

Evento: XII Seminário de Inovação e Tecnologia

VALIDAÇÃO DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE EXPOSIÇÃO DE RATOS WISTAR À DOSE DE INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL DE HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO¹

VALIDATION OF EXPERIMENTAL PROTOCOL FOR EXPOSURE OF WISTAR RATS TO ACCEPTABLE DAILY INTAKE DOSE OF GLYPHOSATE-BASED HERBICIDES

Isadora Sulzbacher Ourique², Diovana Gelati de Batista³, Rafaela Quintana Probst⁴, Juliana Furlanetto Pinheiro⁵, Letícia Mariá Cassol⁶, Thiago Gomes Heck⁷

¹ Pesquisa desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida - UNIJUÍ

² Acadêmica do curso de Biomedicina - UNIJUÍ, Bolsista PIBITI/CNPq, Grupo de Pesquisa em Fisiologia/GPeF

³ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional - UNIJUÍ

⁴ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde - UNIJUÍ

⁵ Acadêmica do curso de Medicina - UNIJUÍ, Bolsista FAPERGS

⁶ Acadêmica do curso de Medicina - UNIJUÍ, Bolsista FAPERGS

⁷ Docente dos Programas de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (UNICRUZ/UNIJUÍ) e em Modelagem Matemática e Computacional (UNIJUÍ)

INTRODUÇÃO

O glifosato [N-(fosfonometil)glicina] atua como um herbicida sistêmico não-seletivo, pós-emergente e de amplo uso na agricultura, sendo os herbicidas à base de glifosato (HBGs) os mais utilizados no mundo (AGOSTINI et al, 2020). Embora colabore para maior rendimento na produção de alimentos, o uso exacerbado de HBGs é de risco à saúde ambiental e humana (MENSAH et al, 2015).

A Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina uma dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA) de HBGs aos humanos de 0,5 mg/Kg pc/dia (ANVISA, 2018). Mundialmente, agências reguladoras e instituições científicas concluíram que o Roundup®, um dos principais HBGs, não representa risco à saúde humana (MENSAH et al, 2015). Porém, estudos com modelos animais têm demonstrado efeitos tóxicos dos HBGs em diversos tecidos (AGOSTINI et al, 2020; TANG et al, 2020), inclusive em dosagens ultra-baixas, menores que a IDA (MESNAGE et al, 2017). Dentre os efeitos, alterações no metabolismo glicêmico têm sido relatadas em modelos animais (WILKENS, 2017) e em humanos expostos cronicamente a HBGs (COSTA et al, 2021). Estes efeitos levantam preocupações acerca do estabelecimento dos “níveis seguros” de exposição a estes herbicidas (VANDENBERG et al, 2017).



Para a avaliação dos efeitos de HBGs em modelos animais, as vias de exposição mais comuns são a oral (por gavagem ou água de consumo) e a intraperitoneal. A exposição por gavagem e por injeções intraperitoneais, embora garantam controle da dosagem que cada animal recebe, podem causar estresse e desconforto em estudos crônicos. Nesse cenário, a exposição via água de consumo, além de não gerar desconforto aos animais, representa uma das vias reais de exposição humana aos HBGs (LARSEN et al, 2012; DARUICH et al, 2001). Neste trabalho, ratos Wistar foram expostos à dose de IDA de HBG via água de consumo. A concentração de princípio ativo foi ajustada ao peso dos animais semanalmente. Aqui, apresentamos o protocolo e a validação do método de exposição ao HBG, e avaliamos seus efeitos glicêmicos.

METODOLOGIA

Foram utilizados 12 ratos Wistar (3 meses de idade, $318 \pm 33g$) machos adultos, provenientes do biotério da UNIJUÍ (CEUA 025-19). Os mesmos foram divididos em dois grupos, com seis animais em cada, sendo o grupo controle (CTRL), que recebeu apenas água, e o grupo glifosato (GLY), que recebeu a dose de IDA de HBG via água de consumo.

Para a exposição ao glifosato, utilizou-se o HBG Roundup® Original DI, contendo 445 g/L de sal de diamônio de N- fosfometil glicina (44,5% m/v, princípio ativo) e 370 g/L do equivalente ácido de N-fosfometil glicina (37% m/v). A solução para oferta do HBG na água de consumo foi preparada semanalmente. Para isso, calculamos a dose de IDA dos animais a cada semana, considerando seu peso semanal, por meio do seguinte cálculo:

$$IDA = 0,5 \text{ mg} * \text{Peso Corporal médio (kg)}$$

Equação 1: Cálculo da dose de ingestão diária aceitável de HBG.

A partir do resultado da Equação 1, foi calculada a concentração de HBG na solução a ser ofertada, considerando o consumo médio diário de água da semana anterior. O volume de HBG adicionado na água de consumo ainda foi ajustado conforme a concentração de princípio ativo da formulação comercial utilizada.

O controle do consumo hídrico foi realizado três vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras) nos mesmos horários, sendo no início da semana a solução residual descartada e ofertada a nova solução.

Para verificar se o método de exposição à dose de IDA de HBG via água de consumo foi eficaz em simular a dose, a concentração média diária de HBG ingerida pelos animais do grupo GLY foi calculada com base no consumo hídrico médio diário de cada semana, conforme Equação 2:

$$Dose\ Ingerida = (Consumo\ hídrico * Concentração\ de\ GLY\ ofertada) / Peso\ Corporal$$

Equação 2: Cálculo da dose de HBG ingerida pelos animais do grupo GLY.

Os efeitos do HBG sobre a glicemia foram avaliados por meio do teste de tolerância à glicose (GTT), realizado no início do experimento e após 4, 8 e 11 semanas. Foi calculada a área incremental sob a curva da resposta glicêmica durante o teste.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para analisar a efetividade do método de exposição ao HBG via água de consumo, a dose de IDA do HBG (concentração de glifosato fornecida semanalmente) foi comparada com a quantidade do herbicida que os animais ingeriram, com base em seu consumo hídrico (resultados da Equação 2), por meio de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. Os dados de Área Incremental Sob a Curva no GTT também foram comparados por ANOVA de vias. Os dados foram analisados no software GraphPad Prism 8.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observamos que a ingestão média de glifosato pelos animais do grupo GLY foi semelhante à dose de IDA (0,5 mg/kg/dia) em todas as semanas do experimento (P = 0,716) (Figura 1). Esse resultado valida o método de exposição ao HBG via água de consumo.

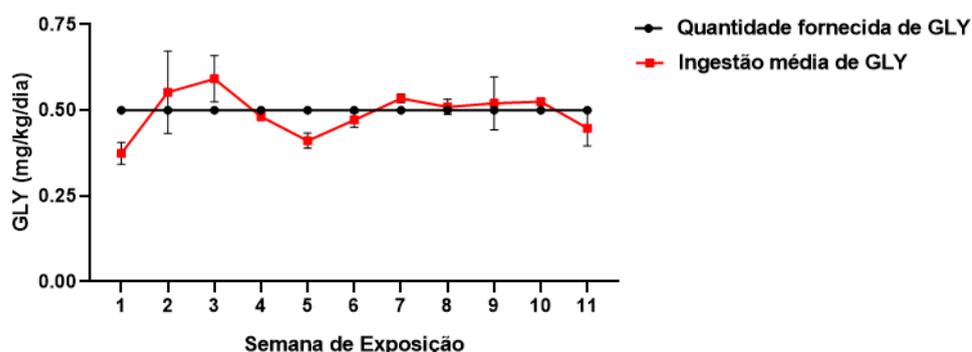


Figura 1: Ingestão média de glifosato via água de consumo durante o experimento. GLY, grupo exposto ao HBG na dose de IDA (0,5mg/kg/dia) por 11 semanas. P = 0,716.



Uma vez que a exposição ao HBG pela água de consumo foi condizente à quantidade desejada, avaliamos os efeitos da exposição sobre o perfil glicêmico dos animais. Verificamos que o HBG não induziu alterações na resposta glicêmica em nenhum dos períodos avaliados ($P = 0,754$) (Figura 2).

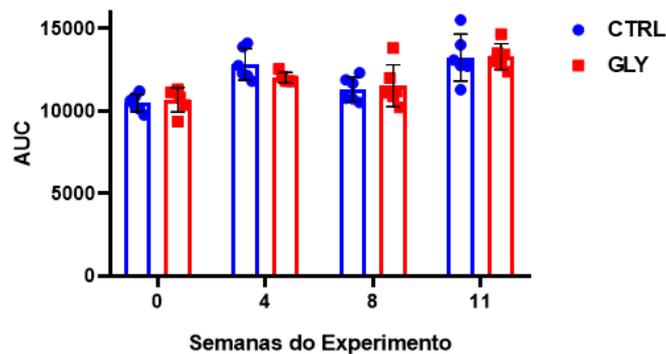


Figura 2: Área incremental sob a curva glicêmica durante os testes de tolerância à glicose (GTT) realizados no início (0) e após 4, 8 e 11 semanas de experimento. CTRL, grupo controle, $n=6$. GLY, grupo exposto ao HBG, $n=6$. $P = 0,754$.

Embora a dose de IDA de HBG não tenha alterado o perfil glicêmico dos animais, um estudo recente demonstrou que a exposição crônica a HBGs em 109 residentes da área rural causou alteração nos níveis de glicemia em 92% (variação de 50 a 150 mg dL⁻¹) (COSTA et al, 2021). Além disso, a exposição aos HBGs sulfentrazone (130µg/L), glifosato (234µg/L) e uma mistura de sulfentrazone mais glifosato (130µg/L mais 234µg/L respectivamente) por 14 dias em 3 grupos de girinos de rãs-touro induziu alterações nos parâmetros bioquímicos como nos níveis de triglicerídeos, proteínas totais, além de induzir a peroxidação lipídica (WILKENS, 2017). Esses estudos indicam que o glifosato, dependendo da dosagem e do tempo de exposição, pode provocar um prejuízo metabólico, o que reforça a necessidade do monitoramento do perfil glicêmico e dos níveis de ingestão desses herbicidas em populações expostas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de exposição ao HBG via água de consumo é eficiente, e pode ser utilizado para estudar a dose de IDA. Neste estudo optamos por verificar os efeitos da exposição ao HBG no controle glicêmico, e os resultados indicam que na dose IDA, a exposição aos HBGs não induz alterações no perfil glicêmico de ratos. Como estes herbicidas



são potenciais desreguladores do metabolismo glicêmico, nosso estudo e de outros reforçam que a exposição humana ao HBG deve ser mantida dentro dos níveis de segurança.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica e Tecnológica (PIBIC CNPq, PIBIC UNIJUÍ, PROBIC FAPERGS, PIBIT CNPq, PIBIT UNIJUÍ, PROBIT FAPERGS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsas.

Palavras-chave: Herbicidas à Base de Glifosato; Glicemia; Ratos Wistar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica nº 23 de 2018. Apresenta a Nota Técnica Preliminar sobre as conclusões da reavaliação do glifosato com as respectivas recomendações [...]. 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/Nota+t%C3%A9cnica+23+de+2018+-+Glifosato/faac89d6-d8b6-4d8c-8460-90889819aaf7>.
- AGOSTINI LP, et al.. Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies. *Sci Total Environ*. 2020 Feb 25;705:135808.
- COSTA, LF. et al. Associação de dados clínicos e laboratoriais de moradores da zona rural à exposição crônica ao glifosato. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, [S. l.], v. 10, n. 1, pág. e56610112214, 2021.
- DARUICH J; ZIRULNIK F; GIMENEZ MS. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ research*, v.85, n.3, p. 226-231, 2001.
- 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.
- MENSAH, P. K.; PALMER, C. G.; ODUME, O. N. Ecotoxicology of glyphosate and glyphosate-based herbicides toxicity to wildlife and humans. In: Larramendy ML, Soloneski S, editors. *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*. InTech, p. 93-112, 2015.
- MESNAGE, R. et al. Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. *Sci Rep* 7, 39328, 2017.
- TANG, Q et al. Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. *Environ Pollut* 261:114129. 2020.
- VANDENBERG LN et al. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *J Epidemiol Community Health*. 2017 Jun;71(6):613-618.
- WILKENS, A. Efeito dos herbicidas Boral® 500 SC e Glifosato® isolados e em mistura sobre o balanço oxidativo, os níveis de glicose e de corticosterona de *Rana catesbeiana* Shaw, 1802. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade. 2017.