

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

LILLIAN CAROLINE FERNANDES

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL FRENTE A EXPOSIÇÃO CRÔNICA
DE BAIXAS DOSES DE PARAQUAT E ASSOCIAÇÕES EM RATOS WISTAR
MACHOS**

PONTA GROSSA

2018

LILLIAN CAROLINE FERNANDES

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL FRENTE A EXPOSIÇÃO CRÔNICA
DE BAIXAS DOSES DE PARAQUAT E ASSOCIAÇÕES EM RATOS WISTAR
MACHOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas na Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de concentração: Fisiologia e Fisiopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

F363 Fernandes, Lillian Caroline
 Avaliação comportamental frente a
 exposição crônica de baixas doses de
 Paraquat e associações em ratos Wistar
 machos/ Lillian Caroline Fernandes. Ponta
 Grossa, 2018.
 68f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências da
 Saúde - Área de Concentração: Fisiologia e
 Fisiopatologia), Universidade Estadual de
 Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi.

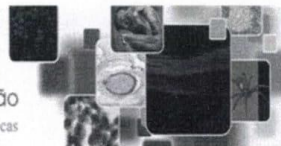
 1.Neurotoxicity. 2.Paraquat.
 3.Mancozeb. 4.Chlorpyrifos. I.Miyoshi,
 Edmar. II. Universidade Estadual de Ponta
 Grossa. Mestrado em Ciências da Saúde.
 III. T.

CDD: 616.075



Universidade Estadual
de Ponta Grossa

Programa de
Pós Graduação
em Ciências Biomédicas



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE Mestrado em Ciências Biomédicas – Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia, Número da Ata 03/2018, da Mestranda Lillian Caroline Fernandes realizado no dia 23 de fevereiro de 2018, na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

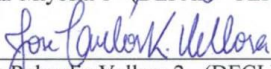
Aos vinte e três dias de fevereiro de dois mil e dezoito, às 09hs00min, no auditório do Hospital Universitário dos Campos Gerais, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do **Professor Dr. Edmar Miyoshi** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Lillian Caroline Fernandes** na linha de pesquisa; Fisiopatologia do Sistema Nervoso Central, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professor Dr. José Carlos Rebuglio Velloso (UEPG/Pr)** e **Professora Dra. Débora Dalla Vecchia (FAPAR/UNINTER)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL FRENTE A EXPOSIÇÃO DE PESTICIDAS EM RATOS WISTER MACHOS.”** Encerrado a defesa, e após reunião, a comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como aprovada considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. A aluna deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim não

Novo título: Avaliação comportamental frente a exposição crônica de baixa dose de Perquat e associações em ratos Wister machos


Edmar Miyoshi 1 - (DEFAR - UEPG) - Presidente


José Carlos Rebuglio Velloso 2 - (DECLIN - UEPG) – Titular


Débora Dalla Vecchia 3- (FAPAR/UNINTER) – Titular

Ponta Grossa, 23 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Lauro e Jucelia por ser exemplo,
apoio, por todo esforço e pela
confiança depositada.

“Colocar todo o coração no seu trabalho é o jeito mais bonito de projetar o futuro.”

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me dar forças diariamente, por não deixar que eu fraquejasse, por ser perfeito em seus planos comigo e por permitir que esse sonho se torne realidade.

Aos meus pais, **Lauro e Jucelia** que me deram apoio, forças e que acreditaram em mim durante todo o tempo. Agradeço imensamente por todo apoio, sem vocês eu não conseguiria nada do que consegui. E ainda, obrigada por serem exemplos de pessoa, sem vocês eu nem saberia a importância de tudo isso e além de tudo, vocês estiveram presentes durante o desenvolvimento desse projeto, ficando orgulhoso de cada momento o que me motiva a ir mais longe.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Edmar Miyoshi** por ter me aceitado como aluna de Iniciação Científica e como aluna de mestrado. Agradeço a agradável convivência durante todo esse tempo, pela confiança e por ser um profissional e uma pessoa que eu admiro e que uso de exemplo a ser seguido, agradeço por ser o meu “pai científico” onde me aconselhou, puxou minha orelha e torceu por mim.

Ao Prof. **Dr. Marcelo Machado Ferro** por todo apoio, por ter me socorrido em diversas vezes, pela confiança e conversas e pelo apoio em diversas situações. Além disso, ser um profissional excelente, sendo exemplo a ser seguido.

Ao Prof. **Dr. Gilson Cesar Nobre Franco**, por acreditar que eu era capaz de estar diante desse momento, por todo apoio e por ter confiado que esse momento chegaria, obrigada também por todos conselhos e por ser um exemplo de profissional, exalando amor pela profissão durante suas aulas. Faltam palavras para agradecer todo apoio e confiança que em mim foram depositados.

Ao Prof. **Dr. Leandro Cavalcante Lipinski** por fornecer espaço em seu laboratório para realizar parte do projeto, pela convivência e conselhos e por ser um profissional excelente, que demonstra amor pela pesquisa, trazendo motivação.

Ao Prof. **Dr. Rui Daniel Prediger e Tuane Sampaio** por ter me recepcionado na Universidade Federal de Santa Catarina com muito carinho e profissionalismo para que eu realizasse análises dessa pesquisa, tendo paciência para explicar todos os protocolos, agradeço também pelos conselhos acerca da pesquisa, fazendo com que ela fique mais completa, obrigada também pela convivência, vocês são exemplos para mim!

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

Ao meu antigo colega e agora amigo de laboratório **Anderson Gustavo**, antes da prova do mestrado eu pensava que tinha um concorrente e nesse tempo de convivência eu ganhei um amigo. Obrigada pelo tempo, pela convivência, por todo apoio, pelo companheirismo nas viagens, congressos, pela ajuda científica e técnica durante esse projeto e por todas as conversas e café, te admiro demais.

A minha amiga **Dyenily Alessi Sloboda**, que tive a honra de além da Enfermagem estar ao lado também no mestrado. Obrigada por dividir esse sonho comigo durante a graduação e por estar presente nele durante esse percurso. Obrigada por todo apoio, por sua amizade tão presente em todos aspectos da minha vida, por me aconselhar e por me permitir participar da sua vida, sabe que juntas somos melhores do que cada uma individualmente.

Aos alunos de Iniciação Científica do laboratório de Neuropsicofarmacologia da UEPG, em especial **Maryana Albino Clavero, Murilo Holtz, Amanda Shaia Rocha e Lucas Fernando Fonseca** que me acompanharam durante a pesquisa, que escutaram minhas ambições, compartilharam suas angústias e escutaram as minhas, obrigada por deixar esse trabalho ser parte da vida de cada um de vocês e eu espero do fundo do coração que isso represente mais do que uma temporada pra vocês e sim algo que sempre vai fazer vocês quererem ir mais longe.

Aos demais alunos que estiveram comigo durante esse tempo de pesquisa, **Camila Baptista, Ana Chuproski, Susi Socki Sborgi** e os alunos de Iniciação Científica do laboratório, obrigada pela convivência, pelo apoio durante o tempo do projeto e por compartilharem comigo sobre o projeto, fazendo com que eu participe do projeto e o mesmo com vocês, obrigada por todo auxílio no projeto.

Aos meus amigos de São Paulo, **Caroline Aversa, Natália Juncal, Beatriz Furtunato, Rafael Kocamahhul, Vitor Nascimento, Vinicius Splugues, Áliky Martiniuk, Augusto Pressoto e aos demais**, por mesmo distante se fazerem presentes, por me proporcionarem visitas, mesmo quando eu não merecia, por acreditarem em mim e por serem o real significado de amizade.

As funcionárias do Biotério, **Marilene e Maria** por me auxiliarem durante o trabalho.

Ao Laboratório Universitário de Análises Clínicas da UEPG por permitir realizar as análises bioquímicas e hematológicas.

Ao Sérgio Bonamigo (*in memorian*) por ter fornecido os pesticidas utilizados nessa pesquisa e por ter compreendido esse estudo.

Aos **demais colegas e Professores do PPG. Ciências Biomédicas** e de outros PPG's por toda convivência e pelos exemplos fornecidos durante esse tempo.

Por todos que de maneira direta ou indireta acreditaram em mim e me inspiraram.

RESUMO

O aumento progressivo da população e da produção de alimentos torna o uso de agrotóxicos essencial. O Brasil tem notoriedade à nível mundial na quantidade desses produtos comercializados, sendo destaque desde 2008. As classes mais utilizadas são os herbicidas, fungicidas e inseticidas. Sabe-se que esses produtos apresentam risco a saúde humana, podendo afetar múltiplos sistemas. Além disso, alguns estudos estão demonstrando efeitos neurotóxicos e comportamentais causados por esses agentes, no entanto, o mecanismo desse efeito permanece incerto. Os pesticidas têm diferentes mecanismos de ação e ainda, podem apresentar efeitos sinérgicos entre si. Com isso, o presente estudo busca avaliar se a exposição ao Paraquat, que é um herbicida, amplamente utilizado devido ao seu baixo custo e amplo espectro de forma isolada e as associações com Mancozeb, que é um fungicida e com o Clorpirifós, que é um inseticida são capazes de produzir efeitos comportamentais. Para isso, foram utilizados 48 ratos machos da linhagem Wistar divididos em 4 grupos de acordo com o agente de exposição: Controle/Água (N=12), Paraquat 1mg/kg (N=12), Paraquat 1mg/kg e Mancozeb 3 mg/kg (N=12), Paraquat 1mg/kg e Clorpirifós 0,3 mg/kg (N=12). A exposição ocorreu diariamente durante 28 dias por via oral (gavagem). Após o período de exposição, foram realizados os testes de preferência à sacarose, reconhecimento social, campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto em cruz elevado e natação forçada. Como resultado têm-se que os animais submetidos ao tratamento apresentaram déficit na memória social e declarativa, evidenciado pelo teste de reconhecimento social e de objetos. Além disso, apresentaram também sinais do tipo ansiogênicos e depressivos, demonstrado pelo teste de labirinto em cruz elevado e natação forçada. Além dos sinais não motores os animais também apresentaram comprometimento motor, evidenciado pelo teste de campo aberto. Como conclusão, demonstramos que a exposição ao Paraquat e associações com Mancozeb e Clorpirifós causou alterações comportamentais nos animais submetidos a exposição com Paraquat e associação com Mancozeb e Clorpirifós.

Palavras chave: Neurotoxicidade. Paraquat. Mancozeb. Clorpirifós.

ABSTRACT

The progressive increase in population and food production makes the use of agrochemicals essential. Brazil is known worldwide in the quantity of these products marketed, being highlighted since 2008. The classes most used are herbicides, fungicides and insecticides. It is known that these products pose a risk to human health and can affect multiple systems. In addition, some studies are demonstrating neurotoxic and behavioral effects caused by these agents, however, the mechanism of this effect remains uncertain. Thus, the present study aims to evaluate whether exposure to Paraquat, which is a herbicide, widely used because of its low cost and broad spectrum in isolation and as associations with Mancozeb, which is a fungicide and with Chlorpyrifos, which is an insecticide are capable of producing effects. For this, 48 male Wistar rats divided into 4 groups according to the exposure agent: Control/Water (N= 12), Paraquat 1mg/kg (N= 12), Paraquat 1mg/kg and Mancozeb 3 mg/kg (N = 12), Paraquat 1 mg/kg and Chlorpyrifos 0.3 mg/kg (N = 12). The exposure occurred daily for 28 days orally (gavage). After the exposure period, sucrose preference tests, social recognition, open field, object recognition, elevated plus maze and forced swimming were performed. As a result, the animals submitted to the treatment had deficits in the social and declarative memory, evidenced by the test of social recognition and objects. In addition, they also presented anxiogenic and depressive signs, demonstrated by the elevated plus maze test and forced swimming. In addition to non-motor signals, the animals also presented motor impairment, evidenced by the open field test. As a conclusion, we demonstrated that exposure to Paraquat and associations with Mancozeb and Chlorpyrifos caused behavioral changes in animals submitted to Paraquat exposure and associated with Mancozeb and Chlorpyrifos.

Keywords: Neurotoxicity. Paraquat. Mancozeb. Chlorpyrifos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura Química do Clorpirifós.....	25
Figura 2 - Ilustração do mecanismo do Clorpirifós.....	26
Figura 3 - Estrutura Química do Mancozeb, mistura do maneb (a) e zineb (b)..	28
Figura 4 - Cadeia de transporte de elétrons.....	30
Figura 5 - Estrutura Química do Paraquat	32
Figura 6- Esquema do mecanismo de ação do Herbicida Paraquat	34
Figura 7- Mecanismos propostos de neurotoxicidade pelo PQ.....	35
Figura 8 - Ordem cronológica das etapas realizadas no estudo	39
Figura 9- Sequência de testes comportamentais.....	40
Figura 10- Ilustração da exploração durante o teste de reconhecimento social.	42
Figura 11 - Ilustração do teste de campo aberto.....	43
Figura 12 - Ilustração do teste de reconhecimento de objetos.....	44
Figura 13 - Ilustração do teste de labirinto em cruz elevado.....	45
Figura 14 - Ilustração do teste de natação forçada modificada.....	47
Figura 15- - Resultados referentes ao teste de preferência à sacarose.	48
Figura 16 - Resultados referentes ao teste ao teste de reconhecimento social.	49
Figura 17- Resultados referente ao teste de campo aberto.....	51
Figura 18- Resultados referentes ao teste de Reconhecimento de Objetos.....	52
Figura 19- Resultados referentes ao teste de labirinto em cruz elevado.	53
Figura 20- Resultados referentes ao teste de natação forçada.	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos agrotóxicos.....	21
Quadro 2 - Classificação de acordo com capacidade de danos a saúde	22
Quadro 3 - Relação dos grupos, tratamento e dose a ser administrada.	39

LISTA DE SIGLAS

ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APGAR	Aparência, Pulso, Gesticulação, Atividade, Respiração
ATP	Adenosina Trifosfato
COBEA	Código Brasileiro de Experimentação Animal
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CPF	Clorpirifós
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DL50	Dose Letal 50
ED	Escore de Discriminação
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ETU	Etilenoureia
FRAC	Fungicide Resistance Action Commite
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MZ	Mancozeb
IC	Intracerebral
IP	Intraperitoneal
LUAC	Laboratório Universitário de Análises Clínicas
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
OFS	Organofosforados

PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PCR	Proteína C Reativa
PQ	Paraquat
RID	Ratio of Investigation Duration
ROS	Espécies Reativas à Oxigênio
SC	Subcutânea
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNC	Sistema Nervoso Central
TGI	Trato Gastrointestinal
TGO	Transaminase Glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. HISTÓRICO	19
2.2. PANORAMA	20
2.3 INSETICIDAS – ORGANOFOSFORADOS	24
2.3.1 Clorpirifós	24
2.3.1.1 Mecanismo de Ação e Manifestações Clínicas	25
2.3.1.2 Efeitos Neurológicos.....	26
2.4 FUNGICIDAS – DITIOCARBAMATOS	27
2.4.1 Mancozeb	28
2.4.1.1 Mecanismo de Ação	29
2.4.1.2 Efeitos Neurológicos.....	30
2.5 HERBICIDAS – BIPYRIDÍLICOS	31
2.5.1 Paraquat.....	32
2.5.1.1 Mecanismo de Ação	32
2.5.1.2 Efeitos Neurológicos.....	34
3. OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 ANIMAIS	38
4.2 DIVISÃO DOS GRUPOS E TRATAMENTO	38
4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	40
4.3.1 Teste de Preferência à Sacarose	40
4.3.2 Teste de Reconhecimento Social.....	41

4.3.3	Teste de Campo Aberto	42
4.3.4	Teste de Reconhecimento de Objetos	43
4.3.5	Teste de Labirinto em Cruz Elevado	44
4.3.6	Teste de Natação Forçada Modificado.....	45
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5.	RESULTADOS	48
5.1	TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE.....	48
5.2	TESTE DE RECONHECIMENTO SOCIAL.....	49
5.3	TESTE DE CAMPO ABERTO	50
5.4	TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	52
5.5	TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	53
5.6	TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA	54
6.	DISCUSSÃO	56
7.	CONCLUSÃO	62

1. INTRODUÇÃO

Devido ao aumento progressivo da população e da produção de alimentos torna-se essencial o uso de pesticidas na produção agrícola. Essa utilização teve início em 1950 com a intenção de controlar doenças no ambiente agrícola e a fim de maximizar a produtividade e os lucros.

Atualmente, segundo a EMBRAPA são utilizados 2,5 milhões toneladas de agrotóxicos a nível mundial, no Brasil o consumo anual é superior a 300 mil toneladas, representando um aumento de 700% nos últimos 40 anos. E ainda, o Brasil vem ocupando o topo do ranking mundial na utilização de agrotóxicos desde 2008. Além do Brasil ter um consumo anual que é destaque a nível mundial, o número de ingredientes ativos e produtos também tem grande importância, mais de 130 empresas produzem aproximadamente 2400 agrotóxicos.

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura física, quanto aos efeitos na saúde humana e ainda, pelo agente que combatem, podendo ser classificados de acordo com este último em algicidas, larvicidas, acaricidas, herbicidas, inseticidas e fungicidas.

Dentre as classes mais utilizadas estão os herbicidas, fungicidas e os inseticidas, representando 45%, 14% e 12%, respectivamente do comércio no mercado nacional e as demais categorias representam 29% deste comércio.

Dentre os herbicidas e fungicidas, destacam-se o Paraquat e Mancozeb, devido ao baixo custo, amplo tempo de ação e efetividade. Ambos agentes têm como mecanismo de ação a indução do estresse oxidativo que sustentam a hipótese da toxicidade destes agentes. Em relação aos inseticidas, destaca-se o Clorpirifós, que é um dos agentes mais utilizados do mundo e tem sua toxicidade baseada na inibição da acetilcolinesterase e conseqüentemente, a hiperestimulação colinérgica.

Todos esses agentes citados, tem a possibilidade de causar alterações comportamentais e alterações a nível de SNC, porém, as vias envolvidas nessas

alterações permanecem incertas. O Clorpirifós está associado com declínio cognitivo, depressão e suicídio. O Mancozeb através do estresse oxidativo pode causar Parkinsonismo e morte de neurônios dopaminérgicos e o Paraquat também pode causar Parkinsonismo e isso parece ocorrer devido a indução do estresse oxidativo que pode levar a indução da formação de agregados de -sinucleína, além disso, podendo causar disfunção mitocondrial, apoptose, autofagia e a inibição do sistema ubiquitina-proteassoma.

O interesse em estudar esses pesticidas e mecanismos supracitados se deve a pesquisas que demonstram que os seres humanos são expostos cronicamente a misturas destes agentes. Além da toxicidade de cada agente de forma isolada, um estudo demonstrou que existe um efeito sinérgico entre esses agentes, produzindo uma potencialização dos efeitos.

Com base nisso, este trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito da administração de Paraquat isoladamente e das associações com Mancozeb e Clorpirifós a nível comportamental e bioquímico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HISTÓRICO

A necessidade crescente da utilização de pesticidas se deve ao aumento da população e conseqüentemente, da produção em larga escala de alimentos. Esse panorama foi iniciado em 1950 onde o cenário agrícola sofreu algumas mudanças, com inserção de novas tecnologias e para controlar doenças no ambiente agrícola e aumentar a produtividade (PIMENTEL, 1996).

As primeiras substâncias a serem utilizadas no combate a insetos e fungos tiveram início em 2500 a.C. com os sumérios que utilizavam enxofre no combate a insetos. Em 400 a.C. o piretro era utilizado como forma de combate a piolhos. Posteriormente, os chineses começaram a utilizar arsênio para controle de insetos. Também foram utilizados cloreto de mercúrio, sais de cobre e enxofre na agricultura. Esses produtos foram utilizados em escala mundial, inclusive no Brasil em cultivos de milho, algodão e cana. A utilização de compostos orgânicos era reduzida a basicamente a aplicação de inseticidas naturais, como a nicotina, rotenona ou o pyretrum (ASPELIN, 2003).

Durante a segunda guerra mundial, foram utilizados inseticidas para proteger os soldados das regiões tropicais e subtropicais da África e da Ásia das doenças, sendo então, utilizados inseticidas orgânicos sintéticos (QUATRIN et al., 2016).

Após a primeira guerra mundial, aproximadamente em 1930, houve um declínio na produção de alimentos, e com isso, foram realizadas intervenções para o aumento da produtividade das principais culturas de grãos na revolução verde.

A primeira substância a mostrar eficiência foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT) sintetizado em 1879, no entanto, teve sua atividade inseticida identificada em 1939 por Paul Hermann Muller. Essa descoberta rendeu o prêmio Nobel de medicina em 1948. A partir disso, tem sido contínua a incorporação de novos compostos cada vez mais eficazes e seletivos, a exemplo a síntese dos organofosforados, N-metilcarbamatos, benzimidazóis e derivados da ureia (ASPELIN,2003).

2.2. PANORAMA

O uso dos pesticidas, atualmente, faz-se necessário para o controle de pragas, para um melhor desenvolvimento de culturas e maximização de lucros devido à redução na perda da produção. Além disso, o mercado possui critérios para comercialização de produtos, estipulando padrões na seleção, onde, alimentos que possuem contaminação por fungos e/ou bactérias ou alterações no aspecto visual e no sabor são descartados ou recusados por apresentar riscos de intoxicações alimentares aos consumidores.

O uso desses compostos é proporcional ao tamanho da lavoura, ou seja, quanto maior o cultivo, maior a incidência de doenças e a necessidade da utilização de pesticidas. Conseqüentemente, com o aumento demográfico da população, há necessidade de expansão nos cultivos, acarretando uma demanda maior na utilização de pesticidas (RANGEL; SARCINELLI; ROSA, 2011).

Após reivindicações, o termo agrotóxico passou a ser substituído por “defensivo agrícola” esse termo foi regulamentado pelo decreto 4.074 de 4 de janeiro de 2002 que regulamentou a lei no 7.802/1989 que define agrotóxico como: “produtos e agentes produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Os agrotóxicos são divididos em classes de acordo com o agente que combatem, podendo-se citar os herbicidas, fungicidas, acaricidas, algicidas, larvicidas e inseticidas, as categorias que tem maior produção atualmente são os fungicidas, herbicidas e inseticidas (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003). Além disso, podem ser divididos de acordo com a estrutura química, e quanto aos efeitos na saúde humana. A divisão de acordo com a estrutura química e os organismos que combatem estão dispostos no Quadro 1.

Natureza da praga controlada	Grupo Químico	Exemplos
<i>Inseticidas</i> (Controle de insetos)	Inorgânicos Extratos vegetais Organoclorados Organofosforados Carbamatos Piretróides sintéticos Microbiais	Fosfato de alumínio, arsenato de cálcio Óleos vegetais Aldrin, DDT, BHC Clorpirifós, Paration, Metil-paration Carbofuran, Aldicarb, Carbaril Deltametrina, Permetrina <i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Fungicidas</i> (Combate aos fungos)	Inorgânicos Ditiocarbamatos Dinitrofenóis Organomercuriais Antibióticos Trifenil estânico Compostos Formilamina Fentalamidas	Calda Bordalesa, enxofre Mancozeb, Tiram, Metiram Binapacril Acetato de fenilmercúrio Estreptomicina, Ciclo-hexamida Duter, Brestam Triforina, Cloraniformetam Captafol, Captam
<i>Herbicidas</i> (Combate às plantas invasoras)	Inorgânicos Dinitrofenóis Fenoxiacéticos Carbamatos Dipiridilos Dinitroanilinas Benzonitrilas Glifosato	Arsenito de sódio, cloreto de sódio Bromofenoxim, Dinoseb, DNOC CMPP, 2,4-D, 2,4,5-T Profam, Cloroprofam, Bendiocarb Diquat, Paraquat, Difenzoquat Nitralin, Profluralin Bromoxinil, Diclobenil Round-up
<i>Desfolhantes</i> (Combate às folhas indesejadas)	Dipiridilos Dinitrofenóis	Diquat, Paraquat Dinoseb, DNOC
<i>Fumegantes</i> (combate às bactérias do solo)	Hidrocarbonetos halogenados Geradores de Metil-isocianato	Brometo de metila, cloropicrina Dazomet, Metam
<i>Rodenticidas /Raticidas</i> (Combate à roedores e ratos)	Hidroxycumarinas Indationas	Cumatetralil, Difenacum Fenil-metil-pirozolona, pindona
<i>Moluscocidas</i> (Combate aos moluscos)	Inorgânicos (aquáticos) Carbamatos (terrestres)	Sulfato de cobre Aminocarb, Metiocarb, Mexacarbato
<i>Nematicidas</i> (Combate aos nematódeos)	Hidrocarbonetos halogêneos Organofosforados	Dicloropropeno, DD Diclofention, Fensulfotion
<i>Acaricidas</i> (Combate aos ácaros)	Organoclorados Dinitrofenóis	Dicofol, Tetradifon Dinocap, Quinometionato

Quadro 1 - Classificação dos agrotóxicos

Fonte: PERES; MOREIRA, 2003.

Atualmente, segundo a Embrapa são utilizados 2,5 milhões de toneladas no mundo, no Brasil o consumo anual tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais, representando aumento de 700% nos últimos 40 anos. Além disso, segundo a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) o Brasil vem ocupando o primeiro lugar no ranking mundial de consumo de agrotóxicos

desde 2008. No momento, existem mais de 1000 ingredientes ativos de pesticidas no mundo. No Brasil, 130 empresas produzem aproximadamente 2400 produtos com estes ingredientes (SPADOTTO; GOMES, 2017).

Como forma de controle da exposição dos trabalhadores e moradores da zona rural, a ANVISA determinou alguns parâmetros para o controle de agrotóxicos nos alimentos. Com isso, ficou determinado a dose letal 50 (DL50), dose que mata 50% das cobaias em testes científicos, o limite máximo de resíduos que é a quantidade máxima de agrotóxico no alimento e a ingestão diária aceitável que é a quantidade máxima do agrotóxico que ingerida, diariamente, durante toda a vida não oferece risco a vida (GAZZONI, 2017).

Além desses parâmetros padronizados pela ANVISA, existe também a classificação de acordo com a lei federal no 7802/89 e decreto no 98.816 de 11 de janeiro de 1990. Essa classificação demonstra a capacidade desses compostos causarem dano a saúde após várias ou exposições isoladas através da dose letal 50 (RIBAS; MATSUMURA, 2009). O quadro 2 demonstra a classificação de acordo com os efeitos que provocam à saúde humana.

Classe Toxicológica	Toxicidade	DL50	Faixa Colorida
I	Extremamente tóxico	< 5 mg/kg	Vermelho
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50 mg/kg	Amarelo
III	Mediamente tóxico	Entre 50 e 500 mg/kg	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5000 mg/kg	Verde
-	Muito pouco tóxico	Acima de 5000 mg/kg	-

Quadro 2 - Classificação de acordo com capacidade de danos a saúde

Fonte: RIBAS; MATSUMURA, 2009

O contato com essas substâncias traz riscos à saúde através de intoxicações agudas e ainda, são capazes de aumentar o risco para o desenvolvimento de algumas doenças crônicas através da exposição ambiental ou ocupacional. No ponto de vista ambiental, essas substâncias são capazes de causar desequilíbrio nos sistemas ecológicos, podendo aumentar a mortalidade de aves pela contaminação de rios, lagos e mares, ademais, quando o pesticida é aplicado, ocorre lixiviação pelo vento, que tem como consequência a morte de aves e peixes, e ainda, causa efeitos negativos em insetos polinizadores (FREITAS; PINHEIRO, 2010).

Os cultivos que representam maior periculosidade para a saúde humana são os de soja, milho, citros, cana de açúcar e café que são os que recebem maior número de agrotóxicos e ainda, ocupam áreas extensas do Brasil e apresentam-se fontes potenciais de contaminação pelo uso de pesticidas em grandes áreas (SPADOTTO; GOMES, 2017).

Uma das formas que mais acometem o ser humano é na forma de intoxicação aguda, estudos em países em desenvolvimento demonstram taxa de intoxicação aguda por agrotóxicos de 18,2 a cada 100.000 trabalhadores. Sendo o principal motivo, o suicídio (WHO, 2017). No Brasil, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) registrou 1907 casos até julho de 2017. O Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) registrou 4665 casos em 2013 e 4462 em 2014. Lembrando que, existem alguns casos que não são notificados nos órgãos competentes, tornando esse número ainda maior (SINAN, 2017).

Além da exposição de forma aguda, a exposição crônica do ser humano a diferentes tipos de pesticidas tem sido relacionada com aumento do risco de desenvolvimento de diversas doenças crônicas. No entanto, os estudos realizados para avaliação desses riscos, verificam o efeito da exposição aguda, não levando em consideração a exposição ambiental e ocupacional que esses indivíduos estão submetidos (GANGEMI et al., 2016).

Com relação a exposição ambiental, as principais formas de contaminação da população em geral pelos pesticidas se dão através da contaminação da água de poço que os moradores e/ou trabalhadores da zona rural consumo, contato direto pela pele com o agente tóxico (GANGEMI et al., 2016) e alimentos contaminados. Uma pesquisa realizada na pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA) verificou que de 2013 a 2015 verificou que 58% apresentavam resíduos de pesticidas e que dentro desse número, 38,3% estavam dentro do limite máximo e 3% estavam acima do limite máximo. Além disso, foi verificado que 18,3% apresentavam resíduos de pesticidas não autorizados para aquela cultura. Ademais, algumas amostras apresentaram vários resíduos simultâneos, 1% da amostra apresentava 10 ingredientes ativos diferentes. Ou seja, naquela amostra tinham diversos pesticidas com mecanismos semelhantes ou diferentes que poderia causar a potencialização da toxicidade exercida sobre o organismo (ANVISA, 2016).

A exposição a longo prazo a pesticidas pode prejudicar a saúde humana, causando danos em diferentes sistemas podendo ainda, estar relacionado com o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, tais como: doenças cardiovasculares, diabetes, doenças respiratórias, nefropatias, déficit de atenção e hiperatividade, autismo, uma grande variedade de tipos de câncer, problemas reprodutivos, deficiências congênitas e problemas de desenvolvimento, além de doenças neurodegenerativas, como esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer e Doença de Parkinson (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017). Sendo as classes mais utilizadas os herbicidas (45%), fungicidas (14%) e os inseticidas (12%) torna-se preocupante para a saúde humana os riscos destas exposições.

2.3 INSETICIDAS – ORGANOFOSFORADOS

Os inseticidas têm ação contra insetos que podem ser prejudiciais aos cultivos e representam uma das classes mais utilizadas globalmente. Dentre os inseticidas, os classificados como organofosforados (OFS) equivalem a 50% dos inseticidas usados mundialmente (CAVALCANTI et al., 2016).

Os organofosforados (OFS) tem ação na inibição da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase. A acetilcolinesterase tem como função a degradação da acetilcolina em colina e acetato, essa inibição tem como consequência o aumento no nível de acetilcolina na fenda sináptica e conseqüentemente, nas sinapses (SIQUEIRA; KRUSE, 2008).

Os OFS são amplamente utilizados, um estudo realizado pelo Centro Experimental de Pesquisa de Saúde e Nutrição demonstrou que entre 1999-2000, mais do que 50% dos participantes da pesquisa, tinham metabólitos de OFS na urina. Além disso, um estudo, realizado pela EPA em 2006 demonstrou que são utilizados cerca de 3.2 a 4.1 toneladas por ano (ABREU-VILLACA; LEVIN, 2017).

2.3.1 Clorpirifós

Um dos inseticidas mais utilizados da classe dos OFS é o Clorpirifós (CPF) (O, O diethylO-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate), com forma molecular

C₉H₁₁Cl₃NO₃PS. (QUATRIN et al., 2016). Esse agente pertence a classe I, sua estrutura do CPF está disposta na Figura 1.

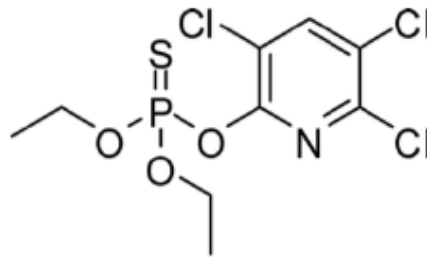


Figura 1- Estrutura Química do Clorpirifós

Fonte: QUATRIN, 2016

A sua ampla utilização se deve a sua ação, que causa 100% de morte aos ácaros testados, além de ser o que necessita de menor quantidade de ingrediente ativo para causar 99% de mortalidade, representando então, o inseticida com maior benefício de uso, tendo maior efetividade e menor custo (FRAGOSO et al., 2002).

O CPF é aplicado em culturas de milho, trigo, soja, feijão, café, algodão, frutas cítricas, maçã, banana, cenoura, repolho, tomate, couve e fumo e a utilidade nessas aplicações é no controle de moscas, lagartas, ácaros e pulgões e por ser amplamente utilizado devido ao baixo custo e funcionalidade em diversas culturas, diversos moradores e trabalhadores da zona rural tem quadro de intoxicação por esse agente. Outro fator que corrobora com esse fato é que o CPF é altamente lipossolúvel, sendo absorvido facilmente pela pele, membranas mucosas e via respiratória (QUATRIN et al., 2016).

2.3.1.1 Mecanismo de Ação e Manifestações Clínicas

A ação do CPF é baseada, assim como nos demais OFS, na inibição da acetilcolinesterase e na hiperexcitabilidade de receptores colinérgicos do tipo muscarínicos e nicotínicos. A acetilcolinesterase pode ser encontrada no tecido nervoso, junção neuromuscular e nos eritrócitos. O quadro clínico de resposta a exposição é caracterizado por lacrimejamento, sialorreia, sudorese, diarreia, tremores, constrição brônquica causada pelo aumento de secreção pulmonar e depressão do sistema nervoso central. Alterações em músculos esqueléticos

estão relacionados com a estrutura química do composto e com o tipo de músculo, sendo o diafragma e músculos intercostais os mais afetados (SIQUEIRA; KRUSE, 2008). A ilustração do mecanismo de ação está demonstrada na Figura 2.

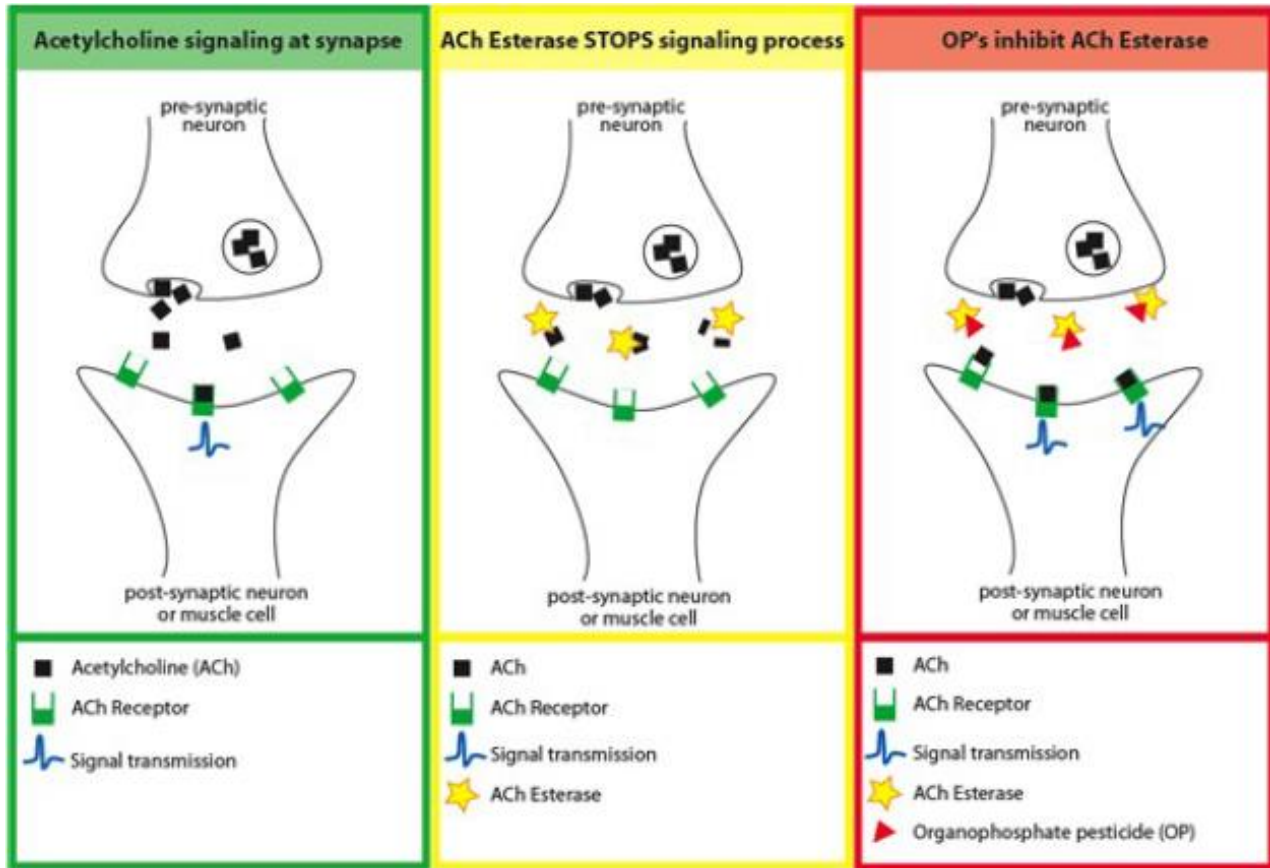


Figura 2 - Ilustração do mecanismo do Clorpirifós

Fonte: HASHIM, 2015.

2.3.1.2 Efeitos Neurológicos

A exposição ao CPF e a classe dos organofosforados tem sido relacionada com declínio cognitivo, incluindo déficits na detecção de estímulos nervosos como no processamento de informações, atenção e memória e ainda tem sido relacionada com depressão e suicídio (ALDRIDGE et al., 2005) e o mecanismo desses achados nos estudos com animais e epidemiológicos permanecem incertos.

O CPF e outros agentes da classe dos OFS causam três tipos de sequelas neurológicas após intoxicação aguda ou devido exposições crônicas,

polineuropatia retardada, síndrome intermediária e efeitos comportamentais. A polineuropatia retardada ocorre após a intoxicação aguda ou após efeito acumulativo de uma exposição crônica, é manifestada quando há cerca de 70-75% de acetilcolinesterase bloqueada, a apresentação desse quadro inclui fraqueza progressiva e ataxia das pernas, podendo evoluir até a paralisia flácida (SESA, 2013).

Outro tipo de efeito neurológico é a síndrome intermediária que ocorre após recuperação da crise colinérgica da polineuropatia retardada, o sintoma principal é a paralisia que afeta principalmente os músculos flexores do pescoço, músculo das pernas e respiratórios, diarreia intensa com perda severa de potássio, essa síndrome apresenta risco de morte, ao contrário da polineurite retardada. Já os efeitos comportamentais são considerados resultados de exposições subagudas ou de exposições crônicas a baixo nível de OFS que se acumulam com o tempo. As alterações comportamentais comumente encontradas são a insônia, alteração no sono, ansiedade, dificuldade de concentração, apatia, irritabilidade, depressão, dificuldade de concentração e déficits de memória (SESA, 2013).

Alguns estudos demonstram esses efeitos, com base em pesquisas experimentais e epidemiológicas. Em estudos realizados foi verificado que os indivíduos expostos a OFS tem o desenvolvimento de sintomas como ataxia, tremores, vertigens, convulsões, coma, ansiedade, confusão mental, irritabilidade, ansiedade, depressão, dificuldade de concentração e déficit de memória (MEYER, 2005) (STALLONES; BESELER, 2016).

Essas alterações comportamentais são desenvolvidas frente a exposição dos OFS, assim como os estudos anteriormente citados demonstram. No entanto, os fungicidas que são amplamente utilizados, também podem causar alterações a nível neurológico, comportamental e cognitivo.

2.4 FUNGICIDAS – DITIOCARBAMATOS

Os fungicidas têm como ação a destruição ou inibição de fungos que atacam os cultivos. E ainda, essa classe representa a principal ferramenta no manejo de doenças em plantas. A classificação utilizada é a proposta pelo “*Fungicide Resistance Action Commite*” (FRAC, 2016) que leva em consideração o mecanismo de ação e a probabilidade de promover a seleção de fungos

resistentes. Segundo essa fonte, os fungicidas são divididos em: inibidores da biossíntese de esteróis, inibidores da respiração celular, interferentes na divisão celular e mitose e atividades em múltiplos alvos (RODRIGUES, 2006).

Uma das classes mais utilizadas são os que tem como mecanismo de ação a inibição da respiração celular, dentre eles podemos citar os ditiocarbamatos que são derivados do ácido carbâmico, que foi sintetizado em 1920 como acelerador do enxofre na vulcanização da borracha e em 1934 constatou-se a propriedade de fungicida (RODRIGUES, 2006).

Existem 5 classes dentro do grupo dos ditiocarbamatos, os bissulfitos de tetrametiluram (tiram), dimetilditiocarbamatos metálicos (Ferbam e Ziram), propineb bisditiocarbamato metálico (Propineb), N-metilcarbamato de sódio (metam-sódio) e etilenobisditio carbamatos metálicos (Zineb, Maneb e Mancozeb) (RODRIGUES, 2006).

2.4.1 Mancozeb

O Mancozeb (MZ) (zinco; manganês (2+); N-[2-(sulfidocarbotiolamino) etil] carbamoditioato) é formado por mistura de moléculas de etileno bis-ditiocarbamato contendo átomos de manganês e zinco (2,5% de zinco e 20% de manganês). Esse agente pertence à classe I, sendo considerado altamente tóxico (SCARIOT, 2017). Sua estrutura é apresentada na Figura 3.

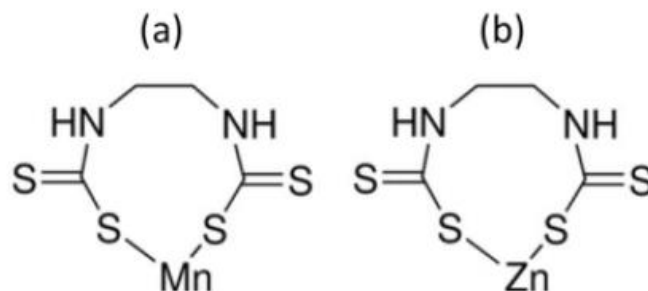


Figura 3 - Estrutura Química do Mancozeb, mistura do mane b (a) e zineb (b)

Fonte: SCARIOT, 2017

O MZ é amplamente utilizado, por diversos fatores, primeiramente, por seu espectro de ação, podendo ser utilizado para diversos cultivos e espécies patogênicas. Atualmente, o MZ pode ser utilizado em 46 culturas no Brasil, como

na batata, tomate, beterraba, feijão e outras, além disso, o MZ possui 34 formulações comercializadas no país e é indicado para controle de 43 espécies de fungos fitopatogênicos (AGROFIT, 2016). Todos esses fatores, corroboram para a ampla utilização do MZ no país. Um estudo realizado pelo IBAMA em 2013 demonstra que foram vendidas 8,3 mil toneladas de Mancozeb no ano do estudo.

2.4.1.1 Mecanismo de Ação

Nas plantas, ocorre a formação de uma película protetora na superfície, impedindo a penetração de patógenos, tendo dessa forma, propriedade de proteção de contato. A característica, já mencionada, do MZ ser utilizada em diversas culturas se deve ao amplo espectro, além disso, possui múltiplos sítios de ação, tendo atuação no metabolismo lipídico, na respiração e na produção da adenina trifosfato. Essa característica é benéfica, pois com os múltiplos mecanismos de ação o risco de os fungos criarem resistência diminui (RODRIGUES, 2006).

Outro ponto importante acerca da forma de ação do MZ é o fornecimento de nutrientes para as plantas, quando é aplicado o agente nas plantas ocorre liberação da manganês e zinco nas culturas que auxilia no desenvolvimento do cultivo (PIROZZI et al., 2016). No que se refere ao uso, o mesmo pode ser utilizado em associação com os fungicidas sistêmicos. Estudos realizados no Brasil demonstraram que a utilização de MZ associado aos sistêmicos na pulverização faz com que os fungicidas sistêmicos penetrem mais nas plantas, possivelmente por um efeito sinérgico, sendo este considerado um carreador (RIBEIRO et al., 2016).

Os mecanismos de ação em humanos, não está bem elucidado. Sabe-se que o MZ reage e inativa os grupos de sulfidrilas inibindo a função enzimática adequada, além disso, tem capacidade de quelar metais, ou seja, tem capacidade de capturar metais no organismo. Ademais, gera disfunção mitocondrial, redução de enzimas de oxidação celular gerando a superprodução de EROS (HOFFMAN; TROMBETTA; HARDEJ, 2016).

2.4.1.2 Efeitos Neurológicos

Conforme estudos, indica-se que a intoxicação pelo MZ pode causar parkinsonismo, isso se deve pela presença do Manganês atuando no Sistema Nervoso Central (SNC). Além disso, outros estudos demonstram que o MZ apresentou efeitos neurotóxicos, para explicar esse efeito os mecanismos descritos foram a catálise e oxidação de catecóis como a dopamina, inibição do complexo III da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, alteração no ciclo redox celular devido a sua capacidade de quelar metais e aumento da susceptibilidade ao dano oxidativo, devido a alterações no sistema antioxidante celular (ARBO et al., 2009).

Dessa forma, o MZ destina-se principalmente a enzimas mitocondriais, perturbando a função mitocondrial e a produção de adenosina trifosfato (ATP), reduzindo a respiração celular ligada ao NADH e comprometendo o complexo mitocondrial III, causando um impacto no funcionamento do sistema ubiquitina-proteasoma (MUTHUKUMARAN; LAFRAMBOISE; PANDEY, 2011) (LIU et al., 2017).

O complexo III é formado por 2 tipos de citocromo b, pelo citocromo c1, uma proteína enxofre/ferro e entre 4 a 6 proteínas adicionais. A coenzima q liga-se aos elétrons que estão no complexo I e no complexo II e os transporta para o complexo III (RODRIGUES, 2006). O citocromo c faz transporte do complexo III para o complexo IV, conforme esquema do transporte de elétrons indicado na Figura 4.

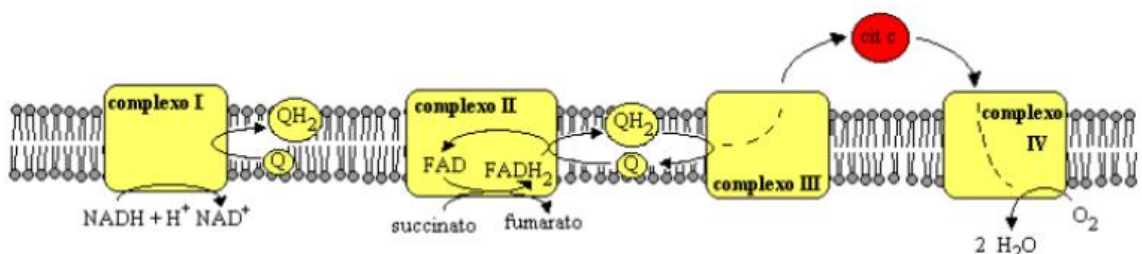


Figura 4 - Cadeia de transporte de elétrons

Fonte: RODRIGUES, 2016

Todos esses mecanismos parecem colaborar para alterações neuroquímicas e comportamentais da exposição ao Mancozeb. A exposição ao MZ pode corroborar para o desenvolvimento de déficits cognitivos, de memória e distúrbios no comportamento (MOHANDAS et al., 2017), no entanto, a via que leva à essas alterações não estão claras, os estudos até o momento, sugerem os possíveis mecanismos. Além dos inseticidas e fungicidas, outra classe que causa essas alterações são os herbicidas.

2.5 HERBICIDAS – BIPYRIDÍLICOS

Essa classe faz combate a ervas daninhas que acaba competindo com os cultivos pelos nutrientes e ainda, essas ervas daninhas podem abrigar pragas e doenças. Além disso, atuam como agente seletivo, favorecendo o crescimento de algumas plantas, que seriam os cultivos e de outras não, no caso as ervas daninhas. Os herbicidas são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, época de plantação, seletividade, dinâmica fisiológica e estrutura química (MESQUITA, 2017).

Os herbicidas seletivos são mais tolerados por determinadas culturas, um exemplo destes é a atrazina. Os não seletivos atuam de forma indiscriminada sobre todas as espécies de plantas, sendo o Glyphosate e o Paraquat representantes dessa classe. Em relação a época de plantio, diferencia-se em pré-plantio e pós-plantio, no pré-plantio o objetivo é controlar a população inicial de plantas daninhas e no pós-plantio seria o pré-emergência e o pós-emergência (MESQUITA, 2017).

Podem também ser classificados como de contato, sendo aplicado na folha, caule ou solo e tendo atuação em um local da planta e/ou cultivo, podendo ser na folha, flor, fruto, caule. Os sistêmicos realizam translocação e inibem processos vitais na planta podendo alterar a mitose, fotossíntese, síntese de aminoácidos ou pigmentos, que é o caso do Paraquat.

Em relação ao mecanismo de ação, existe uma tabela de divisão que classifica os herbicidas em letras de acordo com o modo de ação destes. De forma geral, os herbicidas podem gerar alteração de lipídios e membranas, causar prejuízo na formação de aminoácidos, inibir a fotossíntese, alterar a peroxidação lipídica e conseqüentemente, a formação da membrana celular,

atuar na clorofila e citocromo, inibir a formação de microtúbulos, inibir a divisão celular, dentre outros (MESQUITA, 2017).

2.5.1 Paraquat

Dentre diversos herbicidas com diferentes mecanismos de ação, destaca-se o Paraquat (PQ) que é utilizado em mais de 100 lavouras, inclusive, na de cereais, sementes, oleaginosas, frutas e legumes que crescem em diversos climas. O PQ é amplamente utilizado por diversos motivos, devido a ação rápida, que permite que ocorra o plantio de mais de uma lavoura dentro de uma mesma estação, provoca pouca resistência das ervas daninhas e por ser não-seletivo e de amplo espectro também diminui a probabilidade de resistência das ervas daninhas (CENTRO, 2013). Além desses pontos positivos para o comércio, existe também a vantagem do clima. Mesmo quando ocorre chuva após a aplicação, o PQ consegue ter quantidade suficiente para sua ação, sendo eficaz também em baixas temperaturas (CENTRO, 2013).

Esse agente pertence a classe I, sua nomenclatura química é 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium, fórmula bruta com C₁₂H₁₄N₂ e sua formula estrutural está na Figura 5.

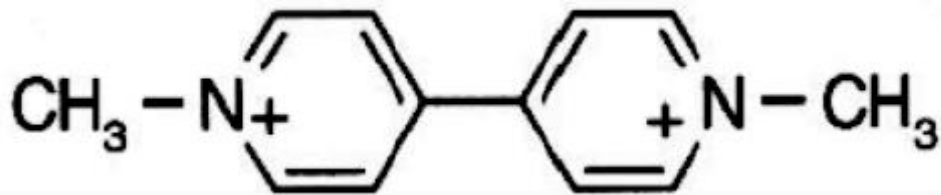


Figura 5 - Estrutura Química do Paraquat

Fonte: MARTINS, 2013

2.5.1.1 Mecanismo de Ação

O PQ nas plantas tem como forma de atuação a desidratação das partes verdes das plantas que entra em contato. O local de ação do PQ é o cloroplasto, nos cloroplastos existem os sistemas fotossintéticos das plantas que absorvem energia luminosa para produzir açúcares, e o PQ é conhecido por agir no sistema

de membrana fotossintética chamado fotossistema I. Os elétrons livres no fotossistema reagem com o íon do PQ resultando na forma de radical livre, o oxigênio reconverte esse radical e produz o superóxido, altamente reativo, que ataca os ácidos graxos insaturados das membranas, desidratando as membranas e tecidos das células (MARTINS, 2013).

O processo íon de PQ se recicla, produzindo maiores quantidades de superóxido até que o suprimento de elétrons livres acabe e o maior dano causado pelo estresse oxidativo é a peroxidação dos ácidos graxos que constituem a membrana celular que resulta em um desequilíbrio no metabolismo aeróbio e representa uma grave ameaça para a homeostase celular (MARTINS, 2013).

As plantas protegem suas células e compartimentos dos efeitos das ROS provocado ou não por herbicidas com auxílio de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase, peroxiredoxina catalase que contribuem na resposta da planta ao estresse oxidativo. No entanto, mesmo com a presença das enzimas, o nível e o tipo das ROS são determinantes para a resposta. O peróxido de hidrogênio e superóxido podem induzir genes de defesa e resposta adaptativa, os níveis subletais podem levar as plantas as condições de estresse e reduzir o seu crescimento e em altas concentrações as ROS levam a uma programada morte celular controlada geneticamente (MARTINS, 2013).

No homem, o PQ pode ser reduzido pela enzima NADPH (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) - citocromo P450 redutase com a transferência de um elétron, formando o radical Paraquat. Este, por sua vez, em presença de oxigênio oxida-se rapidamente produzindo um ânion radical superóxido (O_2^-) e regenerando o Paraquat. Dessa forma, ciclos repetidos de redução e reoxidação do herbicida podem ocorrer gerando uma grande quantidade de espécies de oxigênio reduzido que levam o organismo ao estresse oxidativo (SOUZA; MACHADO, 2003).

Os efeitos tóxicos do Paraquat são baseados, de forma geral pela reação de oxidação-redução, ou seja, pela transferência de um elétron para o NADP, formando o NADPH e formas oxidadas potencialmente tóxicas como o radical superóxido. O oxigênio é completamente reduzido por quatro elétrons transportados ao longo da cadeia respiratória, gerando duas moléculas de água. No entanto, uma pequena parcela dos elétrons escapa da cadeia respiratória,

resultando em uma redução parcial do oxigênio molecular, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na forma de oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio H_2O_2 , radical hidroxila (*OH) e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (SCHMITT et al., 2006a). O esquema ilustrativo do mecanismo de ação do Paraquat está demonstrado na Figura 6.

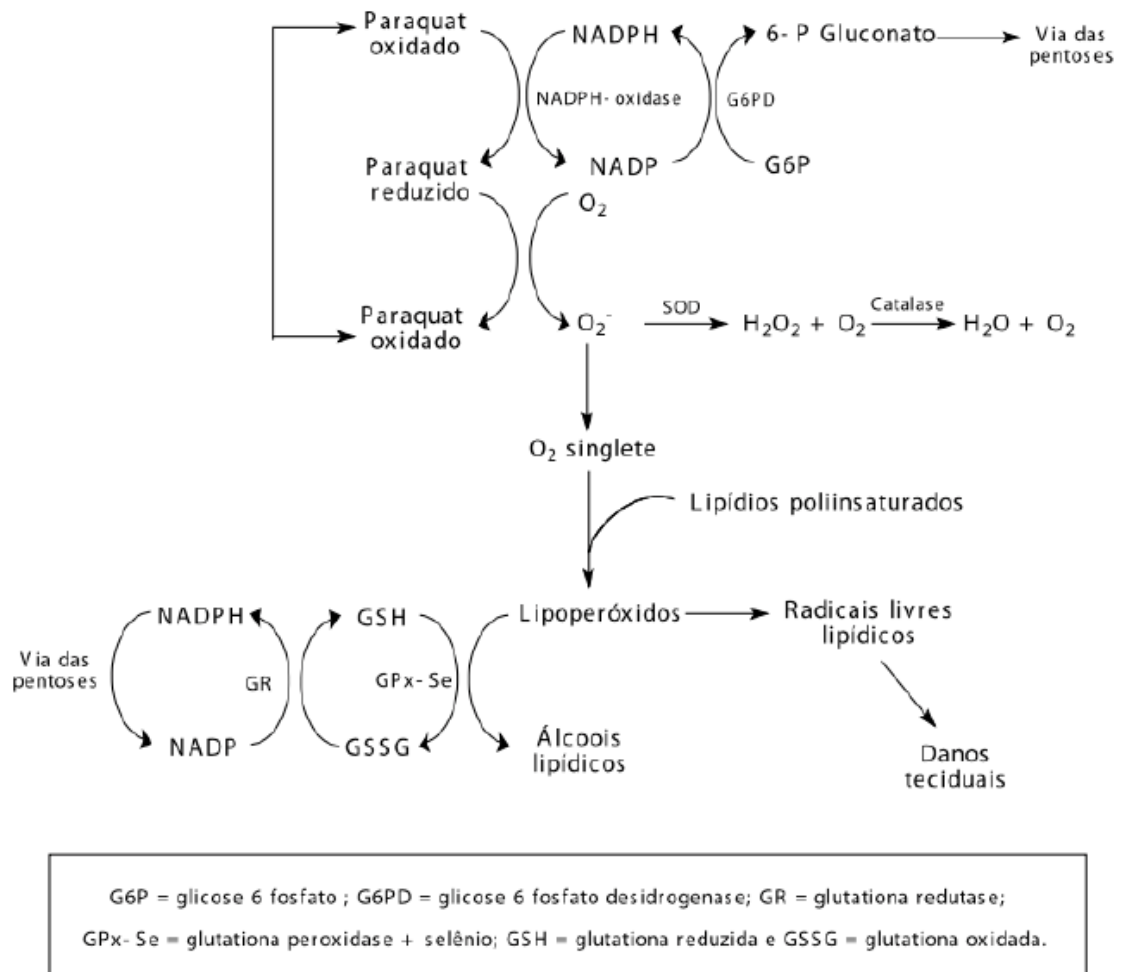


Figura 6- Esquema do mecanismo de ação do Herbicida Paraquat

Fonte: SCHMITT, 2006

2.5.1.2 Efeitos Neurológicos

Diversos estudos demonstram que o PQ tem efeitos neurotóxicos, no entanto, não se sabe os mecanismos que levam a esse efeito. Acredita-se que o PQ tenha ação no SNC através de transportadores de aminoácidos e

posteriormente, seja transportado para o interior das células de maneira dependente do sódio. Dentro da célula, ocorre a indução do estresse oxidativo e a indução da formação de agregados de alfa-sinucleína.

Além disso, acredita-se que ocorre disfunção mitocondrial, especialmente no complexo I, ou seja, a morte programada, autofagia e inibição do sistema ubiquitina-proteassoma tem papéis importantes no mecanismo neurotóxicos do PQ (SHIMIZU et al., 2001) (BALTAZAR et al., 2014). Os mecanismos propostos desempenhados pelo PQ para produzir efeitos neurotóxicos estão dispostos na Figura 7.

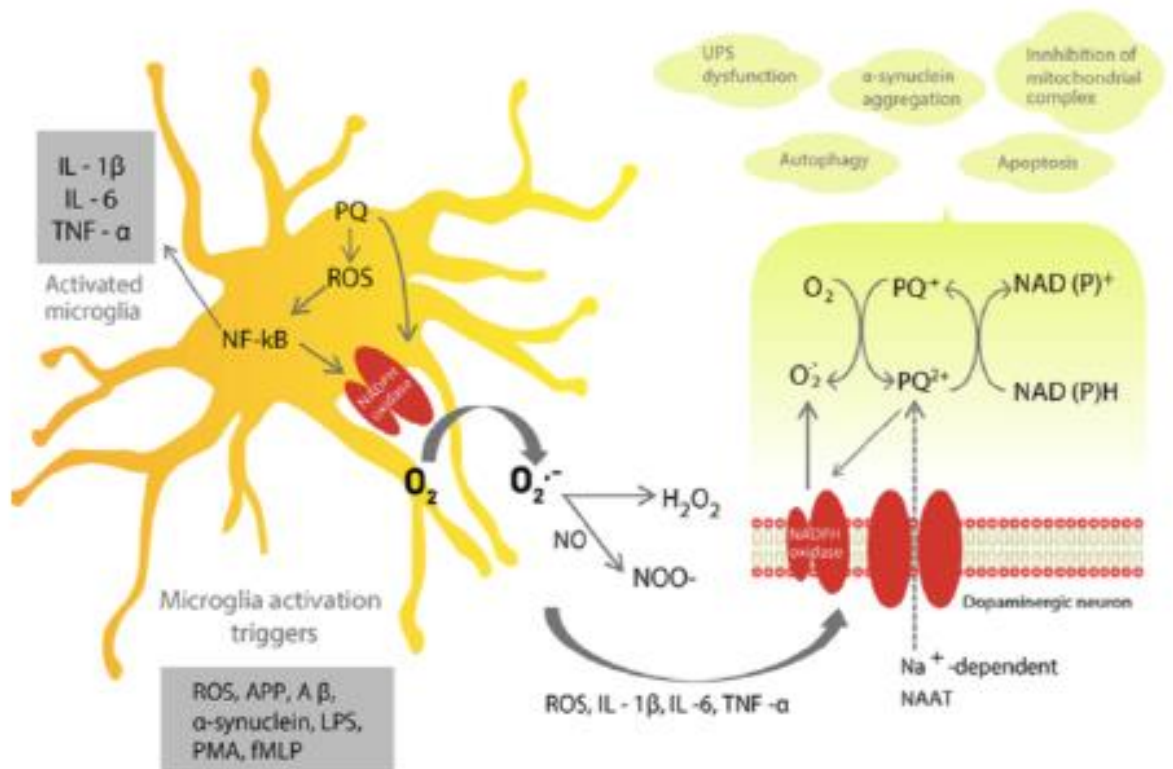


Figura 7- Mecanismos propostos de neurotoxicidade pelo PQ.

FONTE: BALTAZAR. et al., 2014.

Para reforçar essa hipótese, um estudo realizado por Manning em 2002 demonstra que a exposição de PQ aos roedores causam características patológicas da doença de Parkinson, incluindo deposição intraneural de proteínas e degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos e como consequência a neurodegeneração gera disfunção motora (MANNING-BOG et al., 2002). Outro

estudo realizado por Wang em 2017 demonstrou que o PQ induz neurodegeneração, quando administrado na dose de 10 mg/kg, esse achado foi confirmado por diminuição da tirosina hidroxilase e na redução de neurônios dopaminérgicos (WANG et al., 2017).

Um estudo realizado por SU e colaboradores em 2015 avaliaram o efeito das administrações de Clorpirifós, Mancozeb e Paraquat nas doses de 3 mg/kg, 30 e 10 mg/kg por dia intraperitoneal uma vez por semana por 4 semanas. Os animais submetidos a esse protocolo, apresentaram sintomas semelhantes aos observados na DP (SU; NIU, 2015). No entanto, essa via de exposição não é a mesma que os indivíduos e/ou trabalhadores estão expostos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito comportamental da administração do Paraquat isoladamente e das associações com o Mancozeb e Clorpirifós em ratos Wistar machos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a administração de Paraquat isoladamente e associações são capazes de causar alterações na memória social e declarativa observadas no teste de reconhecimento social e de objetos;
- Avaliar se a administração de Paraquat isoladamente e associações são capazes de causar sinais do tipo depressivos no teste de preferência à sacarose e natação forçada;
- Avaliar se a administração de Paraquat isoladamente e associações são capazes de causar sinais do tipo ansiogênicos no teste de labirinto em cruz elevado;
- Avaliar se a administração de Paraquat isoladamente e associações são capazes de causar comprometimento motor observados pelo teste de campo aberto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

O estudo utilizou ratos machos da linhagem Wistar com três meses de idade e com peso inicial aproximado de 290 gramas. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro inicia às 07h) e foram mantidos com água e ração à vontade. Foram utilizados 48 animais (Controle N=12; Paraquat N=12; Paraquat + Mancozeb N=12; Paraquat + Clorpirifós N=12). A manipulação da amostra seguiu o protocolo de recomendações da COBEA (Código Brasileiro de Experimentação Animal) e esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPG (protocolo 040/2016).

4.2 DIVISÃO DOS GRUPOS E TRATAMENTO

A divisão dos grupos ocorreu de acordo com o tratamento, sendo eles: controle/água (veículo), Paraquat 1 mg/kg (herbicida), Paraquat 1mg/Kg e Mancozeb 3mg/Kg (herbicida e fungicida) e Paraquat 1 mg/Kg e Clorpirifós 0,3 mg/Kg (herbicida e inseticida), totalizando dessa forma, 4 grupos no estudo. As administrações se deram por via oral (gavagem) e a solução com os tratamentos foi preparada diariamente assim como a administração. O tratamento durou 4 semanas. Para cálculo da dose a ser administrado, foi usado a seguinte fórmula: $Dose = \frac{2 \text{ ml}}{1000\text{g peso do animal}}$.

A divisão dos grupos e o número de animais presentes em cada grupo está disposto no Quadro 3. Após as administrações foram realizados os testes comportamentais, a ordem cronológica destes durante o estudo está na Figura 8 e 9.

Grupos	Tratamento	Dose a ser administrada
I.	Água (N=12)	2 ml/1000g
II.	Paraquat 1 mg/kg (N=12)	
III.	Paraquat 1 mg/kg e Mancozeb 3 mg/kg	
IV.	Paraquat 1 mg/kg e Clorpirifós 0,3 mg/kg	

Quadro 3 - Relação dos grupos, tratamento e dose a ser administrada.

Fonte: A AUTORA

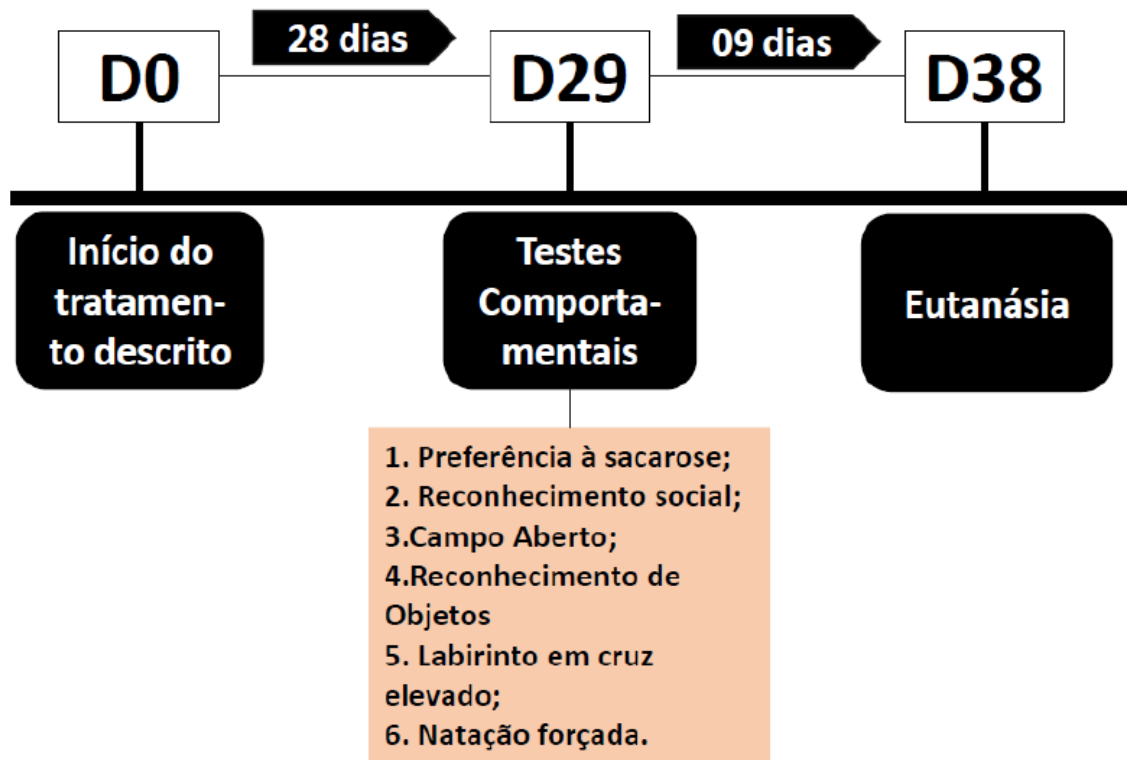


Figura 8 - Ordem cronológica das etapas realizadas no estudo

Fonte: A AUTORA

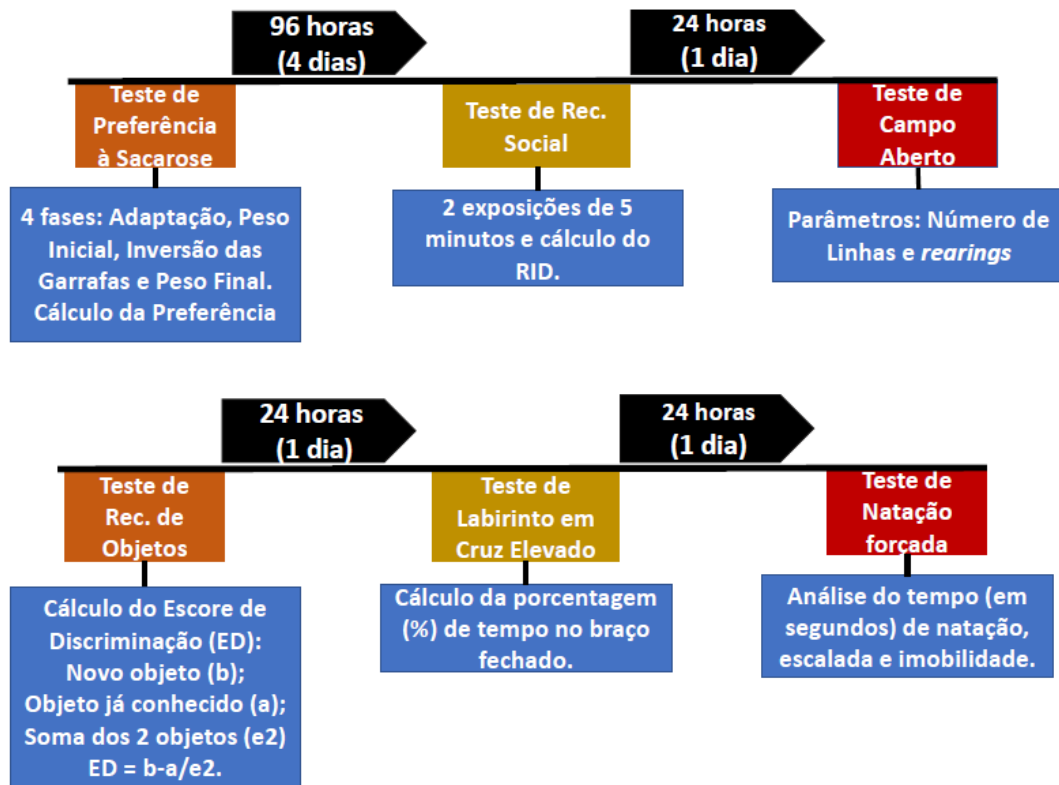


Figura 9- Sequência de testes comportamentais

Fonte: A autora

4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Após o período do tratamento (28 dias), os animais foram submetidos aos testes comportamentais que ocorreram na ordem citada nos próximos subitens e tiveram intervalo de 24 horas entre os mesmos.

4.3.1 Teste de Preferência à Sacarose

O primeiro teste a ser realizado foi o teste de preferência à sacarose, esse teste foi escolhido como medida de anedonia, que é a perda da capacidade de sentir prazer.

O teste foi constituído de quatro etapas, cada uma com duração de vinte e quatro horas. Inicialmente, os animais são isolados em uma caixa moradia com

acesso livre a ração e a dois bebedouros dispostos em lados opostos. Essa fase tem intuito de adaptar os animais nesse novo ambiente. Durante a segunda fase um bebedouro de água é substituído por uma solução de sacarose a 0,8% e o peso inicial de cada bebedouro é determinado. Na terceira fase os bebedouros são trocados de lado para evitar efeitos de perseverança. Na quarta e última fase, são determinados os pesos finais dos bebedouros. Após o decorrer dessas fases é calculado o índice de consumo que é definido de acordo com estudo realizado por Slaterry em 2007:

$$\% \text{ de preferência à sacarose} = \frac{\text{consumo de sacarose}}{\text{consumo total} \times 100}$$

4.3.2 Teste de Reconhecimento Social

O teste ocorreu 24 horas após o teste de preferência à sacarose, onde os ratos ainda estavam separados em cada caixa moradia, com livre acesso a água e ração. O teste foi realizado conforme descrito por Dantzer e colaboradores em 1987 e padronizado por Prediger e colaboradores em 2006.

O teste de reconhecimento social teve como objetivo a avaliação da memória de curta-duração. O teste é caracterizado por duas apresentações sucessivas entre um rato adulto e um rato jovem (1 mês). Cada exposição tem duração de 5 minutos e intervalo de 30 minutos.

Durante as apresentações, foi registrado o tempo que o rato adulto investiga o rato jovem (cheirar, lambar, aproximação). No final de cada apresentação, o rato jovem foi retirado da gaiola do rato adulto. Após o intervalo de 30 minutos, ocorreu a segunda exposição. Segundo Prediger e colaboradores, quando é utilizado um tempo inferior a 40 minutos, o animal é capaz de reconhecer o que foi apresentado para ele anteriormente, verificando-se uma diminuição do tempo de exploração na segunda exposição.

Para interpretação dos dados, os resultados foram expressos através da razão entre a segunda e a primeira exposição (Ratio of Investigation Duration - RID). Um menor valor da RID, significa um menor tempo de investigação e reflete a

capacidade de o animal lembrar do que foi apresentado para ele anteriormente. A ilustração da investigação do animal do teste investigando o rato jovem está disponível na Figura 10.



Figura 10- Ilustração da exploração durante o teste de reconhecimento social.

Fonte: A AUTORA

4.3.3 Teste de Campo Aberto

O teste ocorreu 24 horas após o teste de reconhecimento social. O teste de campo aberto tem como objetivo avaliar a capacidade exploratória do animal. Esse teste foi desenvolvido por Hall em 1934 e vem sendo amplamente utilizado até hoje. Para a realização do teste, o animal é posicionado no centro de uma arena de madeira (100 cm x 100 cm) com paredes de 30 cm de altura. O piso da caixa foi dividido em 25 quadrados (20 cm x 20 cm) longitudinais e transversais.

Os parâmetros avaliados no teste foram o número de linhas cruzadas com as patas traseiras e o número de atos de levantar, que é o apoio apenas pelas patas traseiras (rearing). O animal permaneceu nesse ambiente por cinco minutos e foi avaliado os parâmetros supracitados. A presença do animal na arena de madeira cruzando as linhas e realizando rearing está presente na figura 11.

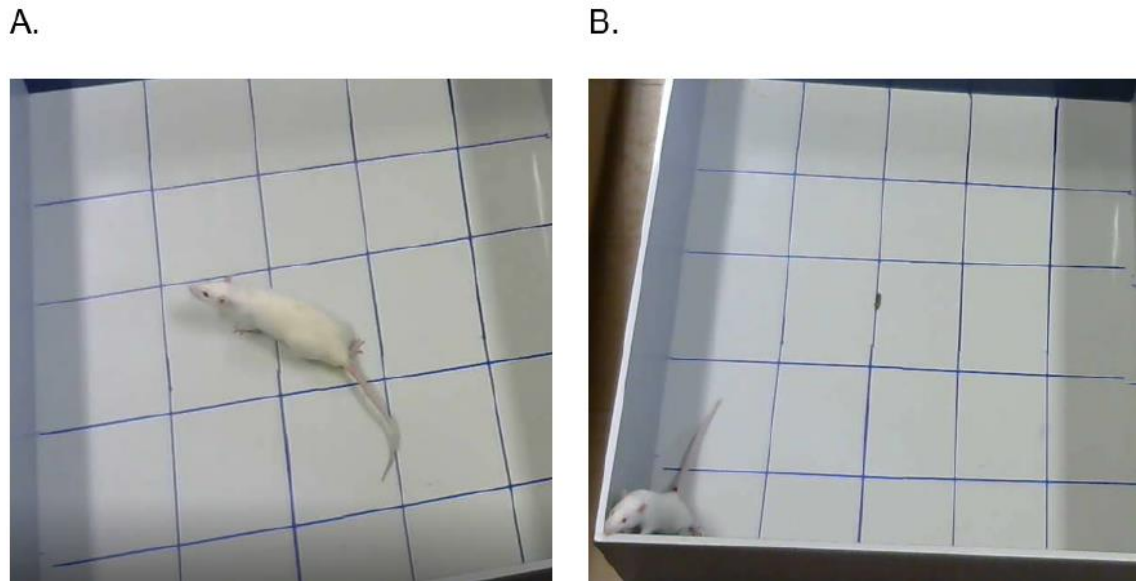


Figura 11 - Ilustração do teste de campo aberto

FONTE: A AUTORA

4.3.4 Teste de Reconhecimento de Objetos

Esse teste foi realizado 24 horas após o teste de campo aberto. O teste de reconhecimento de objetos foi adaptado a partir do trabalho realizado por ENNACEUR e DELACOUR em 1992 e posteriormente padronizado para PRICKAERTS em 2002. O objetivo desse teste no estudo é a avaliação a memória de reconhecimento desses animais.

Previamente ao teste, foi realizado uma adaptação dos animais no aparato do teste (caixa de madeira medindo 100 cm x 100 cm). Nessa adaptação, os animais permaneceram nesse local por cinco minutos, sem a presença de nenhum objeto. Após vinte e quatro horas de adaptação, ocorreu o teste propriamente dito e o mesmo se deu em duas etapas.

Na primeira etapa foram colocados dois objetos idênticos no aparato, cada objeto em um dos lados da caixa à uma distância de 10 centímetros das paredes do aparato. Os animais na situação descrita, permaneceram três minutos para investigar esses objetos. A investigação foi considerada quando o animal aproximou dois centímetros a narina do respectivo objeto. Após no máximo 40 minutos da primeira etapa, o animal foi recolocado no aparato, no entanto, um

dos objetos utilizados na primeira etapa foi substituído por outro e o animal novamente teve três minutos para investigação. A ilustração do animal exposto aos dois objetos em diferentes exposições está disposta na Figura 12.

A partir desses valores referentes ao tempo de investigação no segundo período do teste foi possível calcular o escore de discriminação (ED). O escore foi obtido a partir da mensuração do tempo gasto pelos animais na exploração do novo objeto (b), do tempo do objeto já conhecido (a), pelo tempo total de exploração desses dois objetos (e2), seguindo a fórmula:

$$ED = \frac{b-a}{e2}$$

A partir disso, espera-se que o animal que não tenha comprometimento na capacidade de reconhecimento, lembre-se do objeto que foi colocado na primeira exposição. Com isso, o tempo de exploração do novo objeto será maior que o tempo de exploração do objeto já conhecido.

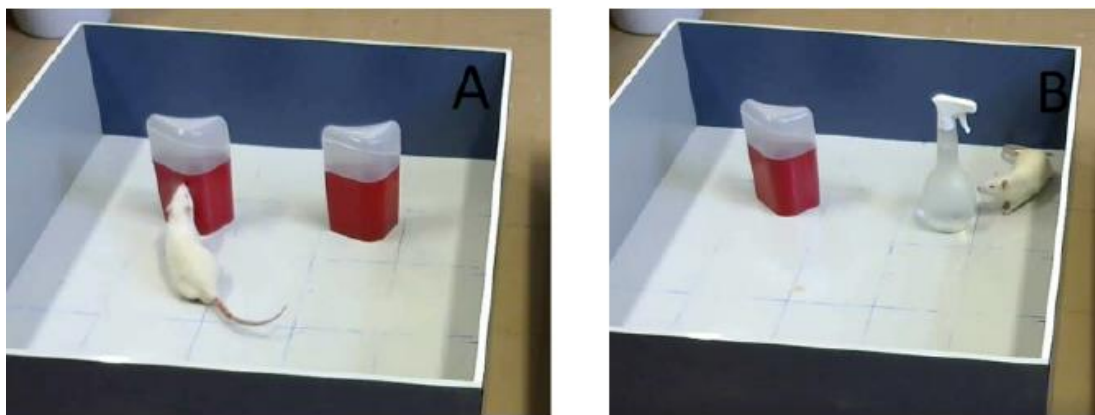


Figura 12 - Ilustração do teste de reconhecimento de objetos.

A. Primeira exposição, caracterizada pela presença de dois objetos iguais. B. Segunda exposição, mudança de um dos objetos.

FONTE: A AUTORA

4.3.5 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

O teste de labirinto em cruz foi realizado vinte e quatro horas após o teste de reconhecimento de objetos. Esse teste teve como objetivo avaliar a capacidade do

animal de explorar ambientes desconhecidos e evitar situações potencialmente perigosas. O modelo foi validado por Pellow e colaboradores em 1985 e ainda é um dos mais empregados como modelo de ansiedade.

Nesse teste, os animais são alocados em um aparato com dois braços abertos (30cm x 5cm x 0,25 cm), dois braços fechados (30cm x 5cm x 15 cm) e uma plataforma central (5cm x 5 cm), o aparato fica elevado ao chão (60cm) por meio de um suporte central. Como parâmetro, será utilizado a porcentagem (%) de tempo no braço fechado. A ilustração do animal no aparato do labirinto em cruz elevado está disposta na Figura 13.



Figura 13 - Ilustração do teste de labirinto em cruz elevado.

FONTE: A AUTORA

4.3.6 Teste de Natação Forçada Modificado

O teste ocorreu vinte e quatro horas após o teste de labirinto em cruz elevado. Esse teste tem o objetivo de avaliar sintomas do tipo depressivos e o

comportamento motor do animal. O teste utilizado foi modificado, originalmente descrito por PORSOLT e colaboradores (1978).

Para o desenvolvimento do teste, os animais foram colocados em um cilindro de plástico opaco (diâmetro: 20 cm, altura: 50 cm e contendo água até 30 cm na temperatura de $23 \pm 25^{\circ}\text{C}$). Esse teste se deu em duas etapas. No primeiro momento, ocorreu a sessão treino, onde os animais permaneceram nesse ambiente descrito por 15 minutos, para adaptação. Após vinte e quatro horas, ocorreu a sessão teste propriamente dita, nessa etapa foi posicionada uma câmera acima do cilindro para filmar o comportamento dos animais no teste, os animais permaneceram no ambiente descrito por cinco minutos. Após as sessões descritas, os animais foram secos e colocados em ambiente aquecido por duas horas antes de retornar a caixa moradia.

Foram avaliados três tipos de comportamentos na sessão teste, o tempo de natação, que é o tempo que o animal permanece realizando movimentos circulares no cilindro. O tempo de escalada, tempo em que o animal permanece realizando movimentos verticais com as patas dianteiras na parede do cilindro e o tempo de imobilidade onde o animal permanece flutuando na água, realizando apenas movimentos mínimos, a água de cada cilindro foi trocada entre cada animal. A ilustração do animal e os parâmetros avaliados no teste de natação forçada estão dispostos na Figura 14.

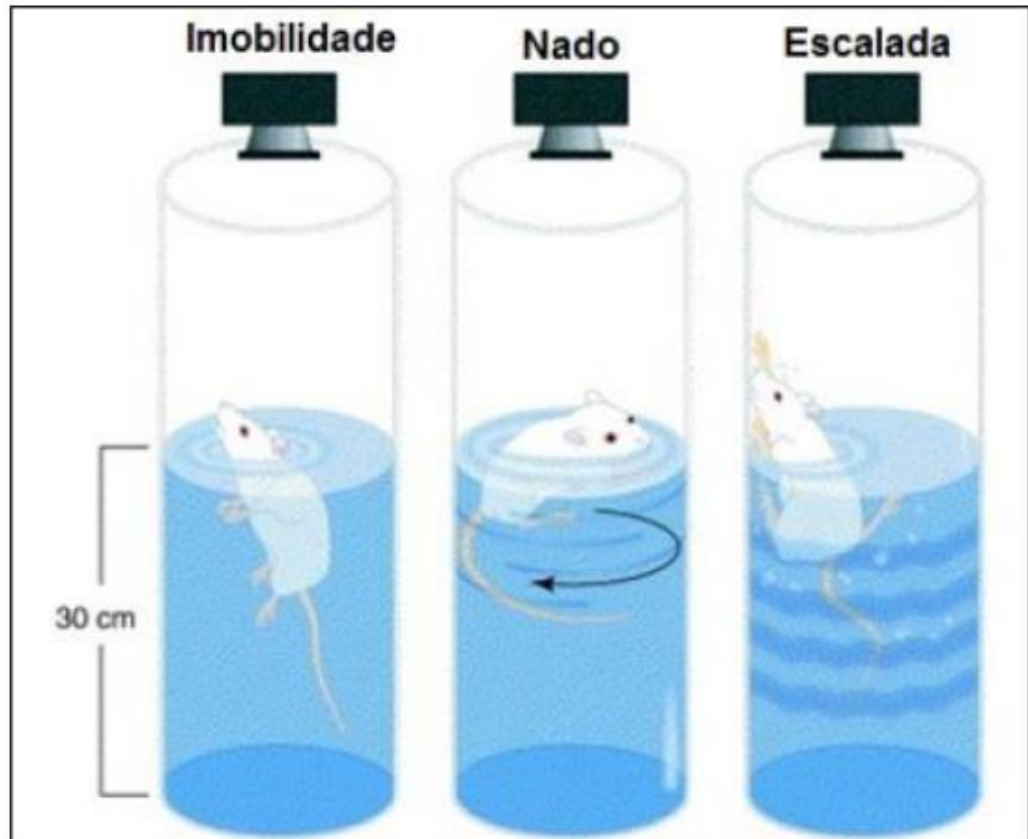


Figura 14 - Ilustração do teste de natação forçada modificada

FONTE: SLATERRY, MARKOU; CRYAN, 2007

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

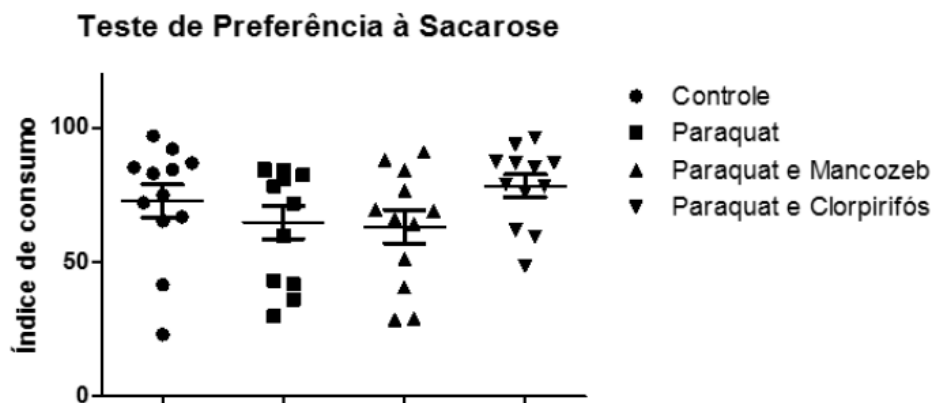
Os dados foram expressos através da média \pm erro padrão da média (EPM). Primeiramente, foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk* para verificar a normalidade dos dados, caso fossem paramétricos, era realizado a análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste *post-hoc* de *Tukey*. Caso os dados fossem não paramétricos, era realizado o teste de *Kruskall-Wallis* com *post-hoc* de *Dunns*. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico *GraphPad Prism 5.0.1*.

5. RESULTADOS

Os resultados a serem apresentados referem-se a análise das administrações dos pesticidas apresentados nesse estudo (item 4.2). Os dados a serem demonstrados foram após todo período de administração. Todos os testes comportamentais foram realizados com os 48 animais.

5.1 TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE

A partir do teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*, os dados foram considerados paramétricos. Posteriormente, foi realizado ANOVA de uma via, onde não foram encontradas diferenças significativamente estatísticas entre os grupos controle e os expostos ao Paraquat e as associações com Paraquat e Mancozeb [F (1,504 = 0,09302; p=0,2266)], os dados foram apresentados a partir porcentagem (%) de preferência à sacarose. Os resultados estão dispostos na Figura 15.



Fonte: A AUTORA

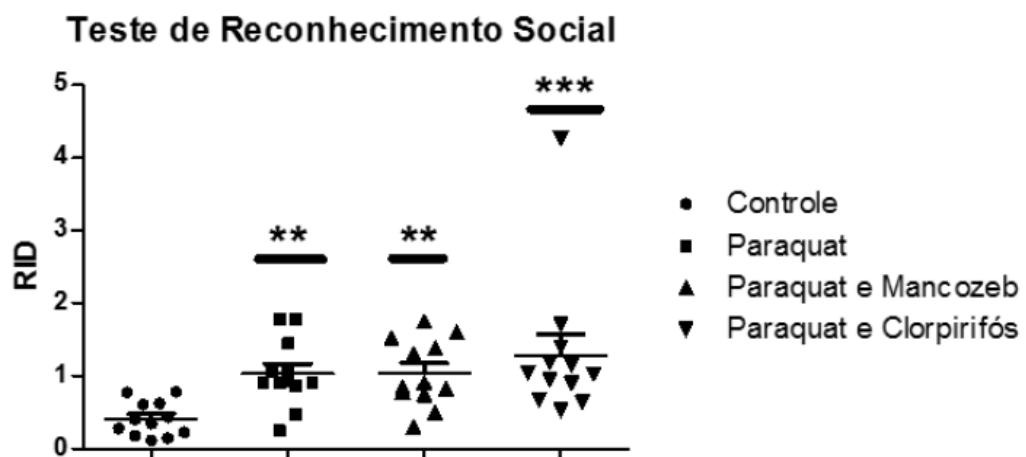
Figura 15- - Resultados referentes ao teste de preferência à sacarose.

Dados apresentado pela % de preferência à sacarose, que foi calculada pela seguinte fórmula: $\% \text{ de preferência à sacarose} = \frac{\text{consumo de sacarose}}{\text{consumo total} \times 100}$. O teste ocorreu após a última exposição ao Paraquat isoladamente ou as combinações com Mancozeb e Clorpirifós durante 4 semanas (28 dias). Grupo controle (N=12), Paraquat (N=12), Paraquat e Mancozeb (N=12) e Paraquat e Clorpirifós (N=12). Foi realizado teste de Shapiro-Wilk, os dados foram considerados paramétricos, dessa forma, a análise foi feita por ANOVA e não houve diferença estatística entre os grupos $p \geq 0,05$.

5.2 TESTE DE RECONHECIMENTO SOCIAL

Foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk*, os dados apresentaram-se não paramétricos. Posteriormente, foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis* onde foi verificado que os grupos tinham diferença estatística e posteriormente comparação múltipla de *Dunns*. Com isso, observamos que houve diferença significativamente estatística entre o grupo controle quando comparado ao grupo Paraquat ($p \leq 0,01$), Paraquat e Mancozeb ($p \leq 0,01$) e Paraquat e Clorpirifós ($p \leq 0,001$), porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações. Demonstrando dessa forma, que a exposição a esses agentes causa um pior déficit na memória social, porém, nenhuma associação realizada foi capaz de potencializar e/ou minimizar esse efeito.

Os dados foram apresentados de acordo com a razão entre as investigações (RID). O menor valor do RID reflete a capacidade de lembrar do que foi apresentado anteriormente. Os resultados do teste de Reconhecimento Social estão dispostos na Figura 16.



Fonte: A AUTORA

Figura 16 - Resultados referentes ao teste ao teste de reconhecimento social.

Dados apresentados de acordo com a razão entre as investigações 2o exposição (em segundos) dividida pelo tempo da 1o exposição. O teste ocorreu após vinte e quatro horas da última etapa do teste de preferência à sacarose. Os valores apresentados são dos grupos controle/água (N=12), Paraquat (N=12), Paraquat e Mancozeb (N=12) e Paraquat e Clorpirifós (N=12). Foi realizado *Kruskal-Wallis* e análise de *Dunns*. O grupo Paraquat, Paraquat e Mancozeb e Paraquat e Clorpirifós teve diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle (** $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$), respectivamente.

5.3 TESTE DE CAMPO ABERTO

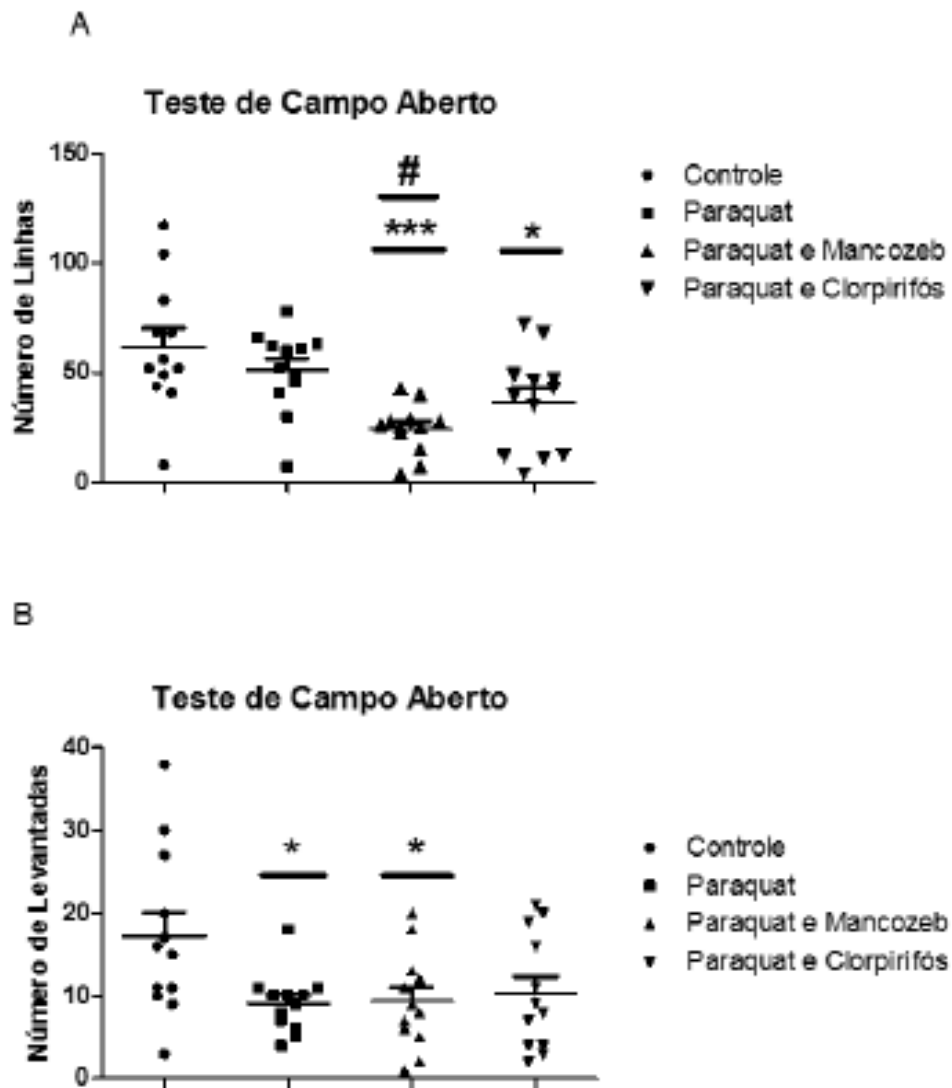
No teste de campo aberto foram avaliados o número de linhas cruzadas com as patas traseiras e o número de *rearings* que significa o ato de levantar, ou seja, apoio apenas pelas patas traseiras de cada animal. As análises desses parâmetros ocorreram durante os cinco minutos de teste.

Foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk*, os dados apresentaram-se paramétricos. Posteriormente, foi realizado ANOVA de uma via, onde foi encontrado diferença estatisticamente significativa no número de linhas e no ato de levantar [F(6,989) = 0,3227; p = 0,0355]; [F(3,662) = 0,1998; p = 0,0168], respectivamente. Para comparação entre os grupos, foi realizado post-hoc de *Tukey*.

Em relação ao número de linhas cruzadas, foi verificado que os animais do grupo Paraquat e Mancozeb ($p \leq 0,001$) e Paraquat e Clorpirifós ($p \leq 0,05$) tiveram menor de linhas cruzadas quando comparadas ao controle e ainda, o grupo Paraquat e Mancozeb ($p \leq 0,05$) teve diferença comparado ao grupo Paraquat.

No que se refere ao número de *rearings*, os animais expostos a administração de Paraquat ($p \leq 0,05$) e ao Paraquat e Mancozeb ($p \leq 0,05$) tiveram menor número quando comparada ao controle. Porém, o grupo Paraquat e Clorpirifós não teve diferença estatisticamente significativa e não houve diferença entre as associações. Esses resultados estão demonstrados na Figura 17.

Esses resultados apontam que a exposição ao Paraquat e as associações causaram déficits motores. E ainda, em relação ao número de linhas, a associação com o Mancozeb foi capaz de potencializar o efeito do Paraquat administrado isoladamente. No que se refere ao número *rearings*, os animais expostos ao Paraquat e Paraquat e Mancozeb tiveram menor número de atos de levantar, apontando déficit motor e comportamento do tipo ansiogênicos.



Fonte: A AUTORA

Figura 17- Resultados referente ao teste de campo aberto.

Imagem A faz referência a análise da quantidade de linhas percorridas e letra B ao número de rerings no teste de campo aberto. Os valores foram obtidos a partir do grupo Controle (N=12), Paraquat (N=12), Paraquat e Mancozeb (N=12) e Paraquat e Clorpirifós (N=12). Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do post-hoc de Tukey. Em relação ao número de linhas, o grupo Paraquat e Mancozeb e Paraquat e Clorpirifós teve diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle ($***p \leq 0,001$; $* p \leq 0,05$), respectivamente. Houve diferença também entre o Paraquat e Mancozeb quando comparada ao grupo Paraquat ($\#p \leq 0,05$) No que se refere ao número de rearings houve diferença estatística entre o grupo Paraquat e Paraquat e Mancozeb quando comparadas ao controle ($*p \leq 0,05$).

5.4 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

No teste de reconhecimento de objetos foi avaliado o escore de discriminação (ED) que é obtido a partir da mensuração do tempo gasto pelos animais na exploração do novo objeto (b), do tempo do objeto já conhecido (a), pelo tempo total de exploração desses dois objetos (e2), seguindo a fórmula: $ED = \frac{b-a}{e2}$.

Foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk*, os dados apresentaram-se paramétricos. Posteriormente, foi realizado ANOVA de uma via, onde foi encontrado diferença estatisticamente significativa [F (20,80) = 0,5867; p=0,010]. Para comparação entre os grupos, foi realizado post-hoc de *Tukey*. Com isso, foi verificado que os animais do grupo Paraquat (p≤ 0,001), Paraquat e Mancozeb (p≤ 0,001) e Paraquat e Clorpirifós (p≤0,001) tiveram menor escore de discriminação quando comparado ao grupo controle. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações. Esses resultados estão discriminados na Figura 18. Esses resultados demonstram que a exposição ao Paraquat e as associações causaram déficits no escore de discriminação, demonstrando que, esses animais tiveram pior desempenho em reconhecer o objeto familiar do objeto novo, ou seja, pior escore cognitivo e de aprendizado desses animais.

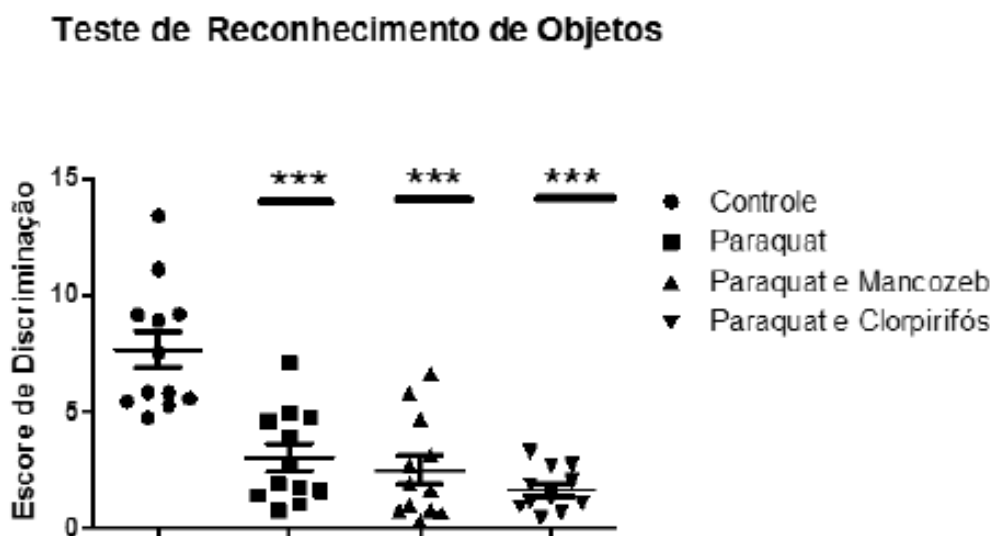


Figura 18- Resultados referentes ao teste de Reconhecimento de Objetos.

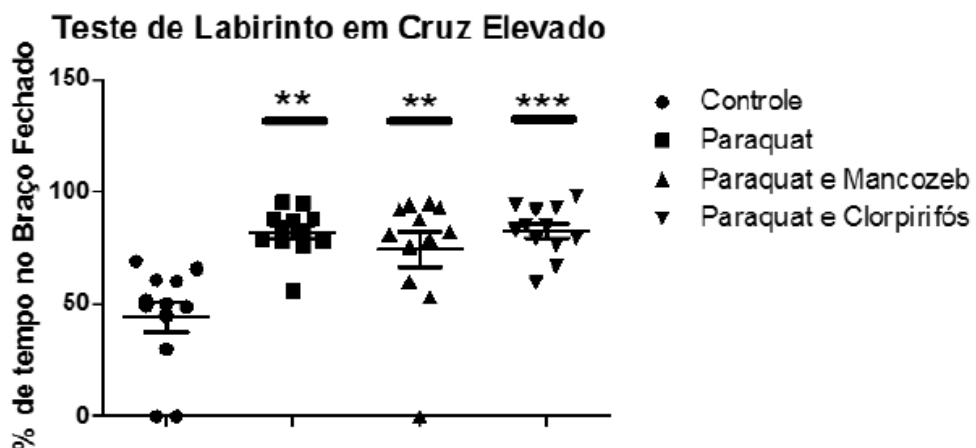
Resultados expressos a partir do escore de discriminação. Os valores foram obtidos a partir do grupo Controle (N=12), Paraquat (N=12), Paraquat e Mancozeb (N=12) e Paraquat e Clorpirifós (N=12). Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do post-hoc de Tukey. Podemos observar que, o grupo Paraquat, Paraquat e Mancozeb e Paraquat e Clorpirifós teve diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle (** $p \leq 0,001$). No entanto, não houve diferença entre as associações.

5.5 TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O parâmetro avaliado foi a porcentagem de tempo no braço fechado durante os 5 minutos (300 segundos) de teste. Para essa análise, foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk*, os dados apresentaram-se não paramétricos. Posteriormente, foi realizado o teste de *Kruskal- Wallis* onde foi verificado que os grupos tinham diferença estatística e posteriormente comparação múltipla de *Dunns*.

Foi verificado que os animais do grupo Paraquat ($p \leq 0,01$), Paraquat e Mancozeb ($p \leq 0,01$) e Paraquat e Clorpirifós ($p \leq 0,001$) tiveram maior tempo em porcentagem no braço fechado quando comparado ao controle. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações.

Esses resultados demonstram que a exposição ao Paraquat e as associações causaram o desenvolvimento de sinais do tipo ansiogênicos, no entanto, nenhuma associação foi capaz de minimizar ou potencializar esses efeitos. Esses resultados descritos estão ilustrados na Figura 19.



Fonte: A AUTORA.

Figura 19- Resultados referentes ao teste de labirinto em cruz elevado.

Resultados demonstrados pela porcentagem de tempo no braço fechado. Os valores foram obtidos a partir do grupo Controle (N=12), Paraquat (N=12), Paraquat e Mancozeb (N=12) e

Paraquat e Clorpirifós (N=12). Os dados foram analisados através da *Kruskal-Wallis* e comparação múltipla de *Dunns* *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$.

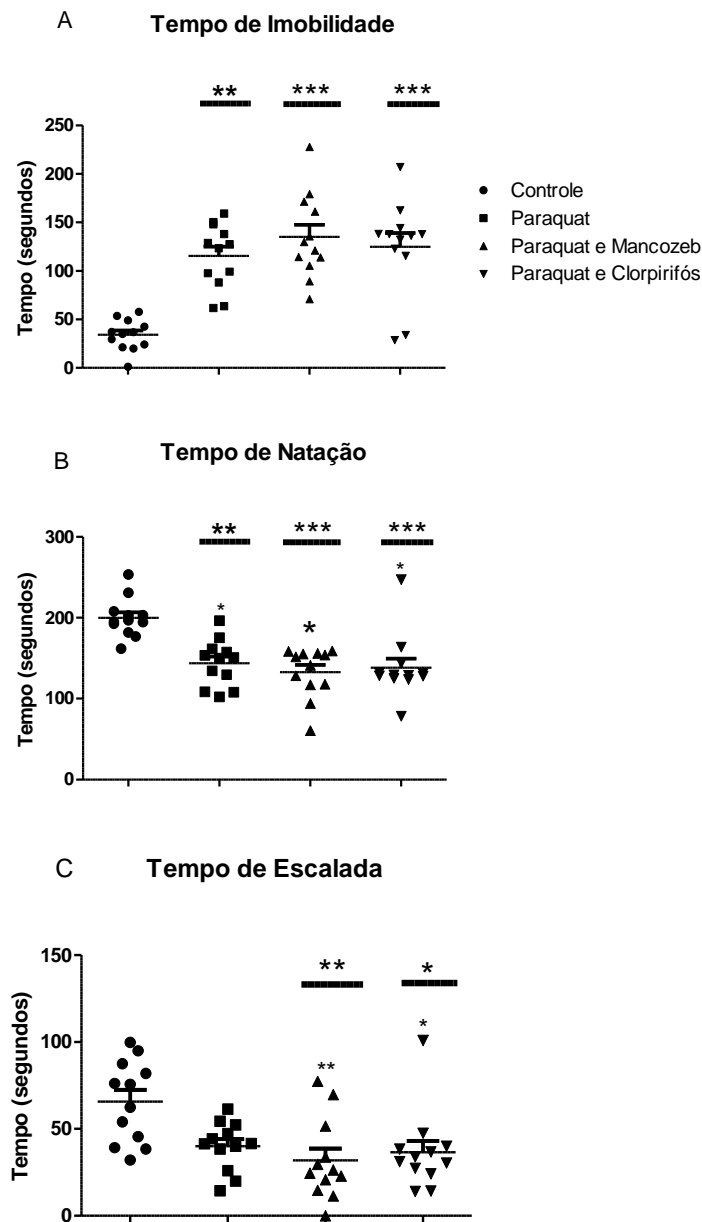
5.6 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

Para análise dos resultados, foi contabilizado o tempo de imobilidade, natação e escalada em segundos. Em relação a interpretação dos parâmetros, o maior tempo de imobilidade é preditivo de sinais do tipo depressivo, enquanto o tempo de natação faz referência a aspecto motor. No entanto, é necessário relacionar com outros testes como o campo aberto para diferenciar se é resultado de um aspecto depressor e/ou motor. O tempo de escalada se refere ao sistema noradrenérgico e a sinais do tipo ansiogênicos. As análises desses parâmetros ocorreram durante os cinco minutos da sessão teste.

Foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk*, os dados apresentaram-se não paramétricos. A partir disso, foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis* onde foi verificado que os grupos tinham diferença estatística e posteriormente comparação múltipla de *Dunns*.

Em relação ao tempo de imobilidade, o grupo Paraquat ($p \leq 0,01$), Paraquat e Mancozeb ($p \leq 0,001$) e Paraquat e Clorpirifós ($p \leq 0,001$) tiveram maior tempo quando comparado ao grupo controle, porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações. No que se refere ao tempo de natação, o grupo Paraquat ($p \leq 0,01$), Paraquat e Mancozeb ($p \leq 0,001$) e Paraquat e Clorpirifós ($p \leq 0,001$) tiveram menor tempo de natação quando comparado ao grupo controle, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações. E ainda, no tempo de escalada, o grupo Paraquat e Mancozeb ($p \leq 0,01$) e Paraquat e Clorpirifós ($p \leq 0,05$) tiveram menor tempo de escalada quando comparada ao grupo controle. O grupo Paraquat não teve diferença estatisticamente significativa e não houve diferença entre as associações. Esses resultados estão demonstrados na Figura 20.

Esses resultados demonstram que o Paraquat e as associações foram capazes de causar sinais do tipo depressivos, que pode ser observado pelo maior tempo de imobilidade e menor tempo de natação quando comparado ao controle.



Fonte: A AUTORA.

Figura 20- Resultados referentes ao teste de natação forçada.

A figura A faz referência ao tempo de imobilidade, figura B ao tempo de natação e figura C ao tempo de escalada. Os valores foram obtidos a partir do grupo controle/água (N=12), Paraquat (N=12), Paraquat e Mancozeb (N=12) e Paraquat e Clorpirifós (N=12). Foi realizado *Kruskal-Wallis* e análise de *Dunns*. Em relação ao tempo de imobilidade, o grupo Paraquat, Paraquat e Mancozeb e Paraquat e Clorpirifós tiveram diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$), respectivamente. No que se refere ao tempo de natação, o grupo Paraquat, Paraquat e Mancozeb e Paraquat e Clorpirifós tiveram diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). No que se condiz ao tempo de escalada, o grupo Paraquat e Mancozeb e Paraquat e Clorpirifós tiveram diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle (** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Dentre os resultados obtidos, foi demonstrado um prejuízo na memória social, avaliada pelo teste de reconhecimento social, isso pode ser observado pelo maior RID, que reflete que o animal tem um prejuízo em lembrar o que foi apresentado para ele anteriormente (rato jovem). Lembrando que o RID é a razão entre as identificações, então, quanto menor o RID, maior a capacidade em lembrar o que foi apresentado. Os animais expostos ao PQ e combinações apresentaram maior RID quando comparado ao controle, no entanto, nenhuma associação foi capaz de potencializar e/ou minimizar esse efeito.

Além disso, houve prejuízo na memória declarativa que pode ser observada pelo teste de reconhecimento de objetos. Esse teste tem como parâmetro de avaliação o escore de discriminação, quanto maior esse escore, melhor é a capacidade em lembrar do objeto que foi apresentado anteriormente. Os grupos expostos ao PQ e associações, tiveram um menor ED quando comparados ao controle, ou seja, tiveram dificuldade em reconhecer o objeto que foi apresentado anteriormente. No entanto, nenhuma associação foi capaz de minimizar e/ou potencializar esse efeito.

Esse efeito observado nos testes de memória pode estar envolvido com o hipocampo. O PQ causa déficits na memória e aprendizado, no entanto, o mecanismo desse efeito é incerto, uma das hipóteses é que exista o envolvimento do hipocampo que é uma das regiões responsáveis pela memória e aprendizado. Um estudo realizado por PINO em 2017 demonstrou que a exposição ao Paraquat causou alteração na transmissão colinérgica e glutamatérgica e ainda, perda neuronal no hipocampo. Outro estudo realizado em 2017 foi o de LI que teve como objetivo conhecer a via que causa essas alterações na memória. Nesse estudo foi verificado que as administrações de PQ na dose de 1,25 mg/kg por via intraperitoneal em ratos causaram inibição da proliferação de células progenitoras alterando a formação de novas células no hipocampo, prejudicando dessa forma a neurogênese nessa região.

Além disso, um estudo realizado por LI em 2016 avaliou os efeitos da exposição do PQ e Maneb (MB) na dose 10 e 15 mg/kg, respectivamente, por via

oral (gavagem). A administração ocorria duas vezes na semana nas ratas prenhas, porém, foram avaliados a prole destas ratas. Nesse estudo foi verificada diferenças morfológicas nos neurônios do hipocampo, tendo como mecanismo a via cAMP-PKA-CREB. A combinação de PQ +MB faz com que cAMP reduza a produção de PKA o que reduz a fosforilação do CREB que inibe também a ativação do BDNF, c-jun e c-fos. Porém, existem outros mecanismos propostos, um estudo realizado por CHAN em 2010 afirmou que o PQ exerce influência no hipocampo dos camundongos, tendo como mecanismo a lesão mitocondrial induzido por estresse oxidativo.

Além dos déficits de memória, foi demonstrado no nosso estudo que a administração do Paraquat e das associações causaram sinais do tipo ansiogênicos, isso pode ser observado pelo teste de labirinto em cruz elevado. Nesse teste, o animal é colocado no aparato durante cinco minutos, para análise do comportamento é utilizado a porcentagem de tempo no braço fechado. A maior permanência do animal no braço fechado, caracteriza um sinal do tipo ansiogênico, pois, em condições fisiológicas o animal explora todas as regiões do aparato e ainda tem preferência pelo braço aberto. Como resultado, os animais do nosso estudo tiveram maior % de tempo no braço fechado quando comparados ao controle, o que caracteriza um sinal do tipo ansiogênico.

Foi manifestado também nos animais presentes no nosso estudo, sinais do tipo depressivos, isso pode ser analisado no teste de natação forçada. Durante o teste, é contabilizado o tempo de natação, escalada e imobilidade, sendo este último preditivo de sinais do tipo depressivos, pois, o tempo de imobilidade é caracterizado pela realização de movimentos mínimos do animal, quando o animal se movimenta apenas para garantir a sobrevivência. Em condições fisiológicas, o animal passa maior tempo realizando natação ou escalada, que são os movimentos de e fuga da situação aversiva que o teste proporciona, no entanto, os animais expostos ao PQ e associações apresentaram maior tempo de imobilidade quando comparados ao controle, o que caracteriza um sinal do tipo depressivo.

Além das alterações comportamentais citadas anteriormente, foi manifestado também alterações motoras que foi evidenciada pelo teste de Campo Aberto. A análise do padrão motor do animal é dada pelo número de

linhas cruzadas durante os cinco minutos de teste. O animal que é colocado no campo aberto, em condições normais, tem o instinto de explorar o ambiente novo. No entanto, o animal que tem comprometimento motor, não explora tanto esse ambiente. Os animais que foram expostos a associação com MZ e CPF apresentaram esse comprometimento, observado pelo menor número de linhas cruzadas quando comparados ao controle.

Além disso, o grupo PQ e MZ apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo PQ, ou seja, a associação com MZ foi capaz de potencializar o efeito do PQ. Esse achado corrobora com o estudo realizado por MANNING-BOG (2002) onde foi verificado que o Maneb parece interagir de forma sinérgica com o PQ. Isso ocorre devido a um aumento na concentração do Maneb devido a redução do clearance do PQ (DUTY; JENNER, 2011).

No que se refere às toxinas, foi realizado um estudo por QIU em 2017 que avaliou o impacto da exposição do CPF em peixes (*Oryzias Latipes*) a exposição durou 3 semanas e o agente tóxico ficou no aquário na dose de 0,024 mg/ml. Como resultado, eles encontraram que a exposição causou prejuízo na locomoção no 7º dia e a manifestação dos sinais do tipo ansiogênicos ocorreu no 4º dia.

Um estudo realizado por SILVA em 2017 avaliou os efeitos na prole da exposição gestacional ao CPF nas doses de 0,01, 0,1 e 1 mg/kg diariamente por via oral e foi verificado que a prole apresentou sinais do tipo ansiogênicos, porém, não do tipo depressivos ou motores. Sugere-se que além da causa ser pela hiperexcitabilidade muscarínica ocorra alteração no hipocampo e que os outros sintomas do tipo depressivos e motores não foram observados devido a neuroplasticidade.

Ademais, outra pesquisa corrobora com os achados do nosso estudo, uma pesquisa realizada por SANCHEZ em 2001 demonstra que injeções por via subcutânea (SC) de diferentes doses de CPF são capazes de induzir sinais do tipo ansiogênicos demonstrados no teste de labirinto em cruz elevado. Além disso, quando expostos a doses de 10mg/kg apresentaram maior tempo de imobilidade no teste de natação forçada.

Em relação ao PQ isoladamente, foi realizado um estudo por CZERNICZYNIC em 2011 que avaliou em ratos o efeito da exposição de PQ na dose de 10 mg/kg semanalmente durante um mês por via IP. Nesse estudo foi manifestado comportamentos do tipo ansiogênicos, depressivos e motores e estes, foram associados a disfunção mitocondrial, aumento de espécies reativas à oxigênio que ativa uma cascata de neurodegeneração.

No que se refere a exposição associada do PQ e MB, um estudo realizado por TINAKOUA em 2015 avaliou a exposição da administração de PQ e MB nas doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente. Com isso foi verificado que os animais submetidos a essa exposição apresentaram sinais do tipo ansiogênicos no labirinto em cruz elevado, do tipo depressivos no teste de natação forçada e comprometimento motor, observados pelo menor número de linhas cruzadas no teste de campo aberto. Esse achado foi associado com morte de neurônios dopaminérgicos no estriado e mudanças neuronais no núcleo subtalâmico.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a exposição combinada do PQ e MB representa um risco ainda maior para o desenvolvimento da DP, quando comparados a administração desses compostos isoladamente. O PQ atravessa a barreira hematoencefálica e afeta neurônios dopaminérgicos e de forma similar, o MB também causa morte desses neurônios.

Ademais, foi verificado em um estudo realizado por LIYAN em 2017 que o PQ associado com o MB por via IP na dose de 10 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente, causa degeneração de neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus e essa região precede a perda dopaminérgica, sendo responsável pela manifestação de sintomas não motores. Além desse mecanismo, a exposição a toxinas pode implicar em um perfil de inflamação crônica, causando uma neuroinflamação com ativação da micróglia e isso, libera fatores inflamatórios que causam neurodegeneração dopaminérgica. Além disso, o PQ e o MB ativam NADPH e conseqüentemente, ocorre a formação de ROS que amplifica a resposta neuroinflamatória resultando em maior dano neuronal sendo o NADPH o responsável por manter esse processo ativo.

Além do PQ atravessar a barreira hematoencefálica por transportadores de aminoácidos, ter preferência por células da via nigroestriatal, inibir o complexo I

da cadeia mitocondrial, entrar no ciclo redox e produzir superóxido, um estudo realizado por KUMAR em 2016 demonstrou que a exposição a associação de PQ e MB na dose de 10 e 30 mg/kg respectivamente foi capaz de causar a formação de agregados de α -sinucleína nos animais expostos e sabe-se que essa proteína está presente em algumas doenças neurodegenerativas. O primeiro mecanismo proposto é a alteração do ubiquitina proteassoma, quando este está modificado, ocorre predisposição a formação de agregados de proteínas, formando então, estes agregados em neurônios dopaminérgicos.

Um estudo realizado com outro modelo, por MARTIN em 2014 verificou a exposição em *Drosophilla* de PQ e MB em associação e isolados por via IP. Como resultado, foi verificado a perda de neurônios dopaminérgicos após 6 semanas de exposição, no entanto, apenas na associação, a exposição isolada não causou esse efeito. O mecanismo proposto é que o PQ + MB causam a inibição da E1 da ubiquitina-proteassoma, gerando estresse oxidativo.

Normalmente, os indivíduos estão expostos a diversos pesticidas, isso se deve a necessidade de combate a diversos tipos de pragas na lavoura. Uma pesquisa realizada pela PARA verificou que de 2013 a 2015, 58% apresentavam resíduos de pesticidas e que dentro desse número, 38,3% estavam dentro do limite máximo e 3% estavam acima do limite máximo. Além disso, foi verificado que 18,3% apresentavam resíduos de pesticidas não autorizados para aquela cultura. Ademais, algumas amostras apresentaram vários resíduos simultâneos, 1% da amostra apresentava 10 ingredientes ativos diferentes. Ou seja, naquela amostra tinha vários pesticidas com mecanismos semelhantes ou diferentes que poderia causar a potencialização da toxicidade exercida sobre o organismo (ANVISA,2016).

Com base na exposição simultânea a diversos pesticidas, foi realizado um estudo por SU em 2015 que avalia a exposição a PQ, MZ e CPF na dose de 10, 30 e 3 mg/kg, respectivamente por via IP duas vezes na semana durante 4 semanas. Nesse estudo, as exposições não geraram a formação de agregados de α -sinucleína. Na associação com o CPF houve também aumento de outros parâmetros, o que demonstrou que a associação deste foi mais prejudicial do que o PQ isolado ou associado com o MB.

Os resultados deste estudo são comportamentais e demonstram a presença de alguns sinais, no entanto, se fazem necessário análises bioquímicas para averiguar se as alterações comportamentais manifestadas nesse estudo são devido a alterações a nível de SNC e caso seja, se seriam manifestações semelhantes as observadas na DP ou a manifestações presentes no escopo dos sintomas relacionados a exposição.

Essas vias propostas nos estudos citados anteriormente são invasivas, sendo normalmente IP o até mesmo IC e não se relaciona com a forma de exposição do morador e/ou trabalhador da zona rural que normalmente são por via cutânea ou oral.

Nosso trabalho buscou verificar a interação da exposição oral (gavagem) com o desenvolvimento de alterações comportamentais, buscando mimetizar a exposição do trabalhador/morador da zona rural. Os estudos epidemiológicos relacionam a exposição dos pesticidas com DP, demonstrando que pode existir algum mecanismo que ligue esses os pesticidas com alterações comportamentais, no entanto, quando as administrações são realizadas por vias invasivas não há como provar essa relação.

Nosso estudo encontrou alterações comportamentais que podem ter como via de indução os mecanismos aqui citados, no entanto, é necessário avaliação bioquímica para compreender os mecanismos de indução dessas alterações comportamentais.

7. CONCLUSÃO

Com o presente estudo, pode-se notar que a exposição ao Paraquat e associações com o Mancozeb e Clorpirifós foi capaz de causar déficits na memória social e declarativa, sinais ansiogênicos e do tipo depressivos além de comprometimento motor. Esses achados corroboram com alguns estudos presentes na literatura. No entanto, se faz necessário análises bioquímicas para compreender a via e a etiologia dessas alterações.

8. REFERÊNCIAS

- ABREU-VILLACA, Y.; LEVIN, E. D. Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. **Environment international Elsevier**, v. 99, p. 55–77, 2017.
- ADAPAR. Emzeb 800 wp. **Agencia de Defesa Agropecuaria do Parana**, www.adapar.pr.gov.br, 2017.
- AGROFIT. Informacao de registro de agrotóxicos. **Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento**, agrofit.agricultura.gov.br, 2016.
- ALDRIDGE, J. E. et al. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environmental health perspectives*, **National Institute of Environmental Health Science**, v. 113, n. 5, p. 527, 2005.
- ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (para): Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**, portal.anvisa.gov.br, 2016.
- ARBO, M. et al. Efeito tóxico dos praguicidas maneb e paraquat sobre a atividade da enzima antioxidante catalase em ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 57–61, 2009.
- ASPELIN, A. L. Pesticide usage in the united states: Trends during the 20th century. **CIPM Technical Bulletin**, Center for Integrated Pest Management Raleigh, NC, v. 105, 2003.
- BALTAZAR, M. T. et al. Pesticides exposure as etiological factors of parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—a mechanistic approach. **Toxicology letters**, Elsevier, v. 230, n. 2, p. 85–103, 2014.
- CALVIELLO, G. et al. Dna damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. **Toxicology and applied pharmacology**, Elsevier, v. 211, n. 2, p. 87–96, 2006.
- CAVALCANTI, L. P. A. et al. Intoxicação por organofosforados: Tratamento e metodologias analíticas empregadas na avaliação da reativação e inibição da acetilcolinesterase. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 739–766, 2016.
- CAVALIERE, M. J. et al. Organophosphate myotoxicity. **Revista de saúde publica, SciELO Brasil**, v. 30, n. 3, p. 267–272, 1996.
- CENTRO. Dados e fatos sobre o Paraquat. **Centro de informações sobre o Paraquat**, paraquat.com, 2013.
- CHEN, Q. et al. The toxic influence of paraquat on hippocampus of mice: involvement of oxidative stress. **Neurotoxicology, Elsevier**, v. 31, n. 3, p. 310–316, 2010.

CZERNICZYNIEC, A. et al. Paraquat induces behavioral changes and cortical and striatal mitochondrial dysfunction. **Free Radical Biology and Medicine, Elsevier**, v. 51, n. 7, p. 1428–1436, 2011.

DANTZER, R. et al. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology, Springer**, v. 91, n. 3, p. 363–368, 1987.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British journal of pharmacology, Wiley Online Library**, v. 164, n. 4, p. 1357–1391, 2011.

ENNACEUR, A.; MELIANI, K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. iii. spatial vs. non-spatial working memory. **Behavioural brain research, Elsevier**, v. 51, n. 1, p. 83–92, 1992.

FRAGOSO, D. B. et al. Ação de inseticidas organofosforados utilizados no controle de leucoptera coffeella (guérin-mèneville)(lepidoptera: Lyonetiidae) sobre o ácaro predador iphiseiodes zuluagai denmark & muma (acari: Phytoseiidae). Neotropical entomology, **Sci-ELO Brasil**, v. 31, n. 3, p. 463–467, 2002.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecologia australis**, v. 14, n. 1, p. 282–298, 2010.

GANGEMI, S. et al. Occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for the development of chronic diseases in humans. **Molecular medicine reports Spandidos Publications**, v. 14, n. 5, p. 4475–4488, 2016.

GAZZONI, D. Segurança dos alimentos. **Conselho Científico para Agricultura Sustentavel**, www.agriculturasustentavel.org.br, 2017.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. i. defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative psychology, Williams & Wilkins Company**, v. 18, n. 3, p. 385, 1934.

HASHIM, Z. Environmental exposure of organophosphate pesticides mixtures and neurodevelopment of primary school children in tanjung karang, malaysia. **Asia Pacific Environmental and Occupational Health Journal**, v. 1, n. 1, 2015.

HOFFMAN, L.; TROMBETTA, L.; HARDEJ, D. Ethylene bisdithiocarbamate pesticides maneb and mancozeb cause metal overload in human colon cells. **Environmental toxicology and pharmacology, Elsevier**, v. 41, p. 78–88, 2016.

HOU, L. et al. Paraquat and maneb co-exposure induces noradrenergic locus coeruleus neurodegeneration through nadph oxidase-mediated microglial activation. **Toxicology, Elsevier**, v. 380, p. 1–10, 2017.

IBAMA. Relatorios de comercializacao de agrototoxicos. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renovaveis**, www.ibama.gov.br, 2013.

KUMAR, A. et al. Formation and implications of alpha-synuclein radical in maneb- and paraquat-induced models of parkinson's disease. **Molecular neurobiology**, Springer, v. 53, n. 5, p. 2983–2994, 2016.

LI, B. et al. Developmental exposure to paraquat and maneb can impair cognition, learning and memory in sprague-dawley rats. **Molecular BioSystems**, Royal Society of Chemistry, v. 12, n. 10, p. 3088–3097, 2016.

LI, K. et al. The toxic influence of paraquat on hippocampal neurogenesis in adult mice. **Food and Chemical Toxicology**, Elsevier, 2017.

LIU, Y. et al. Protective effects of resveratrol against mancozeb induced apoptosis damage in mouse oocytes. **Oncotarget**, Impact Journals, LLC, v. 8, n. 4, p. 6233, 2017.

MANNING-BOG, A. B. et al. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of α -synuclein in mice: paraquat and α -synuclein. **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 277, n. 3, p. 1641–1644, 2002.

MARTIN, C. A. et al. Synergistic effects on dopamine cell death in a drosophila model of chronic toxin exposure. **Neurotoxicology**, Elsevier, v. 44, p. 344–351, 2014.

MARTINS, T. Herbicida paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 175–186, 2013.

MEYER, A. Pode a exposição humana ao inseticida clorpirifós alterar o desenvolvimento do sistema nervoso central? Contribuições de experimentos em animais. **Tese (Doutorado)**, 2005.

MOHANDAS, G. et al. Whey protein isolate enrichment attenuates manganese-induced oxidative stress and neurotoxicity in drosophila melanogaster: Relevance to parkinson's disease. **Biomedicine & pharmacotherapy= Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 95, p. 1596, 2017.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of toxicology**, Springer, v. 91, n. 2, p. 549–599, 2017.

MUTHUKUMARAN, K.; LAFRAMBOISE, A. J.; PANDEY, S. Herbicides and the risk of neurodegenerative disease. In: **Herbicides-Mechanisms and Mode of Action**. [S.l.]: InTech, 2011.

OGA, S. e. a. Praguicidas. in: Oga, s. fundamentos de toxicologia. **Atheneu Editora**, v. 2, p. 437–458, 2003.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods, Elsevier**, v.14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: **É veneno ou é remédio: agrotóxicos, saúde e ambiente**. [S.l.]: Fiocruz, 2003. p. 21–41.

PERON, A. P. et al. Ação tóxica do herbicida paraquat sobre o homem. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 7, n. 3, 2003.

PIMENTEL, D. Green revolution agriculture and chemical hazards. **Science of the total environment, Elsevier**, v. 188, p. S86–S98, 1996.

PINO, J. D. et al. Primary hippocampal neuronal cell death induction after acute and repeated paraquat exposures mediated by ache variants alteration and cholinergic and glutamatergic transmission disruption. **Toxicology, Elsevier**, v. 390, p. 88–99, 2017.

PIROZZI, A. V. A. et al. Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human hepg2 cell model. **Toxicology letters, Elsevier**, v. 249, p. 1–4, 2016.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European journal of pharmacology, Elsevier**, v. 47, n. 4, p. 379–391, 1978.

PREDIGER, R. D. et al. The risk is in the air: Intranasal administration of mptp to rats reproducing clinical features of parkinson's disease. **Experimental neurology, Elsevier**, v. 202, n. 2, p. 391–403, 2006.

PRICKAERTS, J. et al. cgmp, but not camp, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. **European journal of pharmacology, Elsevier**, v. 436, n. 1, p. 83–87, 2002.

QIU, X. et al. Short-term and persistent impacts on behaviors related to locomotion, anxiety, and startle responses of japanese medaka (*oryzias latipes*) induced by acute, sublethal exposure to chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology, Elsevier**, v. 192, p. 148–154, 2017.

QUATRIN, G. D. et al. Validação analítica para determinação de clorpirifós e avaliação da eficiência do sistema biobed brasil. **Universidade Federal de Santa Maria**, 2016.

RANGEL, C. d. F.; SARCINELLI, P. d. N.; ROSA, A. C. S. Uso de agrotóxicos e suas implicações na exposição ocupacional e contaminação ambiental. **Cad. saúde colet.**,(RioJ.), 2011.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, 2009.

RIBEIRO, F. de C. et al. Associação de fungicida protetor com fungicidas sistêmicos no controle de mancha-alvo na cultura da soja. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 5, p. 51–56, 2016.

RODNITZKY, R. L.; LEVIN, H. S.; MICK, D. L. Occupational exposure to organophosphate pesticides: a neurobehavioral study. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, Taylor & Francis, v. 30, n. 2, p. 98–103, 1975.

RODRIGUES, M. A. T. Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo frac. **Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP- Campus de Botucatu**, 2006.

SÁNCHEZ-AMATE, M.; FLORES, P.; SANCHEZ-SANTED, F. Effects of chlorpyrifos in the plus-maze model of anxiety. **Behavioural pharmacology, LWW**, v. 12, n. 4, p. 285–292, 2001.

SANTÉ, A. mondiale de la. Programme international sur la sécurité des substances chimiques. **Organisation mondiale de la Santé**, 1992.

SCARIOT, F. J. Efeito dos fungicidas mancozeb, captan e dithianon sobre *Saccharomyces cerevisiae*. 2017. **Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul**, 2016

SCHMITT, G. C. et al. Aspectos gerais e diagnóstico clinicolaboratorial da intoxicação por paraquat. *J. bras. patol. med. lab*, **SciELO Brasil**, v. 42, n. 4, p. 235–243, 2006.

SERRA, A.; DOMINGOS, F.; PRATA, M. M. Paraquat intoxication. **Acta médica portuguesa**, v. 16, n. 1, p. 25–32, 2003.

SESA. Protocolo de avaliação das intoxicações crônicas por agrotóxicos. **SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ**, www.saude.pr.gov.br, 2013.

SHIMIZU, K. et al. Carrier-mediated processes in blood–brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. **Brain research, Elsevier**, v. 906, n. 1, p. 135–142, 2001.

SILVA, J. G. et al. Chlorpyrifos induces anxiety-like behavior in offspring rats exposed during pregnancy. **Neuroscience Letters, Elsevier**, v. 641, p. 94–100, 2017.

SIQUEIRA, S. L. d.; KRUSE, M. H. L. Agrochemicals and human health: contributions of healthcare professionals. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, *SciELO Brasil*, v. 42, n. 3, p. 584–590, 2008.

SLATTERY, D. A.; MARKOU, A.; CRYAN, J. F. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology, Springer**, v. 190, n. 4, p. 555–568, 2007.

SOFFRITTI, M. et al. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of formaldehyde and acetaldehyde in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences, Wiley Online Library**, v. 982, n. 1, p. 87–105, 2002.

SOUZA, D. d.; MACHADO, S. A. Estudo eletro analítico do herbicida Paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultra microelétrodos. **Química Nova, SciELO Brasil**, v. 26, n. 5, p. 644–647, 2003.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. Agencia embrapa de informação tecnológica. **Agrotóxicos no Brasil**, www.agencia.cnptia.embrapa.br, 2017.

SRIVASTAVA, A. K. et al. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. **Life sciences, Elsevier**, v. 90, n. 21, p. 815–824, 2012.

STALLONES, L.; BESELER, C. L. Assessing the connection between organophosphate pesticide poisoning and mental health: A comparison of neuropsychological symptoms from clinical observations, animal models and epidemiological studies. **Cortex, Elsevier**, v. 74, p. 405–416, 2016.

SU, C.; NIU, P. Low doses of single or combined agrichemicals induces α -synuclein aggregation in nigrostriatal system of mice through inhibition of proteasomal and autophagic pathways. **International journal of clinical and experimental medicine, e-Century Publishing Corporation**, v. 8, n. 11, p. 20508, 2015.

TINAKOUA, A. et al. The impact of combined administration of paraquat and maneb on motor and non-motor functions in the rat. **Neuroscience, Elsevier**, v. 311, p. 118–129, 2015.

TSATSAKIS, A.; PERAKIS, K.; KOUMANTAKIS, E. Experience with acute paraquat poisoning in crete. **Veterinary and human toxicology**, v. 38, n. 2, p. 113–117, 1996.

WANG, Q. et al. Paraquat and mptp induce neurodegeneration and alteration in the expression profile of micrnas: the role of transcription factor nrf2. *npj Parkinson's Disease*, **Nature Publishing Group**, v. 3, n. 1, p. 31, 2017.

WHO. Poisoning prevention and management. **World Health Organization**, www.who.int, 2017.