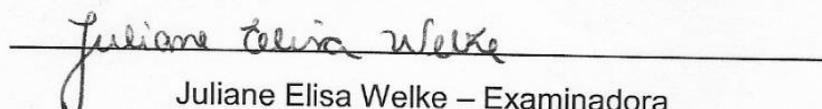
Aprovado em: Porto Alegre, 18 de dezembro de 2019.



Marco Antônio Záchia Ayub – Orientador
Doutor em Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos – University of Manchester



Débora Guerini de Souza – Orientadora
Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica - UFRGS



Juliane Elisa Welke – Examinadora
Doutora em Química - UFRGS



Mateus Grings – Examinador
Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica - UFRGS

À todas as pessoas que acreditam no poder transformador da educação e da ciência.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Silvana e minha avó e segunda mãe Noely, por todo o amor e suporte dado ao longo desses 6 anos. Vocês são a base de tudo. A valorização da educação, dada por vocês ao longo de toda a minha formação, me tornou o que sou hoje e também abriram as possibilidades para que eu me torne o que eu queira ser.

Ao Dalton, por ser muito mais que um namorado. Agradeço o amor incondicional, o apoio constante e todos os conselhos. Tu és o responsável por eu ter entrado na UFRGS. Todas as conquistas que vieram a partir daí, foram graças àquela sementinha plantada por ti e tantas outras que nós semeamos juntos até aqui.

À Débora, ou Debs, ou minha mãe científica. Agradeço pela oportunidade de ser teu bolsista e por ter me introduzido no mundo da neurociência. Muito mais que uma orientadora, de fato tu reúnes todas aquelas clássicas características maternas, daquela que ensina, que aconselha, que dá bronca, que incentiva e que cuida.

Ao prof. Ayub, por ter abraçado a causa, pela contribuição e inspiração com o tema desse estudo. Vou levar o teu espírito de professor crítico e questionador para a minha vida.

Aos professores Eduardo Zimmer e Diogo Souza, por toda contribuição científica e, por que não, filosófica. Logo que eu entrei no Bioquímica, algo me fez criar uma identificação muito grande com o laboratório 28. Acho que uma das coisas foi o amor que vocês têm por aquilo que fazem, e que permeia por entre nós.

À Pâmela, por ter sido parte fundamental desse projeto, agradeço o ensinamento compartilhado e toda a disponibilidade; afinal, não paramos nem nos finais de semana. À Fernanda, por todo o empenho e dedicação com esse projeto, obrigado por teu apoio essencial.

Às minhas irmãs científicas, Ana e Giovana, vocês foram fundamentais para esse trabalho. É lindo ver como aprendemos juntos e como crescemos desde quando tudo começou. Em meio a tantos desafios, com vocês tudo ficou mais fácil.

Às colegas do laboratório: Andreia, Alessandra, Bruna, Vanessa, Ana Bornes e Giovanna Collar. Antes de agradecer, peço desculpas pelo clichê, mas a verdade é que ninguém faz ciência sozinho e vocês são a prova disso.

À Louise, minha irmã de outras vidas, por estar presente desde o dia do vestibular e em todos os momentos importantes que sucederam. Agradeço pela forte amizade que construímos. Entrou comigo na Engenharia e foi para a Nutrição já no segundo ano. Logo ela, que era tão parecida comigo. Mal sabia eu que anos depois iria descobrir que também tinha um pé na área da saúde.

À Bárbara e Maria Eugênia por estarem presentes até o final, obrigado por tudo. À Taciana, por ter feito minhas viagens de trem menos difíceis.

Ao PET Engenharia de Alimentos e todas as formações do grupo pelas quais eu passei, fico muito realizado e orgulhoso de ter feito parte desse programa. Nessa reta final, vocês foram a leveza que contrabalanceou toda essa transição.

À Melina e prof.^a Simone, onde tudo começou, agradeço pelo imenso aprendizado. Ao Josué e prof. Plinho, obrigado por toda experiência que tivemos. À Caroline Lanita e Giuliana de Moura, muito mais do que chefes, vocês se tornaram grandes amigas que a vida me deu.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição com esse trabalho.

Às instituições e agências de fomento CNPq, INCT-EN, UFRGS e MEC.

À Jussânia, por ter sido o elo de ligação entre mim e a Débora. Agradeço por todos os momentos que tivemos juntos, em especial àqueles em que compartilhávamos nosso amor mútuo pela ciência. Lembro da nossa angústia em relação aos caminhos que estávamos trilhando, cada um na sua estrada. “Chris, eu não sei o que vai ser, mas eu sinto que no final tudo vai dar certo e vai valer à pena”. “Ju, eu não sei o que fazer... mas eu também sinto isso”.

E no final, posso dizer que sim, tudo deu certo. De uma forma que eu jamais poderia imaginar.

“Ninguém nasce feito, ninguém nasce marcado para ser isso ou aquilo. Pelo contrário, nos tornamos isso ou aquilo. Somos programados, mas, para aprender”.

Paulo Freire

RESUMO

Os herbicidas à base de glifosato são os agrotóxicos mais utilizados, principalmente devido ao uso no plantio de grãos geneticamente modificados. Estudos indicam que a exposição ao glifosato pode resultar em riscos imediatos e tardios à saúde humana; entretanto, os efeitos biológicos decorrentes da exposição a esse agrotóxico ainda são pouco caracterizados. O sistema nervoso central é o mais complexo sistema de mamíferos e pode ser afetado pela exposição contínua a agentes tóxicos como o glifosato. A exposição ao glifosato pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, contudo os mecanismos de ação pelos quais o herbicida exerce seus efeitos neurotóxicos ainda não estão totalmente elucidados. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi investigar alterações bioquímicas no líquido cefalorraquidiano e em fatias cerebrais de ratos *Wistar* expostos agudamente ao glifosato, bem como desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificação de glifosato e seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), no líquido cefalorraquidiano por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Os resultados sugerem alterações no metabolismo de aminoácidos no cérebro e o estabelecimento de um quadro de excitotoxicidade glutamatérgica. O método bioanalítico foi desenvolvido e parcialmente validado, demonstrando ser linear, sensível e preciso. Este estudo é essencial para a elucidação dos mecanismos neurotóxicos do glifosato, bem como para fundamentar a necessidade da diminuição do uso excessivo de agrotóxicos.

Palavras-chave: Glifosato. Neurotoxicidade. Astrócitos. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

ABSTRACT

Glyphosate-based herbicides are the most widely used pesticides, mainly due to their use in genetically modified crops. Several studies have shown that glyphosate exposure can result in immediate and late risks to human health. However, the biological effects due to the pesticide exposure are still poorly characterized. The central nervous system is the most complex mammalian system and can be affected by prolonged exposure to toxic agents such as glyphosate. Glyphosate exposure may be a risk factor for neurodegenerative diseases, but how the herbicide exerts its neurotoxic effects is not yet fully understood. Therefore, the aim of this study was to investigate alterations of biochemical parameters associated with acute exposure to glyphosate in cerebrospinal fluid and brain slices of Wistar rats, as well as the development and validation of a bioanalytical method for quantification of glyphosate and its main metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) in cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Our results suggest changes in amino acid metabolism in the brain, as well as the onset of glutamate excitotoxicity. The bioanalytical method was partially validated and demonstrated to be linear, sensitive and accurate. This study is essential to elucidate the factors involved with glyphosate neurotoxicity, and also for supporting the need to reduce the use of pesticides.

Keywords: Glyphosate. Neurotoxicity. Astrocytes. High Performance Liquid Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do herbicida glifosato	15
Figura 2 - Mecanismo de ação do glifosato nas plantas	16
Figura 3 - Metabolização do glifosato por microrganismos	17
Figura 4 - Estrutura química do AMPA (ácido aminometilfosfônico)	17
Figura 5 – Representação da interação glia-neurônio.....	24
Figura 6 – Desenho esquemático de uma sinapse glutamatérgica	26
Figura 7 – Unidade neurovascular da barreira hematoencefálica	28
Figura 8 – Proporções da barreira hematoencefálica.....	28
Figura 9 – Propriedades relacionadas ao transporte molecular na barreira hematoencefálica	29
Figura 10 - Locais de produção, circulação e eliminação do líquido cefalorraquidiano no cérebro	30
Figura 11 – Diagrama esquemático de um sistema cromatográfico CLAE	33
Figura 12 – Reação de derivatização do glifosato e AMPA utilizando FMOC-Cl	35
Figura 13 – Cromatograma representativo da separação dos padrões analíticos dos aminoácidos por CLAE-FL conforme método proposto por Schmidt et al. (2009).....	44
Figura 14 - Concentração dos aminoácidos alanina, isoleucina, triptofano e valina no LCR de ratos expostos agudamente ao glifosato.....	45
Figura 15 - Concentração dos aminoácidos glutamina, leucina, lisina, metionina e fenilalanina no LCR de ratos expostos agudamente ao glifosato.....	46
Figura 16 - Concentração dos aminoácidos aspartato, glutamato e ornitina no LCR de ratos expostos agudamente ao glifosato.....	47
Figura 17 – Via de síntese das poliaminas.....	50
Figura 18 - Concentração de albumina no LCR de ratos expostos agudamente ao glifosato.....	51
Figura 19 – Efeitos da exposição aguda de ratos ao glifosato na captação de glutamato no córtex, hipocampo e estriado.....	53

Figura 20 – Imunoconteúdo de GFAP nas regiões do córtex, hipocampo e estriado de ratos expostos agudamente ao glifosato	54
Figura 21 – Liberação do aminoácido glutamato pelo córtex, hipocampo e estriado de ratos expostos agudamente ao glifosato	55
Figura 22 – Liberação do aminoácido aspartato pelo córtex, hipocampo e estriado de ratos expostos agudamente ao glifosato	55
Figura 23 – Liberação do aminoácido ornitina pelo córtex, hipocampo e estriado de ratos expostos agudamente ao glifosato	57
Figura 24 – Cromatograma representativo do controle sem adição dos analitos	58
Figura 25 – Cromatograma representativo de amostras de LCR adicionadas de glifosato (A) e AMPA (B) nas concentrações (ng/mL): 10 (preto), 20 (rosa), 40 (azul claro), 120 (violeta), 200 (verde), 300 (azul marinho) e 500 (marrom)	59
Figura 26 – Análise de linearidade (A) e análise de resíduos (B) do glifosato derivatizado com FMOC-Cl e analisado por CLAE-FL	60
Figura 27 – Análise de linearidade (A) e análise de resíduos (B) do AMPA derivatizado com FMOC-Cl e analisado por CLAE-FL	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise de variância da regressão das curvas de glifosato e AMPA.....62

Tabela 2 - Precisão (% CV) para a determinação de glifosato e AMPA.....63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	ácido aminometilfosfônico
AMPA _r	receptor ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico
ATP	adenosina trifosfato
BHE	barreira hematoencefálica
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FL	cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência
CQA	controle de qualidade alta
CQB	controle de qualidade baixa
CQM	controle de qualidade média
CV	coeficiente de variação
DNA	ácido desoxirribonucleico
EPSPS	enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
FMOC-Cl	cloroformiato de 9-fluorenilmetila
HBSS <i>solution</i>)	solução salina balanceada de Hanks (do inglês <i>Hank's balanced salt solution</i>)
IDA	ingestão diária aceitável
LCR	líquido cefalorraquidiano
LMR	limite máximo de resíduos
NMDA	N-metil-D-aspartato
ODC	ornitina descarboxilase
RNA	ácido ribonucleico
SNC	sistema nervoso central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 GLIFOSATO	15
2.1.1 Aspectos econômicos	18
2.1.2 Avaliação toxicológica	19
2.1.3 Exposição humana	21
2.2 SISTEMA NERVOSO CENTRAL	23
2.2.1 Papel astrocitário no SNC	25
2.2.2 Barreira hematoencefálica	27
2.3 NEUROTOXICIDADE DO GLIFOSATO	30
2.4 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE GLIFOSATO E AMPA POR CLAE-FL ..	32
2.4.1 Considerações gerais sobre CLAE-FL	32
2.4.2 Condições cromatográficas	33
2.4.3 Determinação de glifosato e AMPA em amostras biológicas	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 ANIMAIS	37
3.2 TRATAMENTO	37
3.3 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO	38
3.4 WESTERN BLOT	38
3.5 DOSAGENS BIOQUÍMICAS	39
3.5.1 Aminoácidos	39
3.5.2 Albumina	39
3.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA	40
3.6.1 Reagentes e padrões	40
3.6.2 Soluções-estoque, padrões de calibração e padrões de controle de qualidade	40
3.6.3 Preparação das amostras	41
3.6.4 Condições cromatográficas	41
3.6.5 Validação do método	42
3.6.5.1 Linearidade	42
3.6.5.2 Precisão	42

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO	44
4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO NO CÓRTEX, HIPOCAMPO E ESTRIADO	52
4.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO	57
5 CONCLUSÃO	65
6 PERSPECTIVAS.....	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

O glifosato é o princípio ativo do agrotóxico *Roundup*[®], o herbicida mais utilizado no Brasil e no mundo, principalmente devido ao uso associado ao plantio de culturas geneticamente modificadas. Os resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) - seu principal metabólito ambiental - podem resultar em uma ampla gama de riscos à saúde humana, tendo em vista que a real exposição é pouco caracterizada e os impactos da ingestão crônica são desconhecidos.

Até o momento, já foi demonstrada a capacidade neurotóxica do glifosato, porém esta permanece pouco compreendida. O sistema nervoso central (SNC) é o mais complexo sistema de mamíferos, contando com vários tipos celulares que atuam em conjunto na manutenção das funções vitais. Aspectos cognitivos como comportamento e memória são o resultado do esforço coletivo de neurônios e células gliais - astrócitos, oligodendrócitos e microglia - e podem ser afetados pela exposição contínua a agentes tóxicos como o glifosato.

Estudos demonstram a capacidade neurotóxica do glifosato, entretanto a toxicocinética deste herbicida no líquido cefalorraquidiano (LCR) ainda não está determinada, especialmente em se tratando da administração da formulação comercial do herbicida, questão fundamental para compreender qual a dose mais crítica para o desencadeamento de eventos neurotóxicos e o tempo necessário para que ocorram.

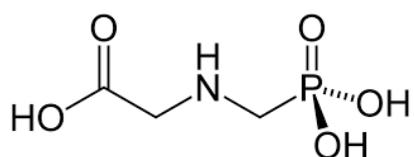
Assim, este trabalho tem como objetivo investigar o impacto central da ingestão de herbicida à base de glifosato através da análise de parâmetros bioquímicos em ratos *Wistar*, bem como desenvolver e validar um método bioanalítico para a quantificação de glifosato e AMPA no LCR de ratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-FL).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GLIFOSATO

O glifosato (N-(fosfonometil)glicina; $C_3H_8NO_5P$) é um composto químico organofosforado análogo ao aminoácido natural glicina (Figura 1). É utilizado como princípio ativo de herbicidas sistêmicos não-seletivos de amplo espectro. Para aumentar sua solubilidade, é geralmente formulado como sal de potássio, sódio, amônio ou, mais comumente, sal de isopropilamina. Foi sintetizado em 1950 por Henri Martin para uma companhia farmacêutica; entretanto, pela ausência de finalidade terapêutica foi vendido para outras empresas. Somente em 1970 sua função como herbicida foi descoberta por John Franz e introduzido no mercado em 1974 pela empresa Monsanto sob o nome comercial de *Roundup*[®], empregado como dessecante agrícola antes do plantio de culturas e no controle de plantas daninhas e gramíneas em ambientes agrícolas, industriais, urbanos e florestais (BENBROOK, 2016; CUHRA, 2015).

Figura 1 – Estrutura química do herbicida glifosato.

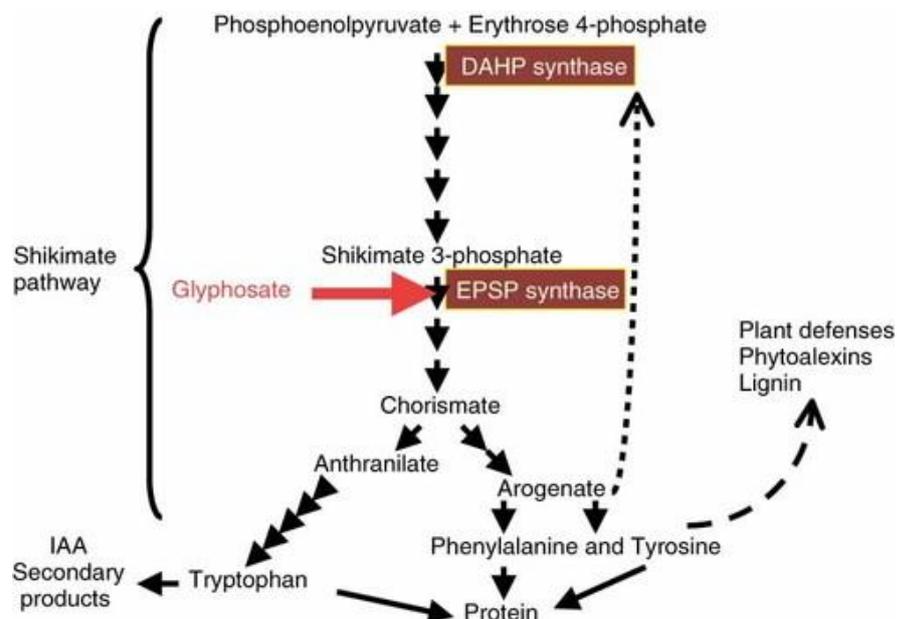


Fonte: BAI & OGBOURNE, 2016.

O glifosato é absorvido através das regiões clorofiladas (folhas e tecidos verdes) e transportado dentro da planta através do floema interrompendo seu metabolismo e matando por ação sistêmica (AMRHEIN et al., 1980). Sendo assim, os herbicidas à base de glifosato são formulações com vários adjuvantes; em particular, surfactantes como a taloamina polietoxilada (POEA) que aumentam a absorção e translocação do ingrediente ativo nas plantas (VAN BRUGGEN et al., 2018; MESNAGE, BERNAY & SÉRALINI, 2013).

O glifosato é um análogo do estado de transição do fosfoenolpiruvato, um dos substratos da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), pertencente à via metabólica do chiquimato nas plantas (Figura 2). A inibição da enzima EPSPS leva ao bloqueio da síntese de corismato, precursor dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina, os quais são fundamentais para a síntese de proteínas e desempenham um papel importante na produção de metabólitos secundários (AMRHEIN et al., 1980; BAI & OGBOURNE, 2016). Essa via de biossíntese de aminoácidos aromáticos não é expressa no reino animal, tornando esse mecanismo de ação exclusivo das plantas (WILLIAMS, KROES & MUNRO, 2000).

Figura 2 - Mecanismo de ação do glifosato nas plantas.

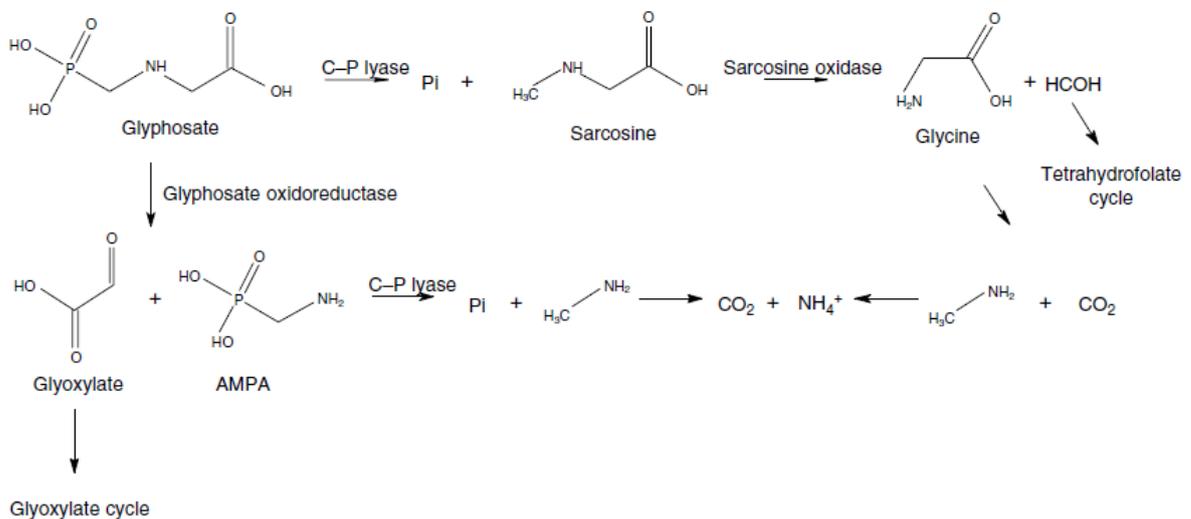


Fonte: DUKE & POWLES, 2008.

A degradação de pesticidas consiste em processos bióticos (degradação microbiana) e abióticos (fotodegradação e degradação química, por exemplo) (BENTO et al., 2016). Uma vez aplicado, o glifosato pode sofrer mineralização, imobilização ou lixiviação (BAI & OGBOURNE, 2016). A principal via de degradação do glifosato é através da mineralização por microrganismos de solo e água, que podem realizar a metabolização por duas vias (Figura 3) (BENTO et al., 2016). Uma

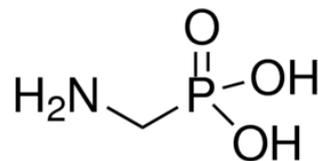
das vias forma o intermediário sarcosina - que se decompõe facilmente e, assim, não é facilmente detectado no solo - e a outra leva à formação do AMPA (ácido aminometilfosfônico; $\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$), o principal produto de metabolização do glifosato - mais resistente à degradação, sendo que 70% do glifosato é convertido em AMPA (BORGGAARD & GIMSING, 2008). A Figura 4 ilustra a representação química estrutural da molécula de AMPA.

Figura 3 - Metabolização do glifosato por microrganismos.



Fonte: BORGGAARD & GIMSING, 2008.

Figura 4 - Estrutura química do AMPA (ácido aminometilfosfônico).



Fonte: BAI & OGBOURNE, 2016.

Tanto o glifosato quanto o AMPA podem ser relativamente persistentes no ambiente, o que pode resultar em uma ampla gama de riscos ecológicos, tais como a presença de seus resíduos no solo, na água e em culturas após a aplicação de

glifosato a plantas daninhas, mesmo após o período de retenção recomendado nas culturas colhidas (BAI & OGBOURNE, 2016). O tempo de meia-vida do glifosato no ambiente pode ser de até 197 dias. Já o AMPA é mais persistente, com meia-vida de até 958 dias. O tempo de degradação depende, sobretudo, das condições ambientais e das propriedades do solo (BENTO et al., 2016).

A partir de 1996, as culturas geneticamente modificadas de soja, milho, canola e algodão *Roundup-Ready*[®] resistentes ao glifosato foram aprovadas para comercialização nos Estados Unidos (BENBROOK, 2016). Essas culturas têm o genoma modificado através de processos de engenharia genética que as fazem super-expressar a enzima EPSPS ou expressar variantes microbianas da enzima que não são inibidas pelo glifosato (STEPHENSON & HARRIS, 2016; SWANSON et al., 2014). Essa tecnologia tornou possível utilizar o glifosato como um herbicida de pós-emergência, estendendo o período de tempo durante o qual os herbicidas à base de glifosato podem ser aplicados (BENBROOK, 2016).

2.1.1 Aspectos Econômicos

Em 2000, a patente da Monsanto expirou e outras empresas passaram a utilizar o glifosato como princípio ativo dos herbicidas que ficaram popularmente conhecidos como “mata-mato” (BENBROOK, 2016). A popularidade do glifosato gira em torno de sua eficiência em matar ervas daninhas a baixo custo, rápida absorção pelas plantas, lenta evolução da resistência ao composto químico e a associação do uso com culturas geneticamente modificadas (DUKE & POWLES, 2008).

Globalmente, o uso de glifosato aumentou cerca de quinze vezes desde a introdução das culturas *Roundup-Ready*[®], de 51 milhões de kg em 1995 para 747 milhões de kg em 2014. No mesmo período, o uso não-agrícola aumentou de 16 milhões de kg para 79 milhões de kg (BENBROOK, 2016). Cultivos transgênicos resistentes ao glifosato têm crescido amplamente desde 1996 e, em 2015, o cultivo global atingiu 147,9 milhões de hectares - um aumento de 200 vezes em relação ao nível de 0,7 milhão em 1996 (BENBROOK, 2016). O mercado global de glifosato foi avaliado em US\$ 7,24 bilhões em 2017 e deve atingir US\$ 10,88 bilhões em 2024. Em

termos de volume, o mercado mundial ficou em torno de 785.300 toneladas de glifosato vendidas em 2017 (ZION MARKET RESEARCH, 2018).

No Brasil, o extenso uso de agrotóxicos é destinado a produção agropecuária voltada para sua conversão em *commodities* e agroenergia. Desde 2008 o país é o líder mundial em uso de agrotóxicos, consumindo 20% do que é comercializado mundialmente. Deste montante, 72% é voltado para apenas três cultivos (soja, milho e cana), sendo que a soja, sozinha, ocupa mais de 30 milhões de hectares do solo brasileiro, onde são destinados metade do volume de agrotóxicos comercializados no país. Uma parte significativa desses cultivos são de sementes transgênicas tolerantes ao glifosato, como por exemplo, 96,5% da produção de soja e 88,4% de milho (BOMBARDI, 2017).

2.1.2 Avaliação Toxicológica

Os efeitos nocivos do glifosato e do AMPA na qualidade do solo e da água e na saúde animal, vegetal e humana passaram a chamar atenção nos últimos anos devido ao uso intensivo de herbicidas à base de glifosato e seu acúmulo no ambiente e em alimentos (VAN BRUGGEN, 2018). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) avaliou o glifosato e seu potencial carcinogênico em 2015 e concluiu ser “provavelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2A)”. Esta conclusão baseou-se na avaliação de dados publicamente disponíveis, incluindo dados sobre o ingrediente ativo, bem como sobre herbicidas formulados contendo glifosato (IARC, 2015).

Por outro lado, no mesmo ano a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) reconheceu o glifosato como seguro quando usado nos níveis permitidos de acordo com a legislação de cada país (EFSA, 2015). Em 2016, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), baseada na avaliação de estudos com animais conduzidos pelas empresas registrantes, estudos epidemiológicos publicados e banco de dados de genotoxicidade sobre glifosato de grau analítico, concluiu que os herbicidas à base de glifosato “não são prováveis carcinogênicos para humanos em doses relevantes para avaliação de risco à saúde humana”. Essas doses, conforme

discutido na avaliação da EPA, são baseadas em resíduos de alimentos e bebidas seguindo as aplicações legais (U.S. EPA, 2016). Outras agências na União Europeia, incluindo o Instituto Federal Alemão para Avaliação de Risco (BfR), focaram os estudos do ingrediente ativo, sem considerar a formulação completa dos herbicidas à base de glifosato (GERMAN FEDERAL INSTITUTE FOR RISK ASSESSMENT, 2016; VANDENBERG et al., 2016).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) terminou em 2018 a reavaliação do uso do glifosato que estava sendo conduzida desde 2008 e abriu uma consulta pública para aprovação em 2019. A ANVISA concluiu que o produto “não se enquadra nos critérios proibitivos previstos na legislação pois não foi classificado como mutagênico, carcinogênico, tóxico para a reprodução, teratogênico, entre outros”. A decisão foi baseada em relatórios de agências reguladoras internacionais e pareceres técnicos; entre eles, uma avaliação da presença do glifosato em 906 amostras de arroz, manga e uva (ANVISA, 2019). Tal amostragem não é significativa para uma avaliação da ingestão diária total de glifosato.

Diferentes agências governamentais estabelecem seus níveis de ingestão diária aceitável (IDA) para herbicidas como o glifosato em seus países. A IDA definida pela EPA nos Estados Unidos é de 1,75 mg de glifosato por quilograma de peso corporal por dia (mg/kg p.c./dia) (U.S. EPA, 2016). O Grupo de Peritos em Resíduos de Agrotóxicos (JMPR) da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e a Organização Mundial da Saúde, define uma IDA de 1 mg/kg p.c./dia (JMPR, 2019). Na União Europeia, a EFSA define uma IDA ainda menor: 0,5 mg/kg p.c./dia (EFSA, 2015). Recentemente no Brasil, a reavaliação toxicológica do glifosato aberta para consulta pública visa aumentar a IDA de 0,042 mg/kg p.c./dia para 0,5 mg/kg p.c./dia (ANVISA, 2019).

Como observado anteriormente, o uso dos herbicidas à base de glifosato aumentou significativamente nos últimos 10 anos. A maioria dos estudos considerados pelas agências reguladoras durante a avaliação desses agrotóxicos concentrou-se apenas no princípio ativo, e foi conduzida há mais de 30 anos atrás. Na revisão de registros de herbicidas à base de glifosato de 1993 da EPA nos EUA, por exemplo, 73% das quase 300 citações foram publicadas antes de 1985; mais importante, apenas 11 foram revisados por pares. Considerando o aumento de 100 vezes no uso destes herbicidas nas últimas quatro décadas, o aumento da exposição

humana é inevitável (MYERS et al., 2016; U.S. EPA, 2016; VANDENBERG et al., 2017).

Grande parte dos estudos em animais conduzidos por empresas registradoras e dos estudos feitos pela academia realizaram tratamentos utilizando glifosato puro. Assim, os principais parâmetros toxicológicos incorporados nas avaliações regulatórias de risco à saúde humana refletem riscos da exposição ao glifosato puro na ausência de adjuvantes químicos. Os herbicidas formulados contêm tipicamente entre 2 e 60% de glifosato e uma fração de 1% a 25% de surfactantes e outros co-formulantes (SWANSON et al., 2014). Sendo assim, as avaliações internacionais podem estar subestimando a toxicidade do glifosato e são insuficientes para avaliar a relevância das exposições humana e ambiental (VANDENBERG et al., 2017).

2.1.3 Exposição Humana

Os limites máximos de resíduos (LMR) determinados pelo *Codex Alimentarius* para glifosato em alimentos e produtos agrícolas são abrangentes: de 0,05 mg/kg (ou ppm) em alimentos como banana, leite, ovos e carne animal e até 500 mg/kg para produtos destinados ao uso de rações. Para as culturas tolerantes ao glifosato mais comuns, o LMR é de 5 mg/kg para o milho e 20 mg/kg para a soja, por exemplo (WHO, 2018). No Brasil, em 2004 o LMR para a soja tolerante ao glifosato foi aumentado de 0,2 para 10 mg/kg: um aumento de 50 vezes. Na Europa, o LMR do glifosato na soja foi elevado de 0,1 a 20 mg/kg em 1999. Em 2013, foi aumentado de 20 para 40 mg/kg nos EUA. Os aumentos coincidem com o desenvolvimento industrial de novas variedades geneticamente modificadas com maior tolerância ao glifosato (CUHRA, 2015).

Em 2016, o FDA publicou seu relatório de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos com a análise de resíduos de glifosato em amostras de soja, milho, leite e ovos. No relatório consta apenas que as amostras não atingiram o LMR, sem divulgar os níveis de glifosato encontrados. Na Argentina, um estudo de 2013 mostrou que sete das onze amostras de soja analisadas ultrapassaram o LMR de 20 ppm, alcançando um nível de até 100 ppm (TEST BIOTECH, 2013). No Brasil, a

ANVISA não analisa resíduos de glifosato no seu programa de monitoramento com a justificativa de que a metodologia ser específica e sobrecarregar a rotina laboratorial (ANVISA, 2016). A lei brasileira permite um limite de contaminação na água potável 5 mil vezes superior ao permitido na Europa. No caso do feijão e da soja, o uso permitido no cultivo chega a ser 400 e 200 vezes superior (BOMBARDI, 2017). O uso do glifosato é permitido nos cultivos de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, eucalipto, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagem, pêra, pêsego, trigo, uva e soja (ANVISA, 2015). Ao redor do mundo, diversos países, estados ou cidades já baniram o uso do glifosato ou têm restrições em relação ao seu uso (BAUM TRIAL LAWIERS, 2019).

As aplicações de herbicidas à base de glifosato estão sendo feitas cada vez mais tarde durante a safra das culturas transgênicas para acelerar as operações de morte, secagem e colheita. Por essas razões, os níveis de resíduos em alguns grãos colhidos, sementes oleaginosas e outras culturas são substancialmente mais elevados do que há uma década e, como resultado, a exposição alimentar humana tende a aumentar progressivamente (MYERS et al., 2016).

Nos animais, cerca de 20% do glifosato administrado por via oral é absorvido a partir do trato gastrointestinal, enquanto o restante é eliminado praticamente inalterado pelas fezes. O glifosato não bioacumula e é pouco metabolizado (EFSA, 2015). Sendo assim, os níveis de glifosato e AMPA na urina são bons marcadores da exposição humana (ZOLLER et al., 2018). A presença de glifosato nos alimentos e na água é um indicativo de que a população em geral possa estar regularmente ingerindo seus resíduos. Contudo, a real exposição humana através dos alimentos é pouco caracterizada e os impactos de uma ingestão crônica são desconhecidos (MESNAGE et al., 2015, ZHAO et al., 2018).

Gillezeau et al. (2019) revisaram evidências em relação à exposição humana ao glifosato. Os autores mencionaram que oito estudos relataram níveis urinários de glifosato em 423 indivíduos ocupacionalmente expostos e outros quatorze estudos que avaliaram níveis de glifosato em fluidos biológicos em 3298 indivíduos da população geral. Os níveis urinários em indivíduos ocupacionalmente expostos variou de 0,26 a 73,5 µg/L; níveis urinários de exposição ambiental variaram de 0,16 a 7,6 µg/L.

Entre a população geral, os níveis médios de glifosato na urina são geralmente inferiores a 4 µg/L. A maioria dos estudos de exposição ambiental foram realizados nos EUA e na Europa. Existem também dados limitados sobre a variabilidade geográfica dos níveis de exposição das populações. Apenas um estudo relatou níveis urinários na América do Sul, apesar do fato de que o glifosato é amplamente utilizado e pulverizado em grande parte do continente. Ademais, os níveis médios de glifosato medidos na população em geral e nos indivíduos ocupacionalmente expostos são muito similares, o que é um achado incomum. Isso sugere que possa haver episódios de alta exposição que não são abordados nessas avaliações (GILLEZEAU et al., 2019).

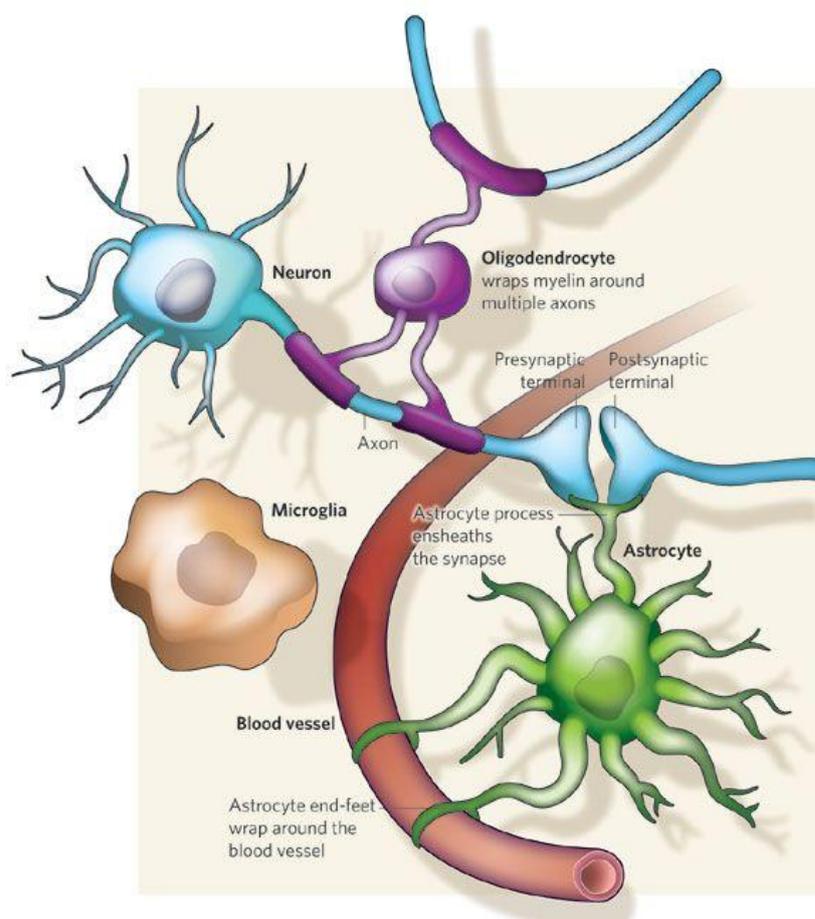
2.2 SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O SNC, composto pela medula espinhal e pelo encéfalo, é referido como "central" porque é responsável pela recepção e integração de informações de todo o corpo e por coordenar a atividade em todo o organismo (SQUIRE et al., 2012). Entre as estruturas cerebrais, pode-se destacar o córtex, que compreende a maior porção do cérebro e desempenha um papel fundamental em várias funções como a memória, atenção, consciência, linguagem e percepção (JAVED & LUI, 2019); o hipocampo, cuja função é primordial para a aprendizagem e a formação e consolidação da memória (BARTSCH & WULFF, 2015); e o corpo estriado, que recebe *inputs* de diferentes áreas do córtex, como áreas do processamento de informações corticais, bem como do córtex sensório-motor (ROLLS, 1994).

As células do SNC são as unidades efetoras cujas atividades somadas resultam nas complexas funções que ele desempenha. As principais células que o compõe são: neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e microglia (Figura 5). Neurônios são células excitáveis que transmitem informações através da liberação de neurotransmissores. Eles adquirem, processam e armazenam informações nas sinapses. As demais células, chamadas coletivamente de células gliais, são consideradas não-excitáveis, no cérebro são mais numerosas que os neurônios e exercem diversas funções que culminam com o adequado funcionamento neuronal e, conseqüentemente, do sistema como um todo (PEREA, SUR & ARAQUE, 2014). De maneira resumida, podemos destacar as funções gliais como gerenciamento de neurotransmissores e

tamponamento iônico (astrócitos), produção da bainha de mielina (oligodendrócitos) e resposta imune/inflamatória (microglia) (ALLEN & BARRES, 2009).

Figura 5 – Representação da interação glia-neurônio.



Fonte: ALLEN & BARRES, 2009.

O movimento de íons é responsável por parte da comunicação do sistema nervoso, visto que os íons medeiam os sinais elétricos, o que estimula a comunicação sináptica. As sinapses elétricas são formadas por junções comunicantes de dois neurônios, por onde fluem os íons que despolarizam diretamente esses neurônios em sincronia (SQUIRE et al., 2012).

As sinapses químicas existem em maior número no SNC; são compostas por um terminal pré-sináptico, uma fenda sináptica, um terminal pós-sináptico e um processo astrocitário. Quando um potencial de ação chega a um terminal axonal (pré-sináptico), canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes se abrem, e o influxo de Ca^{2+} faz as vesículas com neurotransmissores se fundirem à membrana, liberando neurotransmissores na fenda sináptica (BRADY, 2011).

Existem vários tipos de neurotransmissores; cada um deles se liga a um receptor específico e tem um efeito característico. Os receptores podem estar acoplados a um canal iônico (receptores ionotrópicos) ou a uma cascata de sinalização intracelular (receptores metabotrópicos). Os neurotransmissores são específicos para a produção de sinapses excitatórias ou inibitórias. O fluxo iônico resultante cria um potencial pós-sináptico e o tipo de canal iônico aberto determinará se é induzido um potencial pós-sináptico inibitório (influxo de Cl^- ou efluxo de K^+) ou excitatório (influxo de Na^+). Os neurotransmissores excitatórios são responsáveis pela maior parte da transmissão sináptica que ocorre no cérebro dos mamíferos (BRADY, 2011).

2.2.1 Papel astrocitário no SNC

Os estudos sobre a interação neurônio-astrocítico revelam que os astrócitos são componentes fundamentais para o funcionamento do SNC. Essas células são reguladoras críticas da função e plasticidade cerebrais, tendo em vista que os processos astrocitários envolvem as sinapses e formam um compartimento funcional crítico para a manutenção da homeostase cerebral, principalmente através do gerenciamento de íons e neurotransmissores (ALLEN & EROGLU, 2017; SOUZA et al., 2019).

Os astrócitos respondem a insultos e patologias no SNC através de um processo conhecido como reatividade astrocitária, que compreende um espectro de alterações morfológicas, moleculares e fisiológicas. Essas modificações variam com a gravidade do insulto, ao longo de um processo gradual de alterações na expressão de proteínas, captação e liberação de diversos fatores, hipertrofia celular e formação de cicatrizes gliais (SOFRONIEW & WINTERS, 2010). O aumento da expressão de proteínas de filamento intermediário, em particular a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) por astrócitos reativos é uma das principais marcas da reatividade astrocitária (LIDDELOW & BARRES, 2017; PEKNY & NILSSON, 2005).

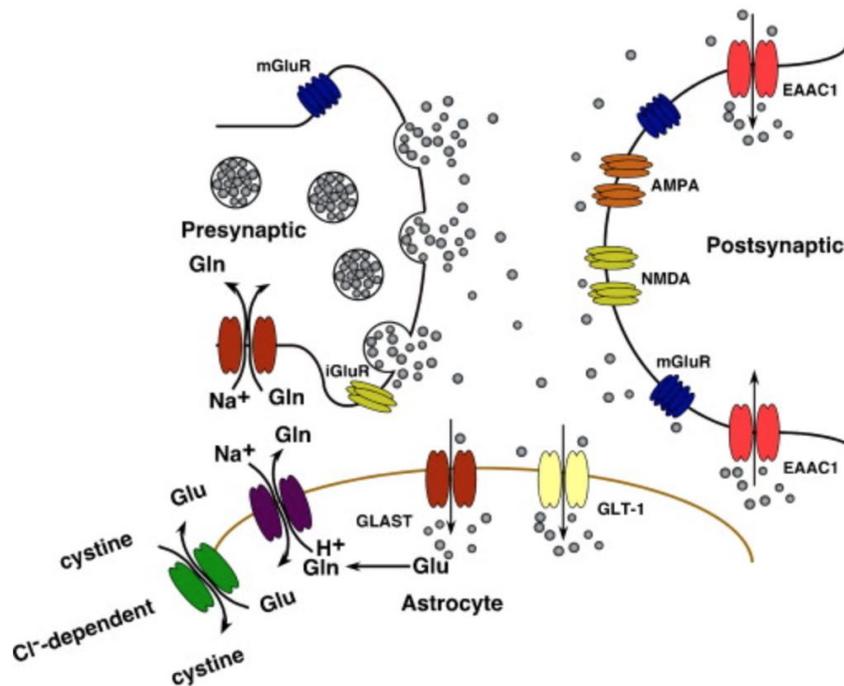
Os astrócitos expressam diversos transportadores de neurotransmissores, regulando a formação de diferentes tipos de sinapses, tais como as sinapses glutamatérgicas, GABAérgicas, glicinérgicas e colinérgicas (CHUNG, ALLEN & EROGLU, 2015). Prolongamentos perisinápticos do corpo astrocitário removem rapidamente os neurotransmissores liberados no espaço intersticial, evitando seu

acúmulo na fenda sináptica e limitando a propagação dos neurotransmissores às sinapses adjacentes (ALLEN & EROGLU, 2017).

As sinapses excitatórias predominam na substância cinzenta - apenas as glutamatérgicas representam pelo menos 80% das sinapses corticais (BÉLANGER, ALLAMAN & MAGISTRETTI, 2011). Sendo assim, o glutamato está presente em grandes concentrações no cérebro, o qual possui importantes mecanismos de proteção contra o excesso de ativação glutamatérgica. Como não há conversão extracelular de glutamato (ou esta é desprezível), o tecido cerebral precisa de uma atividade de captação de glutamato rápida para se proteger contra a toxicidade causada pelo acúmulo desse neurotransmissor (DANBOLT, 2001).

Os processos astrocíticos são carregados com transportadores de glutamato, o que garante que não haja acúmulo extra-sináptico. Os astrócitos transformam o excesso de glutamato em glutamina e a transportam de volta aos neurônios de forma a contribuir com a manutenção da transmissão sináptica a partir da regeneração do glutamato pelos neurônios e consequente reposição do *pool* desse neurotransmissor (TANI et al., 2014). A Figura 6 ilustra o funcionamento de uma sinapse glutamatérgica.

Figura 6 – Desenho esquemático de uma sinapse glutamatérgica.



Fonte: SHELDON & ROBINSON, 2012.

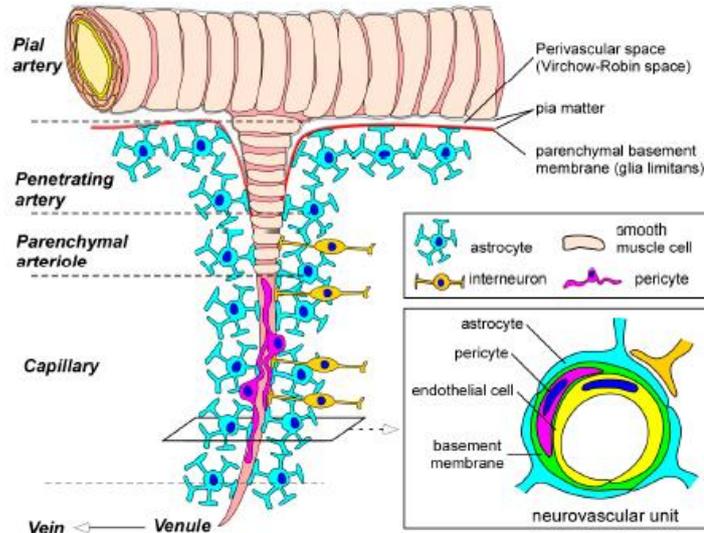
A homeostase do metabolismo glutamatérgico compreende mecanismos altamente regulados, fundamentais para o funcionamento geral do SNC. Danos astrocitários com conseqüente redução na captação de glutamato e acúmulo do neurotransmissor na fenda sináptica afetam diretamente os neurônios. Este fenômeno é conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica e pode culminar em produção de radicais livres, disfunção mitocondrial e morte celular, tendo graves efeitos clínicos (BÉLANGER, ALLAMAN & MAGISTRETTI, 2011; PEREA, SUR & ARAQUE, 2014). Doenças neurológicas e neurodegenerativas com etiologias distintas compartilham a excitotoxicidade como uma via patológica comum com diferentes conseqüências para cada doença, entre elas epilepsia, esclerose múltipla, trauma cranioencefálico, doença de Huntington, doença de Alzheimer, entre outras (HASSEL & DINGLEDINE, 2012).

2.2.2 Barreira Hematoencefálica

Os vasos sanguíneos são componentes essenciais do sistema circulatório que transportam o sangue por todo o corpo, cujo funcionamento adequado é essencial para manter a homeostase dos órgãos e tecidos (YAMAZAKI & KANEKIYO, 2016). O SNC é um ambiente perfeitamente regulado, com condições muito distintas daquelas do restante do organismo. A barreira hematoencefálica (BHE) é a fronteira que isola os tecidos do cérebro das substâncias que se propagam no sistema circulatório periférico. É também uma barreira de difusão que permite que apenas água e pequenas moléculas lipofílicas acessem livremente o cérebro de acordo com seus gradientes de concentração (BERNACKI et al., 2008).

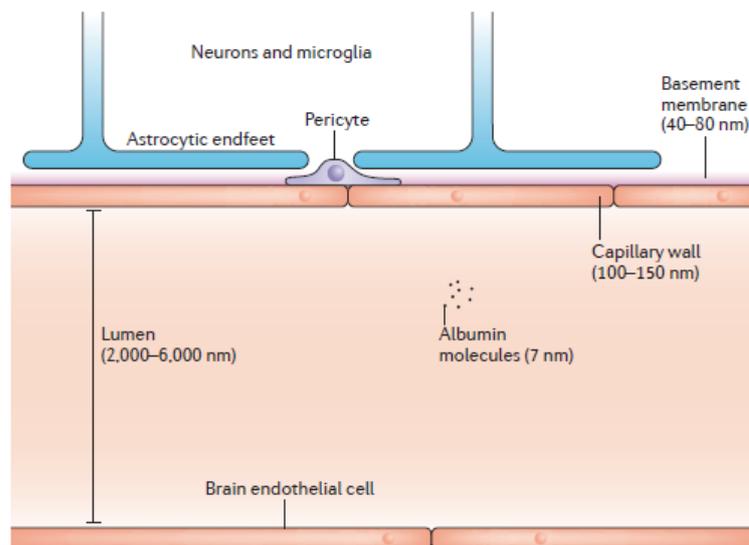
A BHE é formada por uma estrutura dinâmica chamada de unidade neurovascular, conceito que foi introduzido nos últimos anos a partir do reconhecimento de que a formação da barreira depende de interações entre neurônios e células não-neuronais vasculares (células endoteliais e pericitos) e glia (astrócitos) (WONG et al., 2013). Nos capilares sanguíneos cerebrais, as células endoteliais formam a estrutura do tubo, no qual a superfície abluminal é coberta por membranas basais compostas por matriz extracelular. Os tubos endoteliais são cercados por pericitos e processos astrocitários, compreendendo a unidade neurovascular, como ilustra a Figura 7 (YAMAZAKI & KANEKIYO, 2016). A proporção das dimensões da BHE pode ser observada no esquema da Figura 8.

Figura 7 – Unidade neurovascular da barreira hematoencefálica.



Fonte: YAMAZAKI & KANEKIYO, 2016.

Figura 8 – Proporções da barreira hematoencefálica.

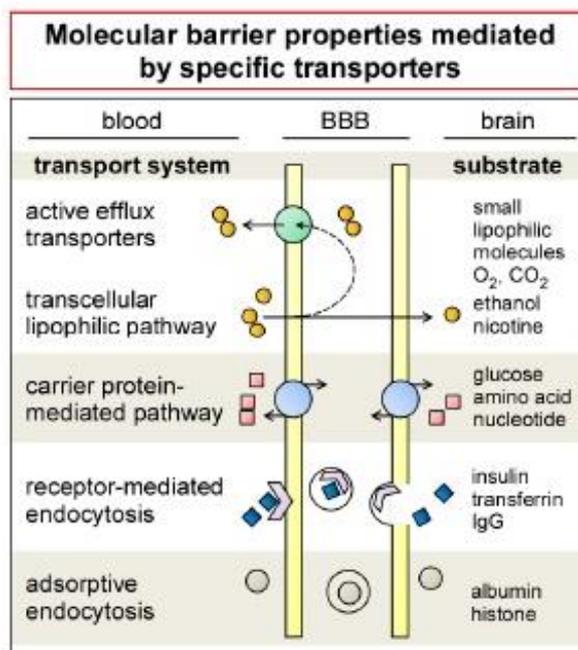


Fonte: BANKS, 2016.

A BHE é responsável por manter a homeostase do cérebro, regulando o ambiente químico, o transporte de células imunes e a entrada de xenobióticos. As concentrações de água, íons, aminoácidos, hormônios e neurotransmissores no sangue sofrem flutuações, principalmente após o indivíduo comer ou se exercitar. Se tais flutuações ocorressem no cérebro, isso poderia levar à uma atividade neuronal descontrolada; sendo assim, o transporte do sangue para o parênquima cerebral é

altamente regulado (WONG et al., 2013). A Figura 9 apresenta algumas propriedades relacionadas ao fluxo de moléculas na BHE.

Figura 9 – Propriedades relacionadas ao transporte molecular na barreira hematoencefálica.



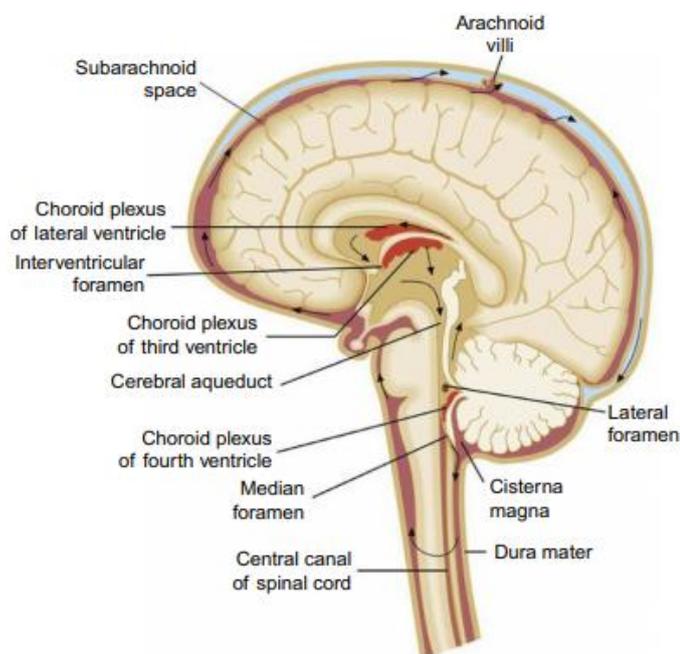
Fonte: YAMAZAKI & KANEKIYO, 2016.

As células da BHE se comunicam com outras células do SNC, adaptando seu comportamento para atender às necessidades metabólicas, respondendo às condições patológicas e, em alguns casos, participando do início, manutenção ou progressão de doenças (BICKER et al., 2016). Como a BHE desempenha um papel crítico na manutenção da homeostase do SNC, a perturbação do funcionamento adequado da barreira é cada vez mais reconhecida como fator contribuinte na patogênese de algumas doenças, nas quais a permeabilidade da barreira geralmente aumenta significativamente (BERNACKI et al., 2008; YAMAZAKI & KANEKIYO, 2016).

O LCR protege o SNC de diferentes maneiras, estando envolvido na homeostase metabólica, suprimento de nutrientes, funcionando como sistema linfático e atuando na regulação da pressão intracraniana. É produzido pelos plexos coroidais, epitélio ventricular e espaço subaracnoide e flui dos ventrículos através dos forames laterais e mediais, adentrando no espaço subaracnoide, recobrando tanto o córtex quanto a medula espinhal, como mostra a Figura 10 (TUMANI, HUSS & BACHHUBER, 2018).

Os constituintes do LCR são principalmente derivados do sangue (80%), enquanto o restante recebe contribuições substanciais do cérebro. Pelo fato de que 20% de seu conteúdo proteico é derivado do cérebro, espera-se que biomarcadores relevantes possam ser identificados nesse fluido, principalmente no caso de danos à BHE (TUMANI, HUSS & BACHHUBER, 2018).

Figura 10 - Locais de produção, circulação e eliminação do líquido cefalorraquidiano no cérebro.



Fonte: TUMANI, HUSS & BACHHUBER, 2018.

2.3 NEUROTOXICIDADE DO GLIFOSATO

Em relação aos efeitos tóxicos no SNC, estudos mostram que o glifosato exerce um efeito inibitório na acetilcolinesterase em cérebro de ratos expostos *in vivo* (CATTANI et al., 2017; GALLEGOS et al., 2018) e *in vitro* (LARSEN et al., 2012), bem como em peixes (SAMANTA et al., 2014), além de danos ao sistema dopaminérgico (BALI et al., 2019; HERNÁNDEZ-PLATA et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2018). Em casos de envenenamento por exposição ocupacional aos herbicidas à base de glifosato, são relatados casos de desenvolvimento de síndrome parkinsoniana, composta por tremores leves, instabilidade postural e rigidez (BARBOSA et al., 2001; WANG et al., 2011). A fisiopatologia da doença de Parkinson é caracterizada por

disfunções monoaminérgicas múltiplas, incluindo déficits do sistema colinérgico e dopaminérgico (TEIVE, 2015). Além disso, outros estudos apontam que a neurotoxicidade do glifosato não é inteiramente devida a perturbações desses sistemas.

Cattani et al. (2014) demonstraram que o glifosato aumenta os níveis de glutamato extracelular, podendo levar à excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo no hipocampo de ratos expostos ao glifosato desde a gestação. Nesse caso, o mecanismo por trás desses efeitos envolve o influxo de cálcio pela ativação de receptores de glutamato NMDA e canais de cálcio dependentes de voltagem, além da alteração do potencial de membrana mitocondrial (CATTANI et al., 2014). Em estudo posterior, demonstrou-se que esses eventos neuroquímicos podem contribuir, pelo menos em parte, para o comportamento depressivo observado na prole adulta (CATTANI et al., 2017). Bali, Ba-Mhamed e Bennis (2017) mostraram que camundongos que sofreram exposição subcrônica ao glifosato desde a infância até o início da idade adulta apresentaram distúrbios nos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico, levando a um aumento da ansiedade e comportamento depressivo. Através de estudos comportamentais em ratos, Baier et al. (2017) revelaram que a exposição contínua ao glifosato em ratos afeta o SNC, provavelmente alterando vias de neurotransmissão que participam ou regulam a atividade locomotora, ansiedade e memória.

A avaliação de marcadores de estresse oxidativo pode ser útil na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos, uma vez que esse tipo de insulto é conhecido por estar envolvido no desenvolvimento de muitos danos à saúde decorrentes da exposição a agrotóxicos organofosforados (MOSTAFALOU & ABDOLLAHI, 2018). O estresse oxidativo é uma situação em que há perda do equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade dos sistemas biológicos de superar essas perturbações para recuperar seu estado original (KARAMI-MOHAJERI & ABDOLLAHI, 2013). Os efeitos do estresse oxidativo em níveis relativamente altos foram demonstrados na função cerebral. Os cérebros de ratos tratados com glifosato apresentaram aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, peroxidação lipídica, diminuição dos níveis de alfa-tocoferol e glutatona reduzida e desencadeamento de morte celular por apoptose (ASTIZ, DE ALANIZ & MARRA, 2009; ASTIZ, DE ALANIZ & MARRA, 2012).

Os herbicidas são geralmente produzidos em formulações como misturas de um princípio ativo com adjuvantes. A toxicologia dessas misturas não pode ser totalmente compreendida sem conhecer a toxicidade individual dos vários compostos das formulações e seus efeitos combinados. Tendo isso em consideração, deve-se ressaltar que a maioria dos estudos toxicológicos investiga os efeitos dos herbicidas testando apenas o princípio ativo (MESNAGE et al., 2013).

Mésnage et al. (2013) analisaram a citotoxicidade do princípio ativo individualmente e combinada com os adjuvantes dos principais herbicidas à base de glifosato e mecanismos de ação. Foi demonstrado que todas as formulações são mais tóxicas que o glifosato sozinho, por meio de mecanismos que levaram à perda de integridade das membranas celulares, danos à respiração celular e indução da necrose nas células (MÉSNAJE et al., 2013). Jacques et al. (2019) também realizou um estudo de toxicidade comparativa utilizando o *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental. Demonstrou-se que os adjuvantes aumentam o perfil tóxico do herbicida, causando diminuição da capacidade reprodutiva do nematóide. Tais evidências apontam para a importância de estudar as formulações completas dos herbicidas, a fim de se investigar as consequências patológicas reais da exposição, principalmente em se tratando da neurotoxicologia do glifosato, na qual predominam os estudos que não levam em consideração o efeito da formulação completa.

2.4 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE GLIFOSATO E AMPA POR CLAE-FL

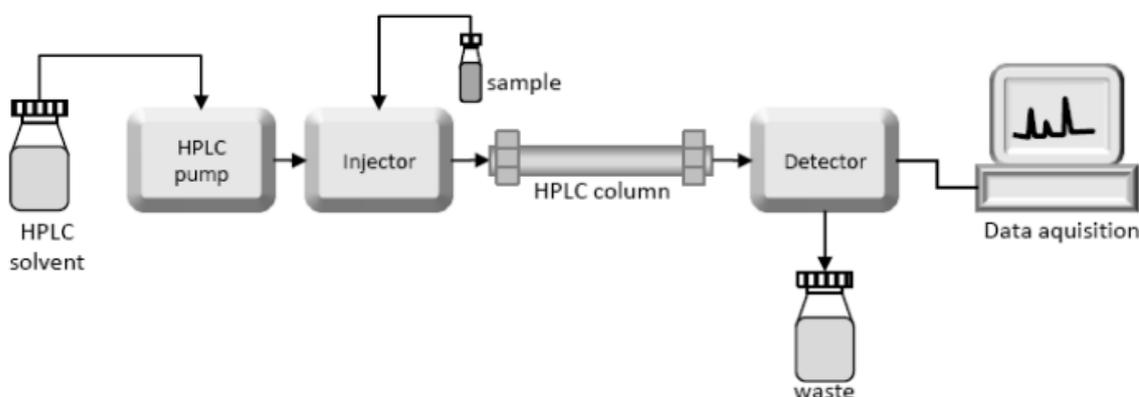
2.4.1 Considerações gerais sobre CLAE-FL

A CLAE-FL é uma técnica que permite separar constituintes químicos (ou analitos) de uma amostra, através de mecanismos de interação entre as espécies químicas e os da fase móvel (um líquido que flui) e fase estacionária (sorventes empacotados dentro de uma coluna) (GILBERT, 2013). A CLAE-FL permite uma quantificação exata, seletiva e precisa dos analitos, sendo amplamente utilizada para a análise quantitativa de biomoléculas e seus metabólitos em fluidos biológicos (AHUJA & DONG, 2005).

Um sistema cromatográfico é composto por uma bomba, um injetor de amostra, uma coluna de separação, um detector e um sistema de registro e tratamento de dados (Figura 11). A bomba controla o fluxo de fase móvel através do sistema. Ao sair

da bomba, a fase móvel entra no injetor, o qual permite injetar uma quantidade específica da amostra diretamente na coluna. A coluna cromatográfica (fase estacionária) é o componente mais crítico do sistema, tendo em vista que separa os componentes através da retenção destes na coluna e posterior eluição com a fase móvel. Um detector monitora a concentração de cada componente separado pela coluna através do sinal gerado pela molécula e gera um cromatograma, que permite a identificação de cada constituinte pela sua área e tempo de retenção. Esse fenômeno depende do tipo e da força de interação que as moléculas estabelecem entre a fase estacionária e a fase móvel (AHUJA & DONG, 2005). Dependendo das características químicas da molécula, o detector escolhido será diferente. Os mais utilizados em cromatografia de fase líquida são os detectores de ultravioleta/visível, índice de refração, espectrometria de massas e fluorescência (GILBERT, 2013).

Figura 11 – Diagrama esquemático de um sistema cromatográfico CLAE.



Fonte: CZAPLICKI, 2013.

2.4.2 Condições cromatográficas

Os materiais de empacotamento de coluna mais frequentemente utilizados são os de fase reversa, os quais apresentam caráter apolar e consistem em partículas de sílica gel cuja superfície é modificada por uma camada lipofílica de grupos alquil ligados aos grupos Si-OH. Em geral, materiais com vários grupos alquil de 1 a 18 carbonos (C18) estão disponíveis, sendo os materiais C18 os mais utilizados (GILBERT, 2013).

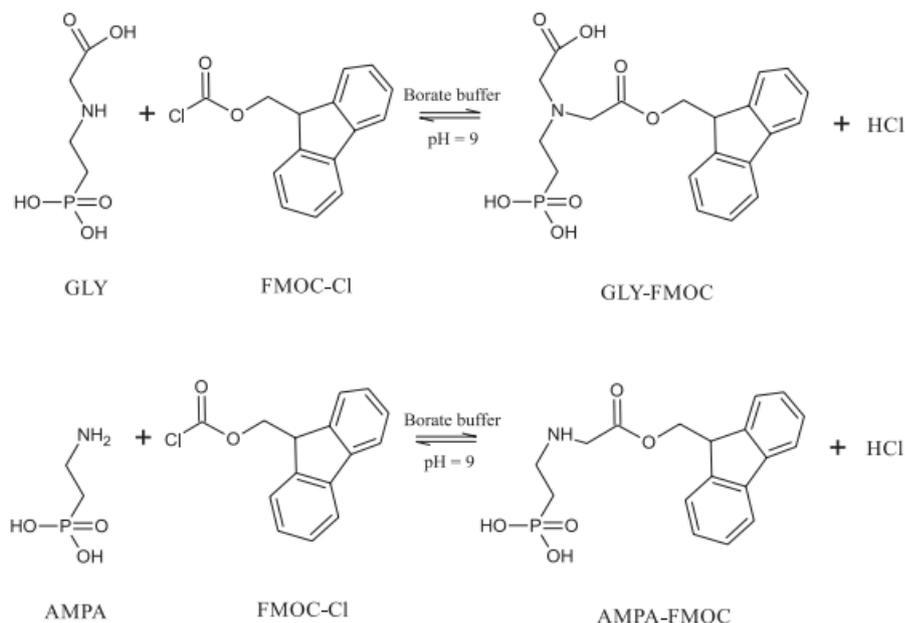
As colunas de fase reversa apresentam sítios de adsorção homogêneos, eluição em gradiente facilitada e também permitem a separação de substâncias

hidrossolúveis e/ou iônicas, inclusive substâncias lipofílicas. A retenção de um analito é ajustada com a composição da fase móvel. Um alto teor de solvente orgânico na fase móvel reduz a retenção, enquanto um alto teor de água aumenta a retenção (NEUE, 2007).

O uso de técnicas de detecção fluorimétricas, quando comparadas aos métodos colorimétricos baseados na absorbância, são mais sensíveis e seletivas. O melhor desempenho da fluorescência se dá pelo baixo predomínio de espécies fluorescentes em relação às cromóforas (GILBERT, 2013). Um detector de fluorescência monitora a luz fluorescente emitida pelo analito no sistema. Sua aplicação é limitada, já que poucas espécies químicas possuem forte fluorescência intrínseca (AHUJA & DONG, 2005). As moléculas de glifosato e AMPA (Figura 1 e Figura 4) não apresentam grupos fluoróforos, como por exemplo, estruturas ricas em elétrons π como as moléculas aromáticas. Sendo assim, é necessária a introdução de grupamentos fluoróforos através de uma reação de derivatização.

Um dos métodos de derivatização mais comumente utilizados é o de reação com o agente derivatizante cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl). Nesse processo, a substituição de um átomo de hidrogênio no grupamento amino primário ou secundário ocorre nas moléculas de glifosato e AMPA por anéis aromáticos contendo ligações duplas alternadas (CATRINCK et al., 2014). A reação pode ser observada na Figura 12. Dessa forma, as duas moléculas podem ser identificadas por um detector de fluorescência.

Figura 12 – Reação de derivatização do glifosato e AMPA utilizando FMOC-Cl.



Fonte: CATRINCK et al., 2014.

A alta sensibilidade da cromatografia líquida permitiu o avanço na análise de substâncias em baixa concentração em matrizes biológicas, com aplicações no *doping*, na toxicologia, entre outras (PRAGST, 2008). As matrizes biológicas são misturas complexas que precisam passar por uma preparação antes de sua injeção no sistema cromatográfico. As técnicas utilizadas para preparação da amostra biológica dependem do sistema de detecção utilizado. No caso da fluorescência, o método de isolamento dos analitos dependerá se outros compostos endógenos da matriz absorvem e emitem no comprimento de onda similar e no tempo de retenção do composto de interesse (BICKER et al, 2013).

Em geral, a precipitação de proteínas é uma das principais técnicas empregadas durante a preparação de amostras. Este procedimento normalmente precede outras etapas, mas também pode ser executado individualmente, consistindo na desnaturação das proteínas presentes na amostra biológica utilizando um agente precipitante. Os agentes precipitantes normalmente utilizados são o ácido tricloroacético, o metanol e a acetonitrila; o agente mais utilizado é o metanol, pelo fato de ser um agente precipitante menos energético e, desta forma, não degradando a amostra tão facilmente (BICKER et al, 2013).

2.4.3 Determinação de glifosato e AMPA em amostras biológicas

Até o momento, a maioria dos métodos que utiliza CLAE-FL é voltada para quantificação de resíduos de glifosato e AMPA em solo (BÁEZ et al., 2014; DRUART et al., 2011), cereais (HOGENDOORN et al., 1999) e água (LE BOT et al., 2002; HANKE, SINGER & HOLLENDER, 2008; IBÁÑEZ et al., 2005; SANCHO et al., 1996; WANG et al., 1999). Determinações em fluidos biológicos foram desenvolvidas por Motojyuku et. al (2008) utilizando cromatografia gasosa e também por Bernál et al. (2010) com CLAE acoplada a espectrometria de massas com ionização por eletrospray.

Anadón et al. (2009) caracterizaram a toxicocinética do glifosato em ratos após administração de doses únicas de 100 mg/kg por via intravenosa e 400 mg/kg por via oral, utilizando o método cromatográfico desenvolvido por Bernál et al. (2010). A biodisponibilidade oral do glifosato encontrada foi 23,21 %. O glifosato foi convertido em AMPA, representando 6,49 % das concentrações plasmáticas (ANADÓN et al., 2009).

Em humanos, o glifosato foi detectado no tecido cerebral e no LCR após exposição às formulações comerciais por envenenamento, revelando o potencial de atravessar a BHE, a qual protege o SNC de substâncias neurotóxicas que circulam no sangue (SATO et al., 2011). Estudos demonstram a capacidade neurotóxica do glifosato, entretanto a toxicocinética deste herbicida no LCR ainda não está determinada, especialmente em se tratando da administração da formulação comercial, questão fundamental para compreender como eventos neurotóxicos podem ser desencadeados, qual a dose mais crítica e o tempo necessário para que ocorram. Para tanto, é primordial o desenvolvimento de um método bioanalítico adequado para a detecção e quantificação de glifosato e AMPA no LCR após exposição oral.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ratos *Wistar* machos (90 dias) foram obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais foram mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 h, alocados em salas climatizadas ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) com suprimento *ad libitum* de água potável e ração padrão para roedores. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental. O projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS sob número 37876.

3.2 TRATAMENTO

Os animais foram tratados via oral por gavagem com herbicida à base de glifosato (48 % p/v glifosato; Glifomato, Insetimax, Brasil) na sua forma líquida, diluído em água destilada a fim de se obter uma dose única de 400 mg/kg de glifosato. A dose de glifosato é baseada no limite de quantificação do método bioanalítico para a detecção de glifosato em plasma (ANADÓN et al., 2009) e está abaixo da DL_{50} para ratos (4230 mg/kg), parâmetro correspondente à dose capaz de matar 50% dos indivíduos em uma população-teste (BRUNTON et al., 2007). Foram determinadas as concentrações de aminoácidos e albumina por CLAE-FL, nos tempos 0, 3, 24 e 48 h ($n = 3-5$ para cada tempo) após a administração oral. Amostras de LCR foram coletadas sob anestesia (isoflurano - indução: 2,5-4 %; manutenção: 1,5-2,5 %) via punção direta da cisterna magna com uso de seringa de insulina (27 G) e aparato estereotáxico. As amostras foram imediatamente centrifugadas após a coleta (3000 rpm, 1 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) em centrífuga para microtubos (CF15RXII Hitachi, Tóquio, Japão) e armazenadas à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO

Os animais foram divididos em dois grupos: controle (n = 4) e tratado com herbicida à base de glifosato por 3 h (n = 4), conforme descrito no item 3.2. Após eutanásia, os cérebros foram imediatamente removidos e umidificados com solução salina balanceada de Hanks (HBSS, do inglês *Hank's balanced salt solution*) contendo (em mM): 137 NaCl, 5,36 KCl, 1,26 CaCl₂, 0,41 MgSO₄, 0,49 MgCl₂, 0,63 Na₂HPO₄, 0,44 KH₂PO₄, 4,17 NaHCO₃ e 5,6 glicose, com pH ajustado para 7,4. As regiões do córtex parietal, hipocampo e estriado foram dissecadas e fatias de 300 µm de espessura foram obtidas com o uso de um fatiador de tecidos (McIlwain Tissue Chopper, Brinkman, EUA). Quatro fatias de cada estrutura foram separadas e transferidas para uma placa de 24 poços com 300 µL de HBSS por poço, mantida à 37 °C por 60 min. Decorrido esse tempo, o HBSS foi coletado e armazenado à -18 °C para análises posteriores. O ensaio de captação iniciou com a adição de 0,33 µCi/mL de L-[2,3-³H]glutamato e encerrou-se após 7 min com a remoção do meio de incubação e três lavagens sucessivas com HBSS gelado, seguida da adição de 0,5 M de NaOH. A radioatividade incorporada foi medida utilizando um contador de cintilação líquida (300SL, Hidex, Finlândia) e os dados foram expressos em Contagens Por Minuto no período de tempo analisado (7 min de captação) (CPM/min). A captação de glutamato independente de sódio foi determinada utilizando HBSS preparado com N-metil-D-glucamina ao invés de cloreto de sódio. A captação específica de glutamato foi obtida subtraindo o valor da captação independente de sódio do valor da captação total.

3.4 WESTERN BLOT

Amostras de córtex, hipocampo e estriado foram homogeneizadas em solução de lise (2 % SDS, 5 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,4) contendo inibidor de protease (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE (20 µg de proteína por amostra) e transferidas para membranas de nitrocelulose, incubadas *overnight* (4 °C) com os anticorpos anti-GFAP (1:1000) e anti-β-tubulina (1:1000). A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho (IgG) conjugado com peroxidase (1:5000) por 2 h à temperatura ambiente. A quimioluminescência foi detectada em sistema Image Quant LAS4010 (GE

Healthcare, Chicago, EUA) utilizando kit ECL (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA). A quantidade de proteína foi analisada por densitometria através do *software* Image J. A β -tubulina foi utilizada como controle endógeno de proteína.

3.5 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

3.5.1 *Aminoácidos*

A quantificação de aminoácidos por CLAE-FL foi realizada nas amostras de LCR dos animais tratados e no HBSS de estabilização das fatias (coletado após os 60 min prévios ao ensaio de captação de glutamato), conforme Schmidt et al. (2009). Inicialmente, as amostras foram filtradas (poro 0,22 μm), derivatizadas com ortoftaldeído e separadas em coluna de fase reversa (Supelcosil LC-18, 250 mm x 4,6 mm x 5 μm , Supelco) em sistema cromatográfico Shimadzu Class-VP (Quioto, Japão). A fase móvel foi mantida em um fluxo constante de 1,4 mL/min e a temperatura da coluna à 24 °C. A fase móvel foi composta por tampão fosfato de sódio 0,04 mol/L, pH 5,5, contendo 20 % de metanol (fase móvel A) e tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L, pH 5,5, contendo 80 % de metanol (fase móvel B). O gradiente de concentração foi modificado para o seguinte teor de B na fase móvel: 0 % (0 min), 100 % (55 min), 0 % (60 min). A detecção foi realizada utilizando os comprimentos de onda de 360 nm (excitação) e 455 nm (emissão), com detector de fluorescência Shimadzu. O tempo de retenção dos padrões analíticos dos aminoácidos valina, isoleucina, triptofano, glutamina, fenilalanina, leucina, metionina, lisina, glutamato, aspartato e ornitina foram utilizados para identificação e a quantificação realizada através de curva padrão (dados expressos em μM) através do *software* LC-Solution. Para determinação de glutamina, as amostras foram diluídas 10 vezes.

3.5.2 *Albumina*

A quantificação de albumina por CLAE-FL foi realizada no LCR dos animais, em método previamente validado conforme diretrizes internacionais (EMA, 2012; FDA, 2018). Amostras de LCR (10 μL) foram adicionadas de 40 μL de acetonitrila e separadas em coluna de fase reversa (SB-C18, 250 mm x 4,6 mm x 5 μm , ZORBAX) em sistema cromatográfico Shimadzu LC-20A (Quioto, Japão) equipado com

amostrador SIL-20A, controlador CBM-20A, bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-14A, termostato para coluna CTO-10A e detector por fluorescência RF-20A. A fase móvel utilizada foi água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). O fluxo foi mantido em 0,7 mL/min e o gradiente de concentração utilizado foi: A → 65 % B → 35 % (0–5 min), A → 70 % B → 30 % (5–10 min), A → 65 % B → 35 % (10–17 min). A detecção foi realizada utilizando os comprimentos de onda de 278 nm (excitação) e 335 nm (emissão). O tempo de retenção do padrão analítico de albumina foi utilizado para identificação e a quantificação realizada através de curva padrão através do software LC-Solution.

3.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA

3.6.1 Reagentes e padrões

Os padrões analíticos de glifosato (pureza > 98 %), AMPA (pureza > 98 %) e o agente derivatizante FMOC-Cl foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os solventes acetonitrila e metanol (ambos com grau de pureza HPLC) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Acetato de amônio, borato de amônio e hidróxido de amônio grau P.A. foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Água ultrapura (18,2 MΩ.cm) foi produzida com um sistema de água MilliQ Purelab Ultra (Veolia Elga LabWater, High Wycombe, UK). Para a filtragem das amostras foram utilizados filtros de seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de diâmetro 13 mm e poro 0,22 µm (Filtrilo, Paraná, Brasil).

Amostras de LCR foram obtidas de ratos *Wistar* controle (n = 6), coletadas conforme descrito anteriormente no item 3.2.

3.6.2 Soluções-estoque, padrões de calibração e padrões de controle de qualidade

Soluções-estoque de glifosato e AMPA foram preparadas na concentração de 1 mg/mL, utilizando água ultra-pura como diluente. Para o preparo dos pontos da curva padrão, soluções de trabalho foram preparadas a partir da diluição das soluções-estoque com água ultra-pura, a fim de se obter as concentrações finais de 10, 20, 40,

120, 200, 300 e 500 ng/mL. Todas as soluções analíticas foram armazenadas à -20 °C. A solução de agente derivatizante foi preparada a partir da diluição de FMOC-Cl em acetonitrila na concentração final de 5 mM.

Os controles de qualidade foram preparados de forma independente, em três concentrações finais diferentes a partir das soluções de trabalho: 20 ng/mL para o controle de qualidade baixo (CQB), 120 ng/mL para o controle de qualidade médio (CQM) e 500 ng/mL para o controle de qualidade alta (CQA).

3.6.3 Preparação das amostras

A preparação iniciou-se com a adição de 15 µL de LCR de animal controle, 15 µL da solução de trabalho de glifosato e 15 µL da solução de trabalho de AMPA. Após agitação no vortex durante 10 s, foi adicionado 70 µL de metanol gelado (4 °C) e agitou-se novamente por 10 s. A mistura foi centrifugada a 10.000 g por 10 min à 4 °C. O sobrenadante resultante foi recolhido e filtrado, adicionado de 20 µL de tampão borato de sódio (pH 9) e 15 µL da solução de derivatizante, seguido por agitação em vortex por 10 s. A mistura foi mantida em Eppendorf durante 30 min à 25 °C, de forma a prosseguir a reação de derivatização. Em seguida, foi transferida para vials cônicos e 10 µL da amostra foi injetada no sistema cromatográfico.

3.6.4 Condições cromatográficas

O desenvolvimento do método foi realizado em um sistema cromatográfico Shimadzu LC-20A (Quioto, Japão) equipado com bomba LC-20AT, degaseificador DGU-14A, termostato para coluna CTO-10A, amostrador SIL-20A, controlador CBM-20A e detector por fluorescência RF-20A. Para o controle das condições cromatográficas e o processamento e integração dos dados utilizou-se o software LC Solution. Foi utilizada coluna de fase reversa (Luna C18(2), 250 mm x 4,6 mm x 5 µm, Phenomenex) com pré-coluna (SecurityGuard Standard C18 4 mm, Phenomenex). A fase móvel utilizada foi tampão acetato de amônio 20 mM pH 9 (A) e metanol (B). O fluxo foi mantido em 1 mL/min e o gradiente de concentração utilizado foi: A → 80 % B → 20 % (0–3 min), A → 40 % B → 60 % (3–15 min), A → 50 % B → 50 % (15–23 min), A → 30 % B → 70 % (23–30 min), A → 80 % B → 20 % (30-40 min). Os

comprimentos de onda de excitação e emissão foram estabelecidos em 270 nm e 310 nm, respectivamente.

3.6.5 Validação do método

A validação do método seguiu a *Food and Drug Administration* (FDA, 2018), *European Medicines Agency* (EMA, 2012) e ANVISA (2017) que descrevem os requisitos exigidos para validar métodos bioanalíticos. Foi elaborada uma validação parcial do método, através da avaliação dos parâmetros de linearidade e precisão.

3.6.5.1 Linearidade

A linearidade do método cromatográfico foi avaliada a partir de curvas de calibração preparadas em LCR batizado com sete padrões analíticos com concentrações finais conhecidas dos analitos (10, 20, 40, 120, 200, 300 e 500 ng/mL) em dias diferentes ($n = 3$). A determinação dos teores de glifosato e AMPA foi definida pela área dos picos cromatográficos. Os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão linear, utilizando o método dos mínimos quadrados. A linearidade foi avaliada a partir dos coeficientes de correlação (r), determinação (r^2) e gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de avaliação estatística através de ANOVA com nível de significância de 5 %. Os resíduos decorrentes dos ajustes da curva analítica foram examinados quanto à existência de valores discrepantes, se apresentam comportamento homoscedástico e se a equação de regressão é estatisticamente significativa.

3.6.5.2 Precisão

A precisão do método consiste em avaliar a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas. A precisão foi determinada a partir de 3 replicatas das soluções de CQB, CQM e CQA ($n = 1$) e expressa como coeficiente de variação (% CV), conforme a Equação 1.

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100 \quad (1)$$

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

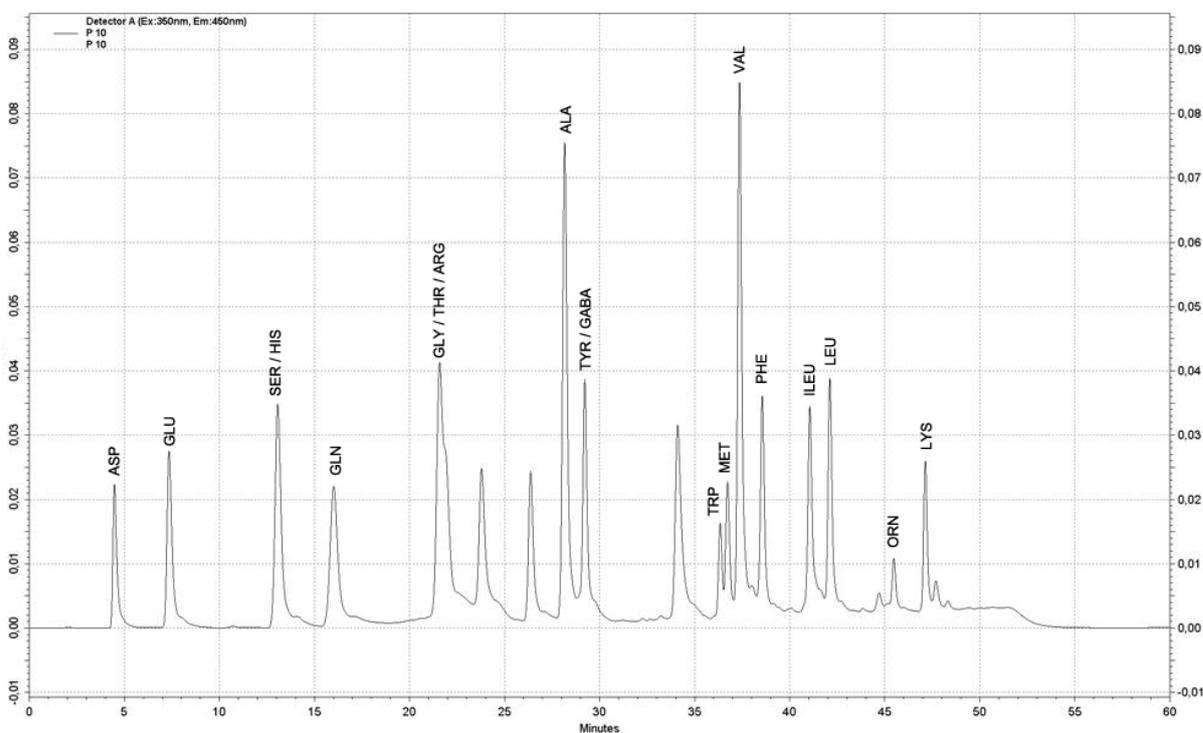
As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares GraphPad Prism 8 (Graph Pad Software, EUA) e Microsoft Office Excel 16 (Microsoft, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

O perfil bioquímico do LCR é uma fonte de informação para estudar mecanismos de neurotoxicidade, tendo em vista que este fluido é enriquecido em componentes derivados do cérebro (BYRNE & WILD, 2016). Dessa forma, caracterizou-se o perfil de aminoácidos do LCR dos animais. O cromatograma representativo da separação dos padrões analíticos dos aminoácidos obtida com o método cromatográfico utilizado está apresentado na Figura 13.

Figura 13 – Cromatograma representativo da separação dos padrões analíticos dos aminoácidos por CLAE-FL conforme método proposto por Schmidt et al. (2009).

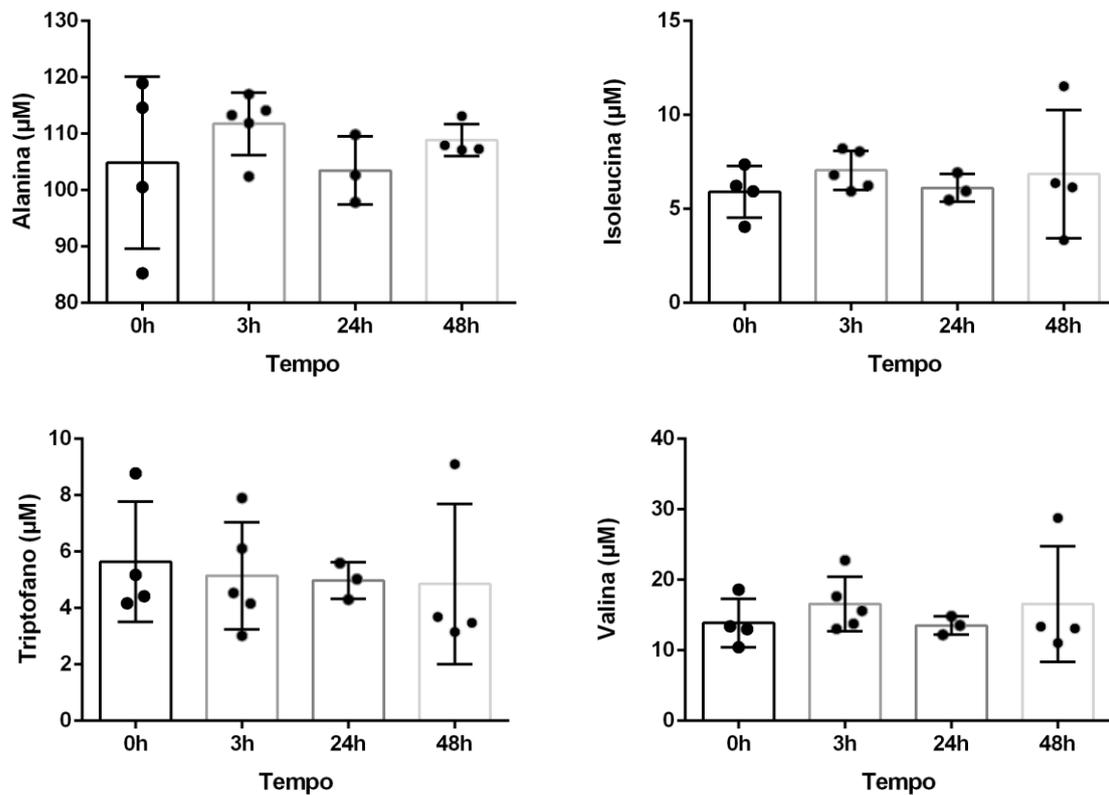


Legenda: ASP: aspartato; GLU: glutamato; SER: serina; HIS: histidina; GLN: glutamina; GLY: glicina; THR: treonina; ARG: arginina; ALA: alanina; TYR: tirosina; GABA: ácido gama aminobutírico; TRP: triptofano; MET: metionina; VAL: valina; PHE: fenilalanina; ILEU: isoleucina; LEU: leucina; ORN: ornitina; LYS: lisina.

Fonte: Autor, 2019.

As Figuras 14 e 15 mostram que os níveis dos aminoácidos valina, isoleucina, triptofano, alanina, glutamina, fenilalanina, leucina, metionina e lisina de animais expostos agudamente ao glifosato permaneceram inalterados até 48 h após a exposição.

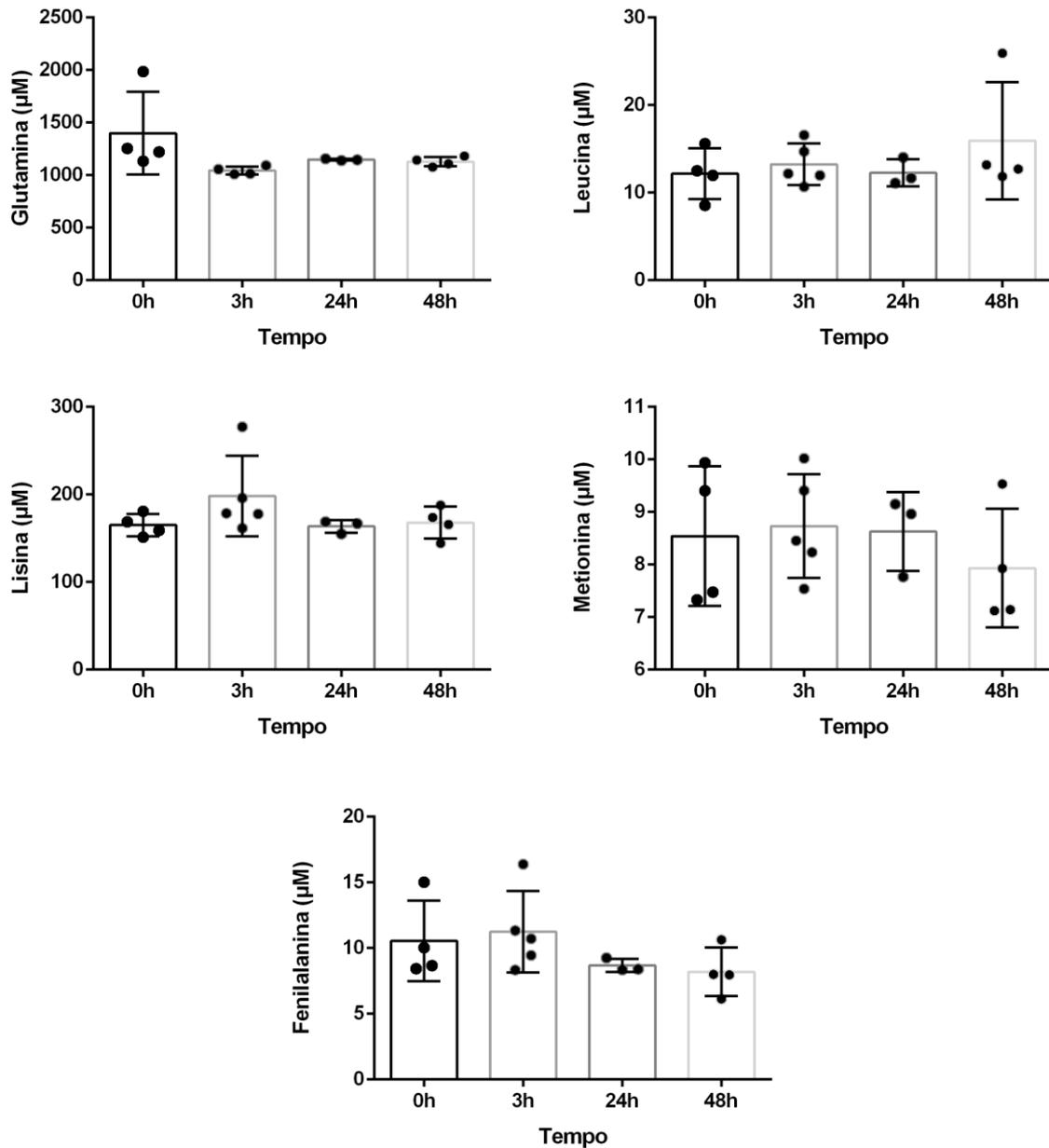
Figura 14 - Concentração dos aminoácidos alanina, isoleucina, triptofano e valina no LCR de ratos expostos agudamente ao glifosato.



Os dados representam média \pm desvio padrão. Diferenças entre os grupos ($n = 3-5$) foram analisadas estatisticamente através de ANOVA, seguido de teste de Tukey.

Fonte: Autor, 2019.

Figura 15 - Concentração dos aminoácidos glutamina, leucina, lisina, metionina e fenilalanina no LCR de ratos expostos agudamente ao glifosato.

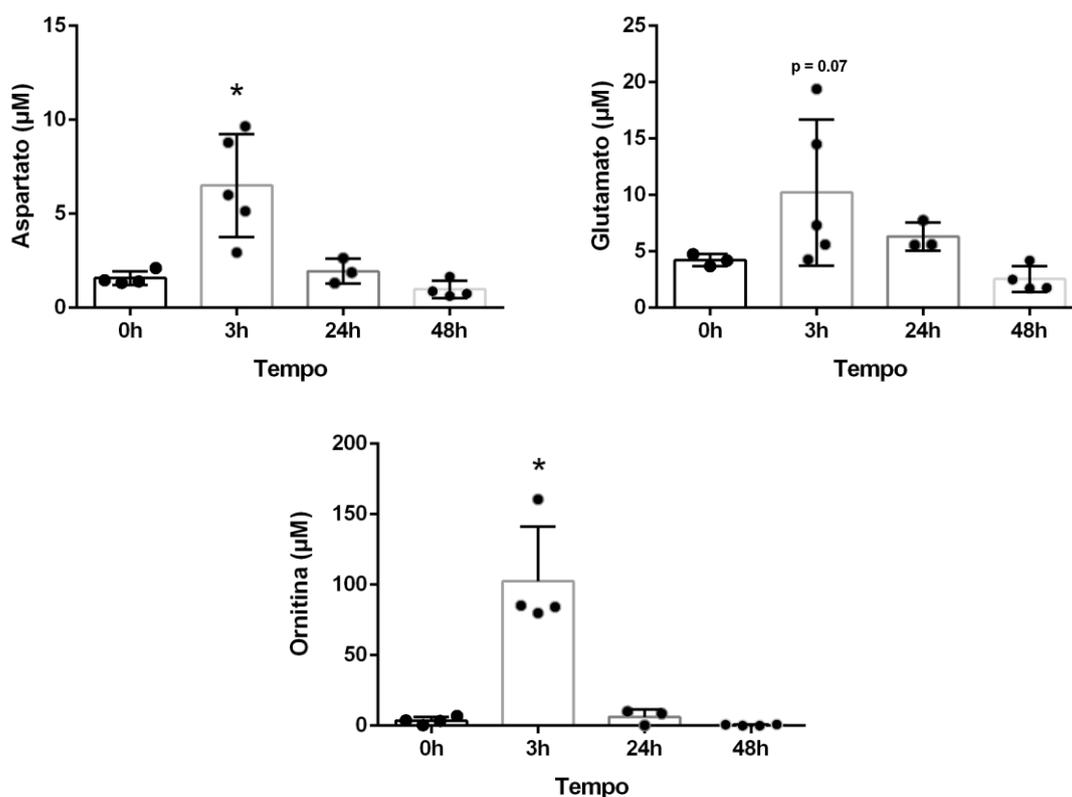


Os dados representam média \pm desvio padrão. Diferenças entre os grupos ($n = 3-5$) foram analisadas estatisticamente através de ANOVA, seguido de teste de Tukey.

Fonte: Autor, 2019.

Os teores dos aminoácidos glutamato, aspartato e ornitina apresentaram-se significativamente aumentados 3 h após a administração do herbicida, retornando aos níveis basais até 48 h após a exposição, conforme demonstrado na Figura 16.

Figura 16 - Concentração dos aminoácidos aspartato, glutamato e ornitina no LCR de ratos expostos agudamente ao glifosato.



Os dados representam média \pm desvio padrão. Diferenças entre os grupos (n = 3-5) foram analisadas estatisticamente através de ANOVA, seguido de teste de Tukey. *P < 0,05.

Fonte: Autor, 2019.

O glutamato e o aspartato, apesar de mediadores excitatórios nas sinapses cerebrais, são de importância crucial na fisiopatologia de várias doenças neurológicas associadas com morte glial e neuronal, entre elas isquemia, esclerose lateral amiotrófica, epilepsia, esclerose múltipla, entre outras (BROUNS et al., 2010; RAINESALO et al., 2004; SARCHIELLI et al., 2003; SPINK & MARTIN et al., 1991). Distúrbios da BHE e comprometimento funcional e metabólico de astrócitos e neurônios podem sustentar a elevação de glutamato e aspartato extracelular (PAJARILLO et al., 2019; STOVER et al., 1997).

A elevação desses dois aminoácidos excitatórios pode se tornar prejudicial devido à ativação excessiva das células neuronais e glias (COYLE et al., 1993). As cascatas ativadas aumentam os níveis intracelulares de cálcio, geram radicais livres, aumentam o consumo energético, podendo resultar em morte neuronal e glial (PEKNY

& NILSSON et al., 2005). Além disso, a morte celular resultará na liberação adicional de neurotransmissores excitatórios aumentando os níveis extracelulares. Assim, um círculo vicioso é gerado, levando a danos neuronais e gliais generalizados (STOVER et al., 1997).

Quando os aminoácidos estão elevados no espaço extracelular cerebral e os mecanismos de captação glial não são suficientes para eliminar substâncias potencialmente tóxicas, esses neurotransmissores seguirão o seu gradiente e haverá um aumento no LCR (ROETTGER & GOLDFINGER, 1994). Sendo assim, a função glial dos animais tratados com o glifosato pode ter sofrido prejuízos em função da exposição ao agente tóxico.

Além da alteração observada nos níveis dos aminoácidos excitatórios aspartato e glutamato no LCR, também pode-se observar uma alteração significativa da concentração de ornitina, 3 h após a administração do herbicida (Figura 16). Sabe-se que a ornitina é um aminoácido não-essencial que tem um papel central no ciclo da ureia, principalmente nos hepatócitos. É produzida pela ação enzimática da arginase, que converte arginina em ureia e gera ornitina. A ornitina também desempenha um papel crítico no funcionamento do sistema imunológico através da síntese das poliaminas putrescina, espermina e espermidina (SIVASHANMUGAM et al., 2017).

As poliaminas são metabólitos catiônicos contendo dois ou mais grupamentos amino e estão presentes ubiquamente em todas as células eucarióticas (PULESTON, VILLA & PEARCE, 2017). Por serem protonadas em pH fisiológico, podem interagir com uma variedade de alvos celulares (WILLIAMS et al., 1997). A captação celular e o fluxo de poliaminas são pouco conhecidos. A maior parte das pesquisas com poliaminas é voltada ao câncer, onde a regulação positiva da via de síntese é conhecida por impulsionar a proliferação celular (CASERO JR & MARTON, 2007). Outras funções incluem adesão celular, reparo da matriz extracelular e envolvimento em processos específicos de sinalização. As poliaminas podem se ligar rapidamente a um número de moléculas carregadas negativamente sob condições fisiológicas, incluindo ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), adenosina trifosfato (ATP), certos tipos de proteínas e fosfolipídios. Assim, desempenham um papel no crescimento celular, proliferação, diferenciação, desenvolvimento, imunidade, migração, regulação de genes, estabilidade do DNA e de proteínas (BAE et al., 2018; WILLIAMS et al., 1997).

No SNC, as poliaminas são capazes de interagir com canais iônicos e controlar o potencial de membrana e a excitabilidade de grupos específicos de células. Elas estão envolvidas na ativação, inibição e bloqueio dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (LOMBARDI et al., 1993; WILLIAMS et al., 1997). As poliaminas também são capazes de bloquear subtipos específicos de receptores de cainato e de ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico (AMPA) (SOULET & RIVERS, 2003; WILLIAMS et al., 1997).

A ativação excessiva dos receptores de aminoácidos excitatórios (NMDA, cainato, AMPA) pelas poliaminas pode levar a diversos danos celulares através do fenômeno de excitotoxicidade. A excitotoxicidade glutamatérgica está envolvida em danos ao SNC e em doenças neurodegenerativas (LIPTON & ROSENBERG, 1994). Além disso, o influxo prolongado de cálcio pode levar a uma despolarização das mitocôndrias, seguida pela dissociação do transporte de elétrons com a produção de ATP. Então, a liberação de radicais livres inicia os danos excitotóxicos, que quando acumulados por longos períodos podem contribuir para episódios desmielinizantes e morte neuronal (COYLE et al., 1993).

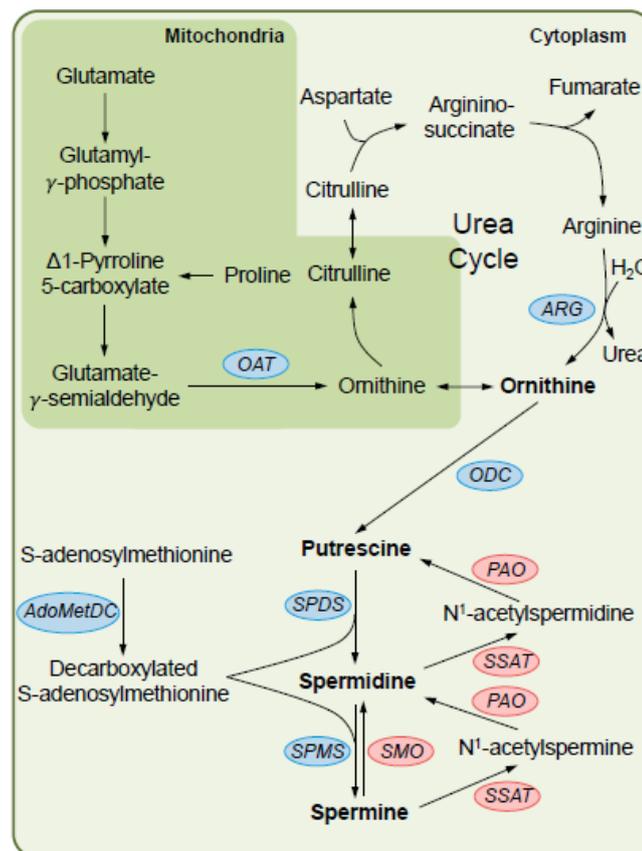
Esse processo pode estar na origem de várias doenças neurodegenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica (ELA) e doença de Alzheimer (SOULET & RIVERS, 2003). Em estudo de Inoue et al. (2013), detectou-se super-expressão da enzima ornitina descarboxilase (ODC) e das moléculas de espermidina e espermina no tecido cerebral afetado pela doença de Alzheimer, através de análise metabólica *post-mortem* em cérebros de pacientes (INOUE et al., 2013).

Foi demonstrado que a administração de uma grande dose de agonistas de receptores glutamatérgicos resulta em aumento simultâneo da atividade da enzima ODC e do conteúdo de poliaminas no cérebro, bem como da morte neuronal (LOMBARDI et al., 1993); a ativação de ODC induzida por toxinas foi anulada pelo tratamento com MK-801, um bloqueador de receptor NMDA (REED & BELLEROCHE, 2000). Em outro estudo, o dano neuronal e o aumento da concentração de poliaminas (principalmente putrescina) induzida por isquemia foi precedida pela ativação da ODC (KOENIG et al., 1990).

Esses resultados sugerem que a elevação das concentrações extracelulares de glutamato pode estimular os receptores a aumentar a atividade da ODC,

requerendo maiores níveis de ornitina no cérebro, o que pode culminar na regulação positiva das enzimas ornitina acetiltransferase (OAT) ou arginase (ARG), que geram ornitina. Na Figura 17, são demonstradas as reações que contribuem para a homeostase das poliaminas.

Figura 17 – Via de síntese das poliaminas.

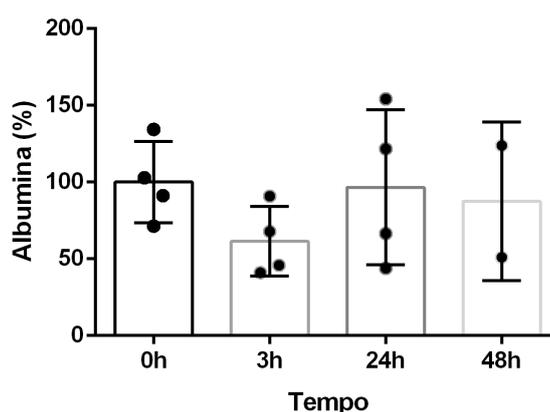


Fonte: PULESTON et al., 2017.

É possível que níveis excitotóxicos de glutamato possam contribuir para o aumento da concentração de poliaminas cerebrais observadas sob certas condições patológicas. O aumento resultante na produção de poliaminas pode então promover a ação excitotóxica do glutamato nos receptores e fechar um círculo vicioso que pode resultar em danos neuronais.

Em relação aos níveis de albumina no LCR, não houve diferença significativa nas diferentes concentrações até 48 h após a exposição ao herbicida, como mostra a Figura 18.

Figura 18 - Concentração de albumina no LCR de ratos expostos agudamente ao glifosato.



Os dados representam média \pm desvio padrão. Para a quantificação de albumina, considerou-se o valor do controle como 100%. Diferenças entre os grupos (n = 2-4) foram analisadas estatisticamente através de ANOVA, seguido de teste de Tukey.

Fonte: Autor, 2019.

A quantificação de albumina no LCR serve como um índice de integridade da BHE; o aumento dos níveis dessa proteína no LCR pode indicar maior permeabilidade da barreira (WONG et al., 2013, HLADKY & BARRAND, 2016). A disfunção da BHE é uma consequência observada em muitas doenças, incluindo diabetes, epilepsia, doenças de Parkinson e de Alzheimer, acidente vascular cerebral, entre outras; sendo também verificada em modelos animais de dor crônica e inflamação intensa (ABOTT et al., 2010; BANKS et al., 2016; YAMAZAKI & KANEKIYO, 2016). A permeabilização da barreira às proteínas plasmáticas é prejudicial ao tecido nervoso, causando ativação celular que pode levar à apoptose, além de outras consequências (ABOTT et al., 2010).

A BHE previne a entrada de moléculas de alto peso molecular no SNC; em geral, moléculas que ultrapassam a barreira por difusão passiva têm peso molecular menor que 500 Da (WONG et al., 2013). A molécula de albumina tem peso molecular de 67 kDa (KENANOVA et al., 2010). Uma vez que a síntese de albumina não ocorre

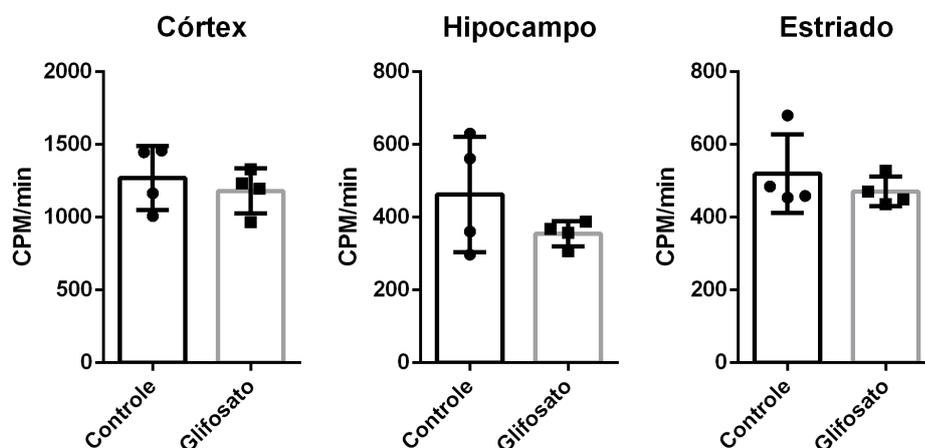
no SNC maduro (GANROT & LAURELL, 1974), toda albumina encontrada no LCR é derivada do soro sanguíneo. Ademais, o conteúdo proteico do LCR é muito menor que o do soro, além de apresentarem composições proteicas individuais diferentes (ABOTT et al., 2016). No caso da albumina, por exemplo, o conteúdo liquórico é cerca de 200 vezes menor que o conteúdo sérico (REIBER, 1994).

O resultado dos níveis de albumina no LCR (Figura 18) mostra que provavelmente não houve dano à BHE resultante do tratamento realizado. Sendo assim, pode-se inferir que a alteração nos níveis dos aminoácidos observada decorre do próprio metabolismo cerebral, e não do transporte a partir do soro. Sabe-se que a BHE restringe o influxo de alguns aminoácidos, incluindo os neurotransmissores glutamato e glicina, mas permite o influxo rápido e passivo de muitos outros, como os aminoácidos essenciais (HLADKY & BARRAND, 2016). Como os sistemas nervosos central e periférico utilizam muitos dos mesmos neurotransmissores, a BHE ajuda a manter separados os diferentes *pools* de neurotransmissores (BERNACKI et al., 2008).

4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO NO CÓRTEX, HIPOCAMPO E ESTRIADO

As fatias de tecido cerebral são um modelo que permite a investigação de mecanismos de maneira controlada em um sistema íntegro em que as conexões celulares estão preservadas (HUMPEL, 2015). Considerando os achados prévios que demonstraram aumento dos níveis de glutamato e aspartato no LCR 3 h após os animais terem sido tratados com herbicida à base de glifosato, os níveis de captação de glutamato foram testados em três diferentes regiões do tecido cerebral. Entretanto, após 3 h da exposição ao herbicida à base de glifosato, não há alteração na captação de glutamato em fatias de córtex, hipocampo e estriado, conforme demonstrado na Figura 19.

Figura 19 – Efeitos da exposição aguda de ratos ao glifosato na captação de glutamato no córtex, hipocampo e estriado.



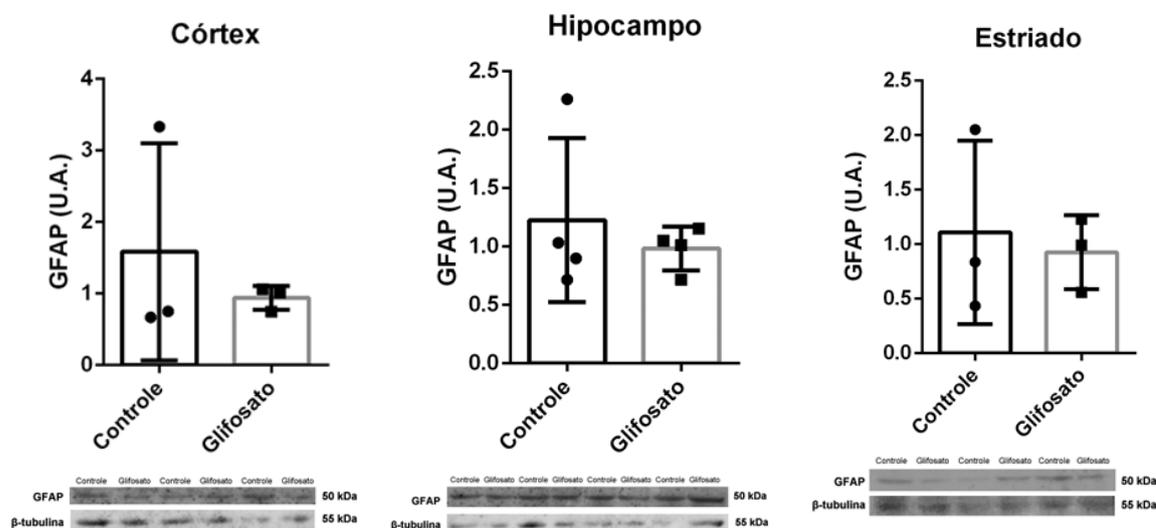
Os dados representam média \pm desvio padrão. Diferenças entre os grupos ($n = 4$) foram analisadas estatisticamente através de teste T.

Fonte: Autor, 2019.

Os resultados dos níveis de glutamato no LCR sugerem que a exposição ao glifosato pode levar a uma redução de função astrocitária em locais específicos do cérebro, o que pode ter ocorrido em locais diferentes dos aqui testados (por exemplo, outras regiões corticais), fato associado a uma possível maior liberação de glutamato por neurônios nos momentos mais iniciais após a exposição. Adicionalmente, sendo a função fisiológica astrocitária de grande importância para o funcionamento cerebral, hipotetiza-se que após 3 a 4 h ela já tenha retornado aos valores normais, sendo necessária a verificação da captação logo após a exposição ao herbicida (por exemplo, entre 1 e 2 h pós exposição) para a melhor compreensão dos níveis líquidos.

Para investigar se houve o estabelecimento de um quadro de reatividade astrocitária decorrente da exposição ao glifosato em 3 h, avaliou-se o imunoconteúdo de GFAP das regiões do córtex, hipocampo e estriado, como mostra a Figura 20.

Figura 20 – Imunoconteúdo de GFAP nas regiões do córtex, hipocampo e estriado de ratos expostos agudamente ao glifosato.



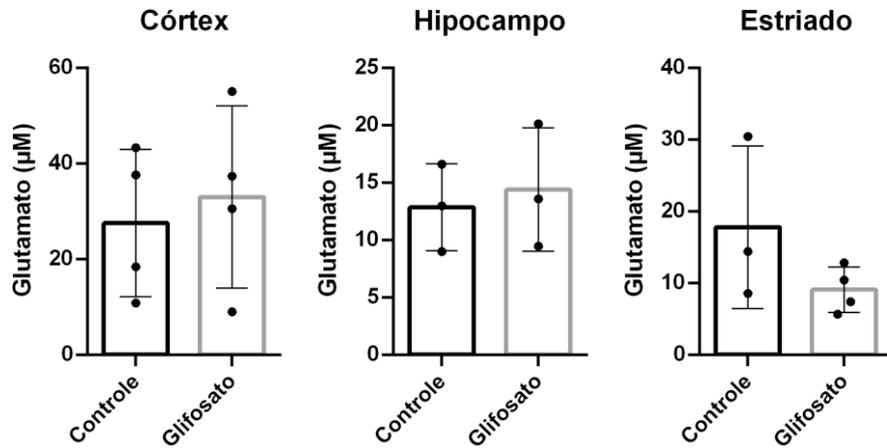
Os dados representam média \pm desvio padrão. Imagens abaixo dos gráficos representam as bandas das proteínas obtidas através da técnica de Western Blot. Diferenças entre os grupos ($n = 3-4$) foram analisadas estatisticamente através de teste T. (U.A.: Unidades arbitrárias).

Fonte: Autor, 2019.

A GFAP desempenha um papel crítico na função astrocitária, sendo regulada positivamente em situação de danos ao SNC (BRENNER, 2014). Decorridas 3 h da exposição ao herbicida à base de glifosato, o imunoconteúdo de GFAP não foi alterado nas regiões analisadas, fato que pode estar relacionado ao curto período de tempo transcorrido a partir da administração, visto que os complexos processos de transcrição e tradução proteica podem levar horas para culminar em aumento mensurável na quantidade de proteína pela técnica de Western Blot.

Com o objetivo de investigar a liberação de aminoácidos pelas fatias, o líquido da incubação prévia à captação de glutamato foi analisado. As Figuras 21 e 22 apresentam os resultados para os aminoácidos glutamato e aspartato.

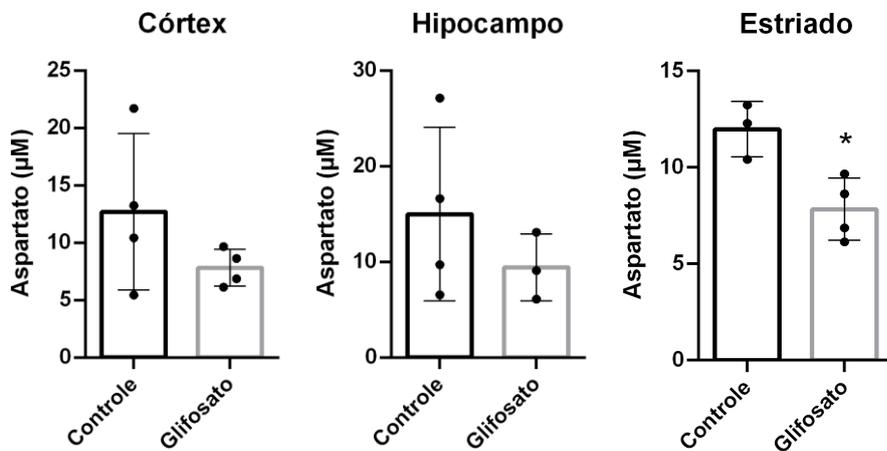
Figura 21 – Liberação do aminoácido glutamato pelo córtex, hipocampo e estriado de ratos expostos agudamente ao glifosato.



Os dados representam média \pm desvio padrão. Diferenças entre os grupos ($n = 3-4$) foram analisadas estatisticamente através de teste T.

Fonte: Autor, 2019.

Figura 22 – Liberação do aminoácido aspartato pelo córtex, hipocampo e estriado de ratos expostos agudamente ao glifosato.



Os dados representam média \pm desvio padrão. Diferenças entre os grupos ($n = 3-4$) foram analisadas estatisticamente através de teste T. * $P < 0,05$.

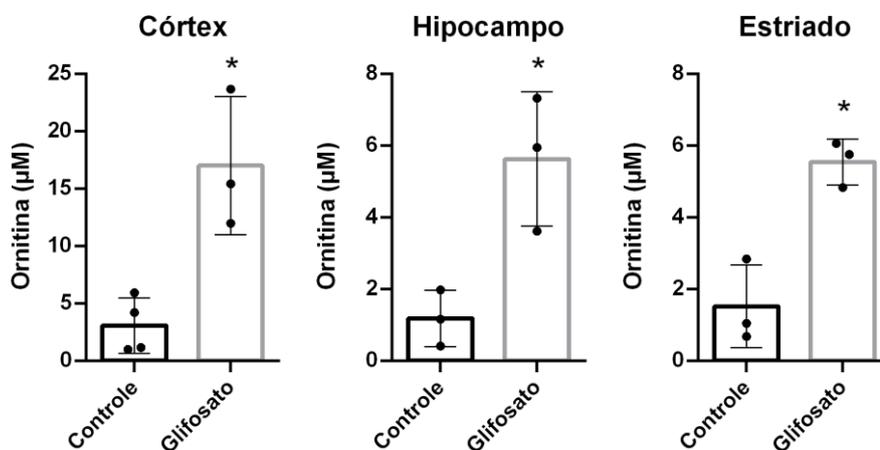
Fonte: Autor, 2019.

Pode-se observar que não houve aumento na liberação de glutamato e aspartato nas fatias das regiões analisadas, exceto por uma diminuição significativa da liberação de aspartato no estriado dos animais tratados com glifosato. Cabe ressaltar que essa análise foi realizada no tecido que já havia liberado grandes quantidades desses

aminoácidos no LCR e a menor liberação observada no estriado pode refletir o esgotamento de aspartato nessa região específica cerca de 4 h após a administração do herbicida. Flutuações fisiológicas nas concentrações de aminoácidos nas diferentes regiões cerebrais podem ser contornadas pela síntese endógena ou pelo maior influxo a partir da BHE, entretanto aqui observamos alterações importantes na concentração dos aminoácidos cerebrais, o que pode, ao longo da exposição crônica ao glifosato, levar a danos neuronais e gliais pela superativação de receptores e pela ativação de rotas secundárias de síntese de compostos potencialmente neurotóxicos.

A liberação de ornitina durante a estabilização das fatias apresentou um aumento significativo nos animais tratados em todas as regiões cerebrais analisadas, conforme demonstra a Figura 23. O aumento dos níveis de ornitina corrobora com o resultado anterior que mostrou teores elevados desse aminoácido no LCR. Ao contrário do observado para o aspartato no estriado, as concentrações de ornitina não foram esgotadas após 3 – 4 h de exposição ao herbicida, trazendo à tona a intrigante possibilidade de que a exposição ao glifosato culmina na ativação de rotas de síntese de ornitina, possibilitando maior substrato para a síntese de poliaminas cerebrais. Este fato é descrito aqui pela primeira vez e pode ser um mecanismo bioquímico subjacente à neurotoxicidade do glifosato e sua relação com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Figura 23 – Liberação do aminoácido ornitina pelo córtex, hipocampo e estriado de ratos expostos agudamente ao glifosato.



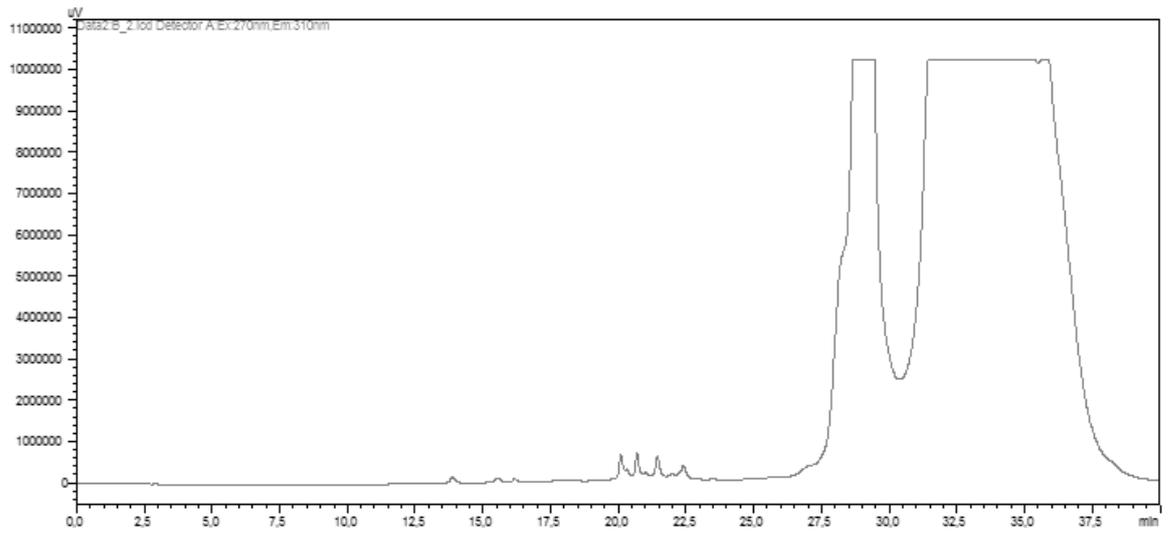
Os dados representam média \pm desvio padrão das fatias em HBSS com sódio. Diferenças entre os grupos (n = 3-4) foram analisadas estatisticamente Teste T. *P < 0,05.

Fonte: Autor, 2019.

4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

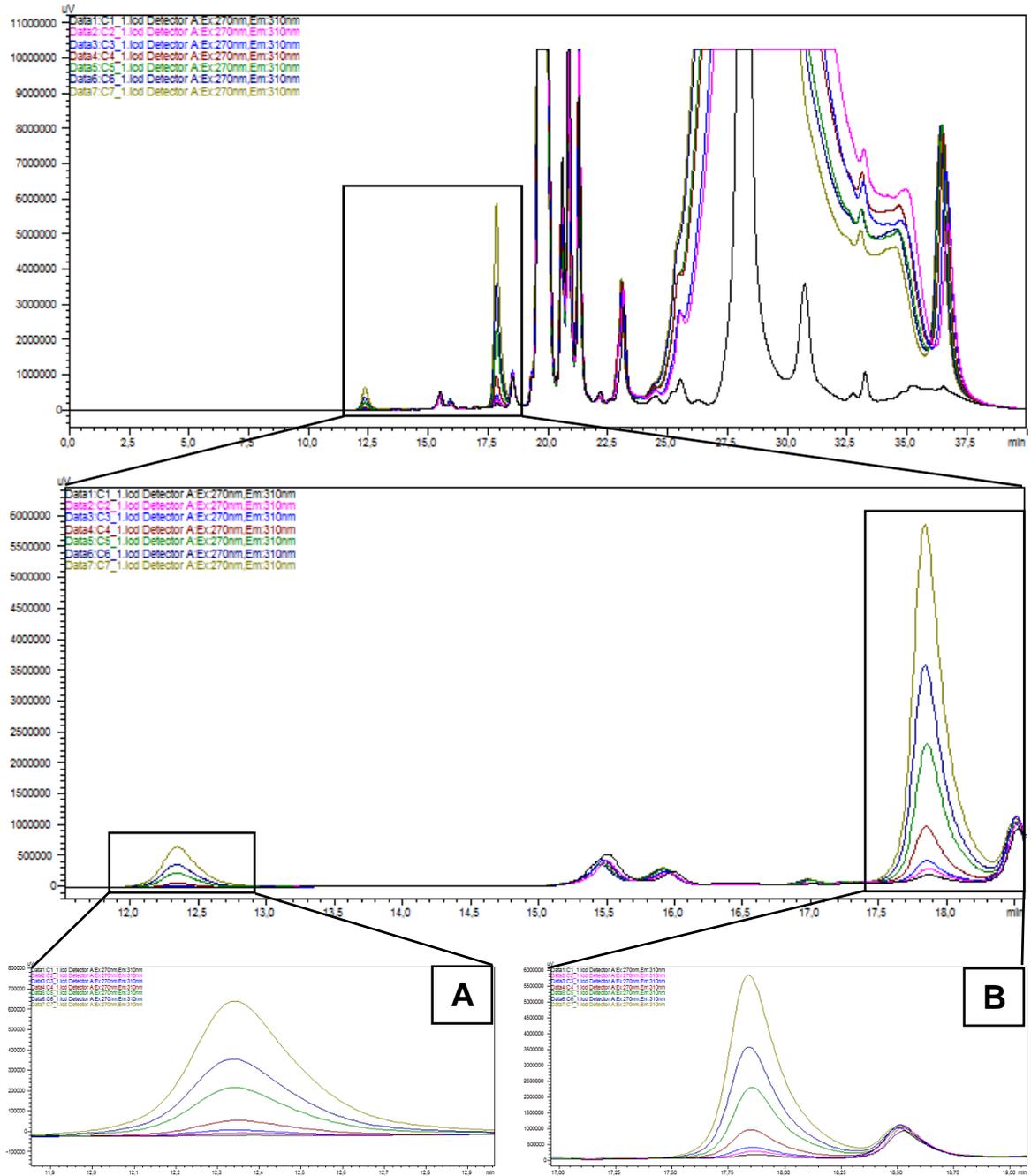
O método desenvolvido para quantificação de glifosato e AMPA permitiu uma separação cromatográfica satisfatória em amostras de LCR batizadas com os dois analitos. A Figura 24 mostra o cromatograma do controle sem analitos, o qual foi preparado conforme a seção 3.6.3, exceto pela adição de água ao invés das soluções de glifosato e AMPA. A seguir, a Figura 25 apresenta amostras de LCR batizadas com glifosato e AMPA nas concentrações de 10 a 500 ng/mL. Pode-se observar que não foi encontrado nenhum pico coeluinto com os analitos. Verificou-se que a partir de 27 min são eluídos picos de componentes endógenos que sofreram reação de derivatização ou picos relativos ao próprio derivatizante. A ordem de eluição dos compostos foi glifosato em 12,3 min, seguido do AMPA em 17,9 min.

Figura 24 – Cromatograma representativo do controle sem adição dos analitos.



Fonte: Autor, 2019.

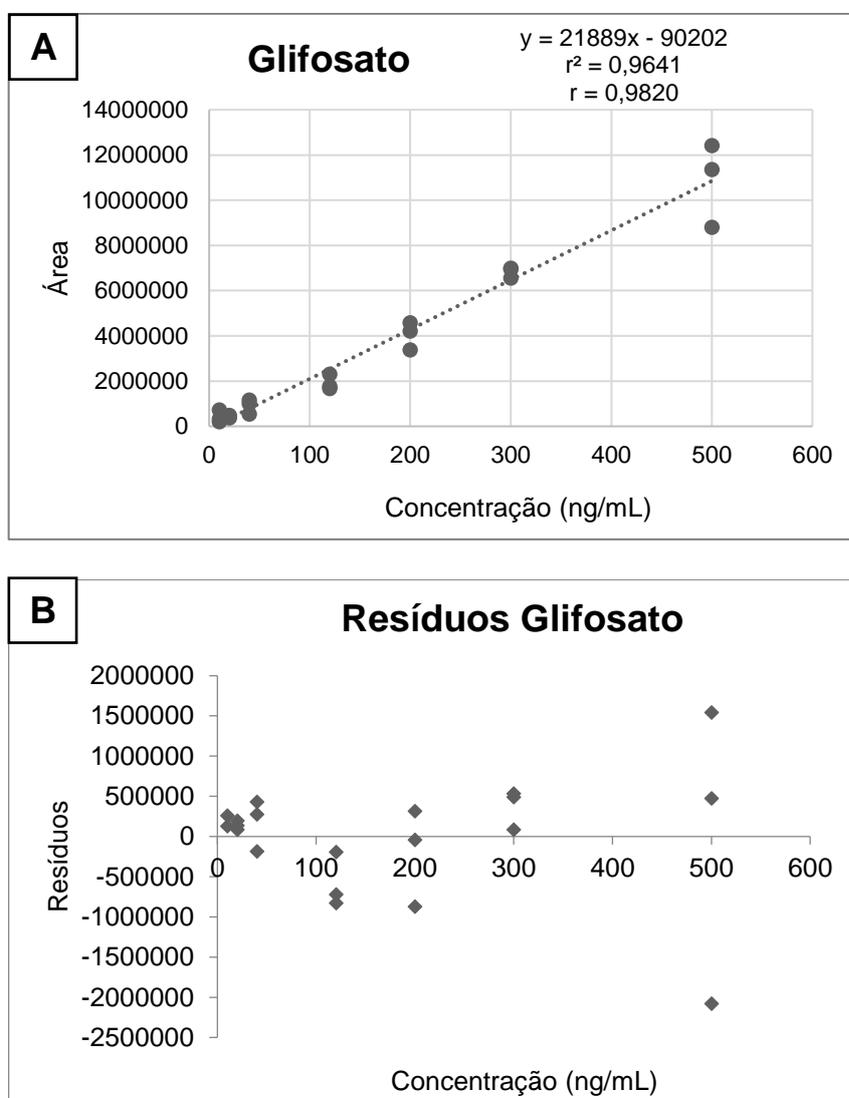
Figura 25 – Cromatograma representativo de amostras de LCR adicionadas de glifosato (A) e AMPA (B) nas concentrações (ng/mL): 10 (preto), 20 (rosa), 40 (azul claro), 120 (violeta), 200 (verde), 300 (azul marinho) e 500 (marrom).



Fonte: Autor, 2019.

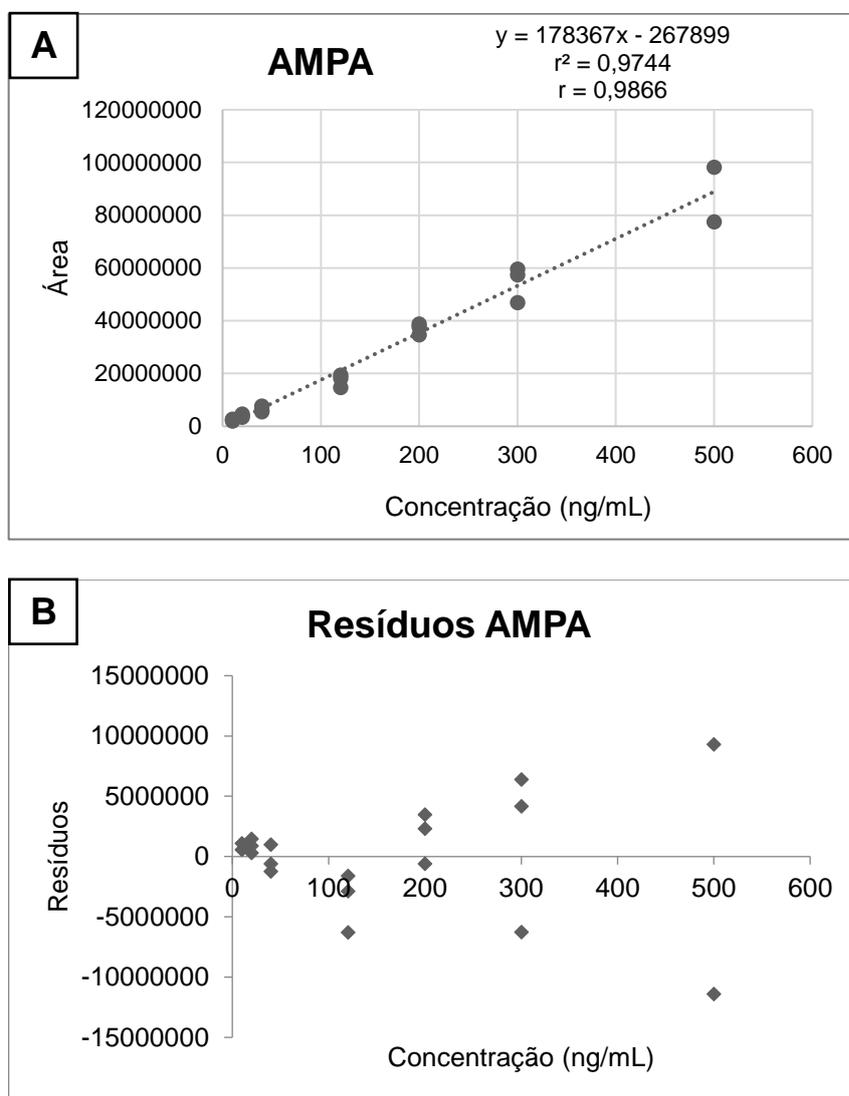
O método demonstrou ser linear na faixa de concentrações estudada (10 - 500 ng/mL) com coeficientes de determinação (r^2) acima de 0,96 e de correlação (r) acima de 0,98 para os dois analitos. As Figuras 26 e 27 mostram as curvas analíticas médias obtidas, com as suas respectivas equações e os gráficos dos resíduos. O valor de y representa as áreas dos picos e o x representa a concentração teórica do analito, expressa em ng/mL.

Figura 26 – Análise de linearidade (A) e análise de resíduos (B) do glifosato derivatizado com FMOC-Cl e analisado por CLAE-FL.



Fonte: Autor, 2019.

Figura 27 – Análise de linearidade (A) e análise de resíduos (B) do AMPA derivatizado com FMOC-Cl e analisado por CLAE-FL.



Fonte: Autor, 2019.

Apesar dos coeficientes de determinação não estarem acima de 0,99, consideram-se aceitáveis os valores obtidos, tendo em vista que o método está sendo desenvolvido para a quantificação dos analitos em uma matriz biológica. Pode-se fazer novos ajustes no modelo com restrição da faixa de concentração, tendo em vista que o valor de 500 ng/mL apresentou alto desvio padrão para o glifosato (Figura 26A) e AMPA (Figura 27A).

A regressão linear foi empregada como teste estatístico para comprovar que y varia em função de x , o que é fundamental para a linearidade. A Tabela 1 mostra a

análise de variância das regressões lineares das curvas de glifosato e AMPA com nível de significância de 5 %.

Tabela 1 – Análise de variância da regressão das curvas de glifosato e AMPA.

Analito	Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F calculado	F crítico
Glifosato	Regressão	1	2,71x10 ¹⁴	2,71x10 ¹⁴	486,99	4,42
	Resíduos	18	1,00x10 ¹³	5,56x10 ¹¹		
	Total	19	2,80x10 ¹⁴			
AMPA	Regressão	1	1,43x10 ¹⁶	1,43x10 ¹⁶	621,97	4,38
	Resíduos	17	3,90x10 ¹⁴	2,29x10 ¹³		
	Total	18	1,47x10 ¹⁶			

Fonte: Autor, 2019.

A significância do modelo linear pode ser avaliada através do seguinte teste de hipóteses, onde β_1 é o coeficiente angular das retas:

$$\begin{cases} H_0 : \beta_1 = 0 \\ H_1 : \beta_1 \neq 0. \end{cases}$$

Comparando-se o valor de F com o valor de F crítico, toma-se a decisão de aceitar ou rejeitar a hipótese nula de que $\beta = 0$. Como F calculado \geq F crítico, rejeita-se a hipótese nula e assume-se que y varia efetivamente em função de x e que o método pode ser considerado linear e que os modelos de regressão são válidos.

Os gráficos de resíduos representam a diferença entre o valor encontrado de y e o valor estimado pelo modelo (equação) em um determinado ponto. A análise visual dos gráficos gerados a partir de ajustes dos modelos lineares aos dados de calibração revela que os resíduos gerados não apresentam comportamento homoscedástico. De maneira ideal, os pontos deveriam cair aleatoriamente em ambos os lados de zero, sem padrões reconhecíveis nos pontos e aleatoriamente dispersos. Esse comportamento pode se dar devido ao alto desvio padrão observado na concentração de 500 ng/mL, o que pode indicar falta de ajuste do modelo nessa faixa.

Os dados de precisão do método, obtidos da análise de amostras de CQB, CQM e CQA em LCR encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Precisão (% CV) para a determinação de glifosato e AMPA.

Conc. Nominal (ng/mL)	Glifosato		AMPA	
	Conc. Experimental (ng/mL)	CV (%)	Conc. Experimental (ng/mL)	CV (%)
20	17,01 ± 1,91	11,2	15,91 ± 0,13	0,8
120	51,24 ± 2,76	5,4	112,51 ± 4,87	4,3
500	390,21 ± 6,45	1,7	431,91 ± 30,29	7,0

Fonte: Autor, 2019.

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. Os valores de CV encontram-se dentro do limite de 15 %, considerável satisfatório para a análise das amostras de baixa, média e alta concentração (EMA, 2012; FDA 2018).

É importante evidenciar que não se fez uso de padrão interno (PI). Previamente foram testadas 50 diferentes moléculas com intuito de encontrar uma que pudesse ser utilizada como PI, com fluorescência intrínseca e também que derivatizavam com FMOC-Cl; entretanto, nenhuma molécula pode ser detectada nos comprimentos de emissão e excitação utilizados neste método.

A utilização de PI é facultativa quando a qualidade dos resultados das amostras analisadas não é comprometida. Em seus estudos, Wang et al. (2016) desenvolveu um método para determinação de glifosato e AMPA em água do mar por CLAE-FL e não fez a utilização de PI, o que não comprometeu a qualidade de seus resultados. O método desenvolvido apresentou a linearidade, precisão e exatidão dentro dos critérios estabelecidos por órgãos internacionais (WANG et al., 2016).

O presente estudo propõe desenvolver uma metodologia capaz de quantificar glifosato e AMPA em amostras de LCR de modo a avaliar a toxicocinética desses compostos no cérebro. O trabalho encontra-se em desenvolvimento, e por tratar-se

de uma metodologia inédita, a etapa de otimização do método exigiu maior dedicação de tempo durante a realização desse estudo. Sendo assim, ainda se faz necessária a finalização da validação com a análise completa dos parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção, eficiência de extração, integridade da diluição, estabilidade e robustez.

5 CONCLUSÃO

Em virtude dos resultados apresentados, pode-se observar que a exposição de ratos *Wistar* ao herbicida à base de glifosato promoveu alteração no metabolismo dos aminoácidos no cérebro, gerando teores elevados de glutamato, aspartato e ornitina no LCR. Apesar disso, não houve diminuição da captação de glutamato nas regiões testadas, nem indícios de reatividade astrocitária (considerando a expressão de GFAP) 3 h após a exposição ao herbicida. Destaca-se o fato de que o metabolismo da ornitina está fortemente ligado ao processo de toxicidade. Em vista disso, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos bioquímicos envolvidos.

Juntamente à investigação dos efeitos do glifosato no cérebro dos animais, uma metodologia bioanalítica para quantificar o glifosato e seu metabólito AMPA no LCR está sendo desenvolvida. Até o momento, a validação parcial indicou que o método tem boa linearidade, é sensível e preciso. Nesse contexto, posteriormente será possível investigar se o glifosato é capaz de ultrapassar a BHE, além de estudar sua toxicocinética cerebral.

Este estudo é de extrema importância para o entendimento dos mecanismos nocivos do glifosato no cérebro, e trouxe contribuições inéditas para a compreensão de mecanismos bioquímicos relacionados à neurotoxicidade do glifosato. Mais evidências que suportem políticas de redução ou eliminação do uso de agrotóxicos devem ser encorajadas para que o consumo destes produtos seja melhor controlado pelos órgãos competentes, visto o grande risco à saúde decorrente da exposição aos mesmos.

6 PERSPECTIVAS

Pode-se sugerir os seguintes trabalhos associados à esta pesquisa, em decorrência dos resultados obtidos:

- Desenvolvimento do método bioanalítico para quantificação de glifosato e AMPA em soro sanguíneo;
- Finalização da validação do método bioanalítico para os dois fluidos biológicos (líquido cefalorraquidiano e soro) e aplicação do método em ratos tratados com herbicida à base de glifosato;
- Avaliação do impacto neuroquímico e comportamental da ingestão de herbicida à base de glifosato no SNC de ratos, através de tratamento subcrônico nos níveis da ingestão diária aceitável (IDA) de glifosato;
- Realização de estudo controle com os adjuvantes do herbicida;
- Estudar o papel da via das poliaminas na mediação da neurotoxicidade do glifosato;
- Investigação da liberação neuronal de glutamato e da geração de espécies reativas em curto período de exposição ao glifosato;
- Investigação *in vitro* dos mecanismos neurotóxicos do glifosato em cultura primária de astrócitos de ratos adultos e neonatos através de marcadores do metabolismo energético, equilíbrio redox e neuroinflamação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, M. A. Fluid and ion transfer across the blood–brain and blood–cerebrospinal fluid barriers; a comparative account of mechanisms and roles. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 13, n. 1, p. 19, 2016.

ABBOTT, N. Joan et al. Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 13-25, 2010.

AHUJA, S.; DONG, M. **Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC**. 1 ed. Elsevier, 2005.

ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Neuroscience: glia—more than just brain glue. **Nature**, v. 457, n. 7230, p. 675, 2009.

ALLEN, N. J.; EROGLU, Cagla. Cell biology of astrocyte-synapse interactions. **Neuron**, v. 96, n. 3, p. 697-708, 2017.

AMRHEIN, N. et al. The mode of action of the herbicide glyphosate. **Naturwissenschaften**, v. 67, n. 7, p. 356-357, 1980.

ANADON, A. et al. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**, v. 190, n. 1, p. 91-95, 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia G01 - Glifosato. 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/G01%2B%2BGlifosato.pdf6a549ab8-990c-4c6b-b421699e8f4b9ab4>>. Acesso em 20/03/19.

_____. Nota Técnica Nº 23/2018/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX /DIRE3/ANVISA. 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/Nota+t%C3%A9cnica+23+de+2018++Glifosato/faac89d6-d8b6-4d8c-8460-90889819aaf7>>. Acesso em 20/03/19.

_____. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>. Acesso em: 06/03/19.

_____. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências, Brasil, 2017.

ASTIZ, M.; DE ALANIZ, M. J. T; MARRA, C. A. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7, p. 2025-2032, 2009.

_____. The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 7, p. 1231-1241, 2012.

BAE, D. et al. The old and new biochemistry of polyamines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1862, n. 9, p. 2053-2068, 2018.

BÁEZ, M. E. et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in aqueous soil matrices: A critical analysis of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization reaction and application to adsorption studies. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 21, p. 3125-3132, 2014.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19, p. 18988-19001, 2016.

BAIER, C. J. et al. Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 64, p. 63-72, 2017.

BALI, Y. et al. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. **Toxicology**, v. 415, p. 18-25, 2019.

BALI, Y.; BA-MHAMED, S.; BENNIS, M. Behavioral and immunohistochemical study of the effects of subchronic and chronic exposure to glyphosate in mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 146, 2017.

BANKS, W. A. From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 15, n. 4, p. 275, 2016.

BARBOSA, E. R. et al. Parkinsonism after glycine-derivate exposure. **Movement Disorders: Official Journal Of The Movement Disorder Society**, v. 16, n. 3, p. 565-568, 2001.

BARTSCH, T.; WULFF, P. The hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability. **Neuroscience**. n. 306, p. 1-16, 2015.

BAUM TRIAL LAWIERS. Where is Glyphosate Banned? Disponível em: <<https://www.baumhedlundlaw.com/toxic-tort-law/monsanto-roundup-lawsuit/where-is-glyphosate-banned/>>. Acesso em 06/03/19.

BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 724-738, 2011.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 3, 2016.

BENTO, C. P. M. et al. Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 301-311, 2016.

BERNACKI, J. et al. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. **Pharmacological Reports**, v. 60, n. 5, p. 600-22, 2008.

BERNAL, J. et al. Development and validation of a liquid chromatography–fluorescence–mass spectrometry method to measure glyphosate and aminomethylphosphonic acid in rat plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 31, p. 3290-3296, 2010.

BICKER, J. et al. Blood–brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 3, p. 409-432, 2014.

_____. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples—a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 768, p. 12-34, 2013.

BOMBARDI, L. M. **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia** - São Paulo: FFLCH - USP, 2017. 296 p.

BORGGAARD, O. K.; GIMSING, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, v. 64, n. 4, p. 441-456, 2008.

BRADY, S. **Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology**. Academic Press, 2011.

BRENNER, M. Role of GFAP in CNS injuries. **Neuroscience letters**, v. 565, p. 7-13, 2014.

BRUNTON, L. et al. **Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica**. McGraw-Hill, 2007.

BROUNS, R. et al. Excitatory amino acids and monoaminergic neurotransmitters in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients. **Neurochemistry International**, v. 56, n. 8, p. 865-870, 2010.

BYRNE, L. M.; WILD, E. J. Cerebrospinal fluid biomarkers for Huntington's disease. **Journal of Huntington's disease**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2016.

CASERO JR, R. A.; MARTON, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. **Nature reviews Drug discovery**, v. 6, n. 5, p. 373, 2007.

CATRINCK, T. et al. A simple and efficient method for derivatization of glyphosate and AMPA using 9-fluorenylmethyl chloroformate and spectrophotometric analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1194-1199, 2014.

CATTANI, D. et al. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, p. 67-80, 2017.

_____. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, p. 34-45, 2014.

CHUNG, W.; ALLEN, N. J.; EROGLU, C. Astrocytes control synapse formation, function, and elimination. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 7, n. 9, p. a020370, 2015.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, n. 5134, p. 689-695, 1993.

CUHRA, M.. Review of GMO safety assessment studies: glyphosate residues in Roundup Ready crops is an ignored issue. **Environmental Sciences Europe**, v. 27, n. 1, p. 20, 2015.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1-105, 2001.

DRUART, C. et al. Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 4, p. 1725-1732, 2011.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science: formerly **Pesticide Science**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

EFSA. European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, v. 13, n. 11, p. 4302, 2015.

EMA. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation guideline on bioanalytical method validation. 2012.

FDA. Food And Drug Administration. Guidance for industry: bioanalytical method validation. p. 1-44. 2018.

GALLEGOS, C. E. et al. Perinatal glyphosate-based herbicide exposure in rats alters brain antioxidant status, glutamate and acetylcholine metabolism and affects recognition memory. *Neurotoxicity Research*, v. 34, n. 3, p. 363-374, 2018.

GANROT, K.; LAURELL, C.. Measurement of IgG and albumin content of cerebrospinal fluid, and its interpretation. *Clinical Chemistry*, v. 20, n. 5, p. 571-573, 1974.

GERMAN FEDERAL INSTITUTE FOR RISK ASSESSMENT (BfR). Frequently asked questions on the assessment of the health risk of glyphosate. 2016. Disponível em: <http://www.bfr.bund.de/en/frequently_asked_questions_on_the_assessment_of_the_health_risk_of_glyphosate-127871>.

GILBERT, M. T. **High performance liquid chromatography**. Elsevier, 2013.

GILLEZEAU, C. et al. The evidence of human exposure to glyphosate: a review. *Environmental Health*, v. 18, n. 1, p. 2, 2019.

HANKE, I.; SINGER, H.; HOLLENDER, J.. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, n. 6, p. 2265-2276, 2008.

HASSEL, B.; DINGLEDINE, R. Glutamate and glutamate receptors. In: **Basic Neurochemistry**. Academic Press, 2012. p. 342-366.

HERNÁNDEZ-PLATA, I. et al. The herbicide glyphosate causes behavioral changes and alterations in dopaminergic markers in male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicology*, v. 46, p. 79-91, 2015.

HOGENDOORN, E. A. et al. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 833, n. 1, p. 67-73, 1999.

HUMPEL, C. Organotypic brain slice cultures: A review. **Neuroscience**, v. 305, p. 86-98, 2015.

IARC. International Agency For Research On Cancer. Volume 112: Some organophosphate insecticides and herbicides: Tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon and glyphosate. 2015.

IBÁÑEZ, M. et al. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, n. 2, p. 145-155, 2005.

INOUE, K. et al. Metabolic profiling of Alzheimer's disease brains. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2364, 2013.

JACQUES, M. T. et al. Reprotoxicity of glyphosate-based formulation in *Caenorhabditis elegans* is not due to the active ingredient only. **Environmental Pollution**, 2019.

JAVED, K.; LUI, F. Neuroanatomy, Cerebral Cortex. In: **StatPearls**. StatPearls Publishing, 2019.

JMPR (JOINT FAO/WHO MEETING ON PESTICIDE RESIDUES). Summary Report. Gattieu/Ottawa 7-17 May 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/ca4888en/ca4888en.pdf>>. Acesso em: 18/12/19.

KARAMI-MOHAJERI, S.; ABDOLLAHI, M. Mitochondrial dysfunction and organophosphorus compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 270, n. 1, p. 39-44, 2013.

KENANOVA, V. E. et al. Tuning the serum persistence of human serum albumin domain III: diabody fusion proteins. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 23, n. 10, p. 789-798, 2010.

KOENIG, H. et al. Brain polyamines are controlled by N-methyl-D-aspartate receptors during ischemia and recirculation. **Stroke**, v. 21, n. 11 Suppl, p. III98-102, 1990.

LARSEN, K. et al. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 811-818, 2012.

LE BOT, B. et al. Optimization and performance evaluation of the analysis of glyphosate and AMPA in water by HPLC with fluorescence detection. **Chromatographia**, v. 56, n. 3-4, p. 161-164, 2002.

LIDDELOW, S. A.; BARRES, B. A. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 957-967, 2017.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 9, p. 613-622, 1994.

LOMBARDI, G. et al. Induction of ornithine decarboxylase by N-methyl-d-aspartate receptor activation is unrelated to potentiation of glutamate excitotoxicity by polyamines in cerebellar granule neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, n. 4, p. 1317-1324, 1993.

MARTÍNEZ, M. et al. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. **Environmental Research**, v. 161, p. 212-219, 2018.

MESNAGE, R. et al. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 133-153, 2015.

MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SÉRALINI, G.-E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**, v. 313, n. 2-3, p. 122-128, 2013.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. The link of organophosphorus pesticides with neurodegenerative and neurodevelopmental diseases based on evidence and mechanisms. **Toxicology**, v. 409, p. 44-52, 2018.

MOTOJYUKU, M. et al. Determination of glyphosate, glyphosate metabolites, and glufosinate in human serum by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 875, n. 2, p. 509-514, 2008.

MYERS, John Peterson et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environmental Health**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2016.

NEUE, U. D. **Chromatography: Liquid. Mechanisms: Reversed Phases**. 2007.

PAJARILLO, E. et al. The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: potential targets for neurotherapeutics. **Neuropharmacology**, 2019.

PEKKNY, M.; NILSSON, M.. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 427-434, 2005.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 22, p. 10625-10629, 1994.

PEREA, G.; SUR, M.; ARAQUE, A. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 378, 2014.

PRAGST, F. **High performance liquid chromatography in forensic toxicological analysis**. In: Handbook of Analytical Separations. Elsevier Science BV, 2008. p. 447-489.

PULESTON, D. J.; VILLA, M.; PEARCE, E. L. Ancillary activity: beyond core metabolism in immune cells. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 1, p. 131-141, 2017.

RAINESALO, S. et al. Plasma and cerebrospinal fluid amino acids in epileptic patients. **Neurochemical Research**, v. 29, n. 1, p. 319-324, 2004.

REED, L. J.; BELLEROUCHE, J. Induction of ornithine decarboxylase in cerebral cortex by excitotoxin lesion of nucleus basalis: association with postsynaptic responsiveness and N-methyl-d-aspartate receptor activation. **Journal Of Neurochemistry**, v. 55, n. 3, p. 780-787, 1990.

REIBER, H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)—a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. **Journal Of The Neurological Sciences**, v. 122, n. 2, p. 189-203, 1994.

ROETTGER, V. R.; GOLDFINGER, Melvyn D. Evidence for amino acid concentration gradients between CSF and extracellular fluid. **Neuroscience Letters**, v. 178, n. 2, p. 197-200, 1994.

ROLLS, E. T. Neurophysiology and cognitive functions of the striatum. **Revue neurologique**, n. 150, p. 8-9, 1994.

SAMANTA, P. et al. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 107, p. 120-125, 2014.

SANCHO, J. V. et al. Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn

fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 737, n. 1, p. 75-83, 1996.

SARCHIELLI, P. et al. Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 8, p. 1082-1088, 2003.

SATO, C. et al. Aseptic meningitis in association with glyphosate-surfactant herbicide poisoning. **Clinical Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 118-120, 2011.

SCHMIDT, A. P. et al. The NMDA antagonist MK-801 induces hyperalgesia and increases CSF excitatory amino acids in rats: reversal by guanosine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 4, p. 549-553, 2009.

SHELDON, A. L.; ROBINSON, M. B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. **Neurochemistry International**, v. 51, n. 6-7, p. 333-355, 2007.

SHIN, W. et al. Limited blood-brain barrier transport of polyamines. **Journal of Neurochemistry**, v. 44, n. 4, p. 1056-1059, 1985.

SIVASHANMUGAM, M. et al. Ornithine and its role in metabolic diseases: An appraisal. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 185-194, 2017.

SOULET, D.; RIVEST, S. Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system. **Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 2, p. 257-268, 2003.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7-35, 2010.

SOUZA, D. G. et al. The astrocyte biochemistry. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 95, p. 142-150, 2019.

SPINK, D. C.; MARTIN, D. L. Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis. **Annals Of Neurology**, v. 29, n. 1, p. 110, 1991.

SQUIRE, Larry et al. **Fundamental Neuroscience**. 4 ed. Academic Press, 2012.

STEPHENSON, C. L.; HARRIS, C. A. An assessment of dietary exposure to glyphosate using refined deterministic and probabilistic methods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 95, p. 28-41, 2016.

STOVER, J. F. et al. Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. **European Journal Of Clinical Investigation**, v. 27, n. 12, p. 1038-1043, 1997.

SWANSON, N. L. et al. Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America. **Journal of Organic Systems**, v. 9, n. 2, p. 6-37, 2014.

TANI, H. et al. A local glutamate-glutamine cycle sustains synaptic excitatory transmitter release. **Neuron**, v. 81, n. 4, p. 888-900, 2014.

TEIVE, H. A. G. Etiopatogenia da doença de Parkinson. **Rev Neurocienc.** v. 13, p. 201-214, 2015.

TEST BIOTECH. High levels of residues from spraying with glyphosate found in soybeans in Argentina. 2013. Disponível em: <<http://www.testbiotech.org/node/926>>. Acesso em 06/03/19.

TUMANI, H.; HUSS, A; BACHHUBER, F. The cerebrospinal fluid and barriers— anatomic and physiologic considerations. In: **Handbook Of Clinical Neurology**. Elsevier, p. 21-32, 2018.

U.S. EPA. U.S. Environmental Protection Agency. Glyphosate issue paper: evaluation of carcinogenic potential. In: EPA's Office of Pesticide Programs, ed. 2016. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/glyphosate_issue_paper_evaluation_of_carcinogenic_potential.pdf>.

VAN BRUGGEN, A. H. C. et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of the Total Environment**, v. 616, p. 255-268, 2018.

VANDENBERG, L. N. et al. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 71, n. 6, p. 613-618, 2017.

WANG, G. et al. Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 17, n. 6, p. 486-487, 2011.

WANG, S. et al. A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Talanta**, v. 161, p. 700-706, 2016.

WHO. World Health Organization. Codex Alimentarius pesticide details: 158 glyphosate. FAO/WHO Food Standards database. 2018. Disponível em <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=158>. Acesso em 20/03/19.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical Journal**, v. 325, n. 2, p. 289-297, 1997.

YAMAZAKI, Y; KANEKIYO, T. Blood-brain barrier dysfunction and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1965, 2017.

ZHAO, J. et al. Detection of glyphosate residues in companion animal feeds. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1113-1118, 2018.

ZION MARKET RESEARCH. Global Glyphosate Market Set For Rapid Growth, To Reach USD 10.88 Billion By 2024. 2018. Disponível em: <<https://www.zionmarketresearch.com/news/glyphosate-market>>. Acesso em 06/03/19.

ZOLLER, O. et al. Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 11, n. 2, p. 83-91, 2018.