

Tópico de Interesse Geral

Efeito protetor da melatonina sobre intoxicações por herbicidas¹

Lécio L. de Almeida^{2*}, Álvaro A.C. Teixeira³, Natallyanea S. Bezerra⁴
e Valéria Wanderley-Teixeira³

ABSTRACT.- Almeida L.L., Teixeira A.A.C., Bezerra N.S. & Wanderley-Teixeira V. 2016. [**Protective effect of melatonin on poisoning by herbicides.**] Efeito protetor da melatonina sobre intoxicações por herbicidas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(3):174-180. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri, Rua Cel. Antônio Luis 1161, Pimenta, Crato, CE 63105-000, Brazil. E-mail: lecioalmeida@ymail.com

The inadequate use of herbicides may cause serious and sometimes chronic poisoning due to long exposure to low levels of toxic agents. Herbicides may also be teratogenic, mutagenic, cancerigenous agents and endocrine disruptors, with the occurrence of neurodegenerative diseases and reproduction disorders. Several studies have shown that melatonin has antioxidant, anti-inflammatory and immune-modulating qualities, besides affecting the reproduction system. It is among the agents which are beneficent in poisoning by herbicides even though no reports are extant on the use of melatonin against poisoning by Glyphosate-Roundup[®] alone or associated with Paraquat. Solutions that prevent or minimize cell lesions caused by several biological systems have been focused upon in the treatment for poisoning with herbicides. Thus, melatonin, a known antioxidant, may be an alternative against the poisoning by single or associated herbicides.

INDEX TERMS: Herbicides, melatonin, herbicide poisoning.

RESUMO.- O uso inadequado de herbicidas pode resultar em intoxicações agudas e, às vezes, crônicas por exposição em longo prazo a baixos níveis desses agentes tóxicos, podendo o herbicida atuar também como agentes teratogênicos, mutagênicos, cancerígenos e desreguladores endócrinos, com o aparecimento de doenças neurodegenerativas e distúrbios reprodutivos. Estudos têm revelado que a melatonina tem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras e atua na reprodução. Essa indolamina está entre os agentes que têm se mostrado benéfico em intoxicações por herbicidas, porém não há relatos do uso de melatonina contra intoxicações por Glifosato-Roundup[®], muito menos em associação com o Paraquat. Dessa forma, o maior interesse no tratamento das intoxicações por herbicidas, tem-se concentrado em medidas que impeçam ou minimizem as lesões celulares provocadas nos diversos sis-

temas biológicos. Assim, a melatonina, como antioxidante conhecido, pode ser mais uma alternativa contra as intoxicações por herbicidas associados e/ou individuais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Herbicidas, melatonina, intoxicação por herbicidas.

INTRODUÇÃO

A utilização de herbicidas ocorre no Brasil desde a década de 1950. Naquela década, a agricultura volta-se para o mercado interno tentando viabilizar o aumento de safras e levando, conseqüentemente, os agricultores a utilizarem produtos químicos para controlar pragas, fitopatologias e plantas daninhas (Carraro 1997, IBGE 2010, ANVISA 2014). Além disso, o Brasil possui um destaque negativo no cenário mundial como o maior consumidor de agrotóxicos, sendo responsável, na América Latina, por 86% do emprego desses produtos nas lavouras agrícolas, enquanto herbicidas e inseticidas são responsáveis por 60% dos produtos comercializados no país (Pires et al. 2005, ANVISA 2014)

A preocupação crescente de especialistas e ambientalistas em relação ao uso de herbicidas é pela grande quantidade utilizadas nas práticas agrícolas que resultam em impactos ambientais pouco conhecidos, além dos inúmeros problemas relacionados à saúde pública (Mascarenha & Pessoa 2013). Neste contexto, o uso inadequado promove

¹ Recebido em 4 de agosto de 2015.

Aceito para publicação em 26 de dezembro de 2015.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri (URCA), Rua Cel. Antônio Luis 1161, Pimenta, Crato, CE 63105-000, Brasil.

*Autor para correspondência: lecioalmeida@ymail.com

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brasil. E-mails: alvaro@dmfa.ufrpe.br, valeria.wanderley@ufrpe.br

⁴ Curso de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, PE 52171-900. E-mails: natallyanea@hotmail.com

intoxicações agudas e, às vezes crônicas por exposição em longo prazo e a baixos níveis (Maroni et al. 2006). Assim, são reconhecidos ainda como possíveis agentes teratogênicos, mutagênicos, cancerígenos e desreguladores endócrinos, levando ao aparecimento de doenças neurodegenerativas e distúrbios reprodutivos (Feber & Cabral 1991, Mostafalou & Abdollahi 2013).

Dentre os herbicidas mais utilizados destacam-se o Glifosato-Roundup® (N-fosfonometil glicina) (GR) e Paraquat (1,1-dimetil-4,4-bipiridil) (PQ). O GR é considerado inibidor da biossíntese de aminoácidos essenciais de cadeia aromática, enquanto o PQ é um inibidor do fotossistema I ou formador de radicais livres durante a fotossíntese (Magalhães 2001). Além disso, o controle de plantas daninhas por meio do uso de herbicidas não seletivos tornou-se uma prática tão difundida nas lavouras, que é quase uma rotina obrigatória para os agricultores (Silva et al. 1998). O GR apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas agindo nos diferentes sistemas enzimáticos e, conseqüentemente, na síntese de ácidos nucléicos e proteínas, podendo leva-las a morte em poucos dias ou semanas. Apesar do seu princípio ativo (Glifosato) ser classificado como pouco tóxico (WHO 2005, ANVISA 2007), as formulações GR apresentam toxicidade relevante sobre a reprodução humano e animal (Sanin et al. 2009, Benachour & Séralini 2009, Romano et al. 2010, Dallegrave et al. 2002, Çaglar & Kolankaya 2008). Além disso, há evidências de efeitos danosos ao meio ambiente como a presença de resíduos após o uso prolongado do herbicida, podendo afetar direta ou indiretamente os organismos do solo e água, a colheita e, em especial, os animais usados na alimentação humana. (Amarante & Santos 2002). Em relação ao PQ, herbicida de contato não seletivo amplamente utilizado na agricultura, apresenta baixo custo, grande eficácia e, aparentemente não possui efeitos poluentes cumulativos para o solo. Porém, quando ingerido, é muito tóxico em humanos e animais, podendo causar intoxicações fatais, principalmente pela falta de um tratamento eficaz na reversão do quadro clínico. O PQ atua mediante mecanismos de indução do estresse oxidativo, produção aumentada de radicais livres associada à depleção dos sistemas antioxidantes do organismo. Sua toxicidade promove danos em vários tecidos e órgão (Almeida et al. 2007).

O tratamento das intoxicações por herbicidas baseia-se em medidas que diminuam a absorção, aumentem a excreção e neutralize os efeitos danosos nos teciduais e órgãos (Serra et al. 2003). O uso de agentes antioxidantes vem sendo estudado, pois há interesse crescente no estudo de substâncias que possam servir como antídoto nas intoxicações, uma vez que os herbicidas, em especial o PQ aumentam os índices de morbidade e mortalidade (Almeida et al. 2007). Por esta razão, pesquisas têm sugerido a utilização de antioxidantes como a melatonina (MLT), pela sua atuação contra injúrias morfofuncionais em tecidos e órgãos (Melchiorri et al. 1995, 1996, Ohta et al. 2000a, 2000b). Assim, o objetivo desta revisão foi identificar na literatura científica estudos que enfocassem, especificamente, o potencial toxicológico de herbicidas importantes na agroindústria, que muitas vezes são utilizados de forma indiscriminada, trazendo prejuízos à saúde humana e animal. Além disso,

chamar a atenção para o efeito protetor da MLT como uma possível alternativa contra essas intoxicações.

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E RICOS TOXICOLÓGICOS DO GLIFOSATO

O Glifosato após absorvido tem ampla distribuição no organismo, sendo encontrado principalmente nos intestinos, ossos e rins. Aparentemente, sua biotransformação em animais é mínima, em torno de 1% para o seu metabólito o ácido aminometilfosfônico (AMPA). Portanto, quase 100% da quantidade encontrada nos tecidos correspondem ao produto original. A absorção máxima ocorre em 6 h após a ingestão do produto havendo, após este intervalo de tempo, rápido declínio em todos os tecidos, exceto nos ossos onde a eliminação é mais lenta (Brewster et al. 1991). Após cinco dias da administração de dose única de Glifosato, observam-se traços residuais no fígado, rins e musculatura esquelética e a excreção ocorre principalmente pelas vias digestiva e renal (Williams et al. 2000).

Em ensaios toxicológicos foi observada maior toxicidade na formulação associada do Glifosato com os seus ingredientes inertes do que o princípio ativo (Glifosato) aplicado isoladamente, indicando que a toxicidade dos ingredientes inertes é maior que o princípio ativo, e que a sua presença produz maior efeito tóxico (Bradberry et al. 2004, Sorgan 2005, Cox & Sorgan 2006).

Neste contexto, Dallegrave et al. (2003) observaram retardo no desenvolvimento do esqueleto fetal em ratos Wistar causado pelo Glifosato-Roundup®, e comprovaram esse efeito tóxico sobre o desenvolvimento fetal em exposições agudas, utilizando-se as dosagens orais diárias de 500, 750 ou 1000 mg/kg de peso corporal entre o sexto e 15º dia de gestação. Em adição, Richard et al. (2005) demonstraram em ensaios *in vitro* que o Glifosato e/ou a formulação comercial Glifosato-Roundup® em baixas concentrações não tóxicas promoveram efeitos adversos sobre a enzima aromatase (responsável pela síntese de estrógenos) em células de placenta humana. Além disso, a formulação permitiu uma maior penetração do Glifosato nas células placentárias, acentuando, assim a redução da atividade enzimática.

O efeito tóxico das formulações também foi confirmado em cultivos de células testiculares de camundongos (Walsh et al. 2000) em mitocôndrias de hepatócitos de ratos (Peixoto 2005) em cultivo de células embrionárias humanas (Benachour et al. 2007) e em embriões de invertebrados (Marc et al. 2002). Além disso, estudos *in vitro* com linhagens de células intestinais revelaram danos às junções celulares (Vasiluk et al. 2005), bem como alterações pulmonares, epistaxe, dispneia, perda de peso, diarreia e morte de ratos (Adam et al. 1997) acidose metabólica, hipotensão e leucocitose (Tominack et al. 1991) e efeito cancerígeno em humanos (Guyton et al. 2015).

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E RICOS TOXICOLÓGICOS DO PARAQUAT

O PQ é altamente tóxico para humanos (Houze et al. 1990) e animais de laboratório (Ogata & Manabe 1990, Satoh et al. 1992). O mesmo é absorvido por contato dérmico, inala-

ção e, especialmente por ingestão (Houze et al. 1990). Por ingestão, o PQ apresenta absorção oral rápida pela sua alta hidrossolubilidade, sendo predominantemente no intestino delgado, assim o transporte ativo facilita a entrada do herbicida em todas as células da mucosa intestinal. Caso a mucosa do trato gastrointestinal fique comprometida, pelo poder de corrosão do herbicida, o percentual absorvido é suscetível de ser mais elevado, pela absorção por difusão passiva (Dinis-Oliveira et al. 2008). Por inalação, o PQ acumula-se, principalmente nos pulmões, onde pode alcançar concentrações letais em menos de 10 horas, além de rins, músculos, coração, fígado (Xarau & Laita 2000) cérebro e adrenais (Schmitt et al. 2006, Almeida et al. 2007).

No organismo, o PQ sofre um processo redox cíclico, sendo metabolizado pela ação da enzima NADPH-citocromo P450 redutase que resulta na geração de um radical Paraquat (PQ^{•+}). Assim, produz espécies reativas de oxigênio (EROs) durante sua oxidação com o oxigênio molecular formando o radical ânion superóxido, que é uma espécie altamente reativa. Desta forma, inicia-se o ciclo redox (Bus et al. 1976, Alonzo & Corrêa 2008). Por fim, o PQ é excretado pelas vias digestiva e renal (Honoré et al. 1994).

A formação de EROs como o radical superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH), além de instáveis, reagem rapidamente com ácidos graxos, provocando lesões nas membranas, proteínas e DNA das células (Schmitt et al. 2006, Dinis-Oliveira et al. 2008, Martins 2013).

Em relação a toxicidade sistêmica do PQ tem sido determinada em várias espécies de animais por meio da administração oral. Os sintomas incluem, inflamação da garganta e lábios, vômitos e diarreias. Doses concentradas levam a progressivas dificuldades respiratórias, distensão abdominal em virtude da dilatação do intestino e redução de sua mobilidade (Shimizu et al. 2003). A sua ação altamente tóxica advém da sua capacidade de produção contínua de EROs, compostos extremamente danosos às células e da peroxidação lipídica das membranas celulares podendo causar alterações morfofisiológicas em diversos órgãos, em especial, nos pulmões, fígado e rim (Serra et al. 2003).

ASSOCIAÇÃO DE HERBICIDAS E SUAS CONSEQUÊNCIAS

Durante muito tempo pensou-se que a associação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação não exercia efeitos adversos à saúde humana e animal, mesmo quando presentes em doses correspondentes a sua NOAEL (nível de efeito adverso não observado). Recentemente, estudos sobre o impacto dessas associações têm causado grande preocupação (Kortenkamp 2008, Rider et al. 2010) e, ao examinar a literatura verificou-se que a exposição a estas associações, promove efeitos adversos que variam de acordo com os compostos testados, o tecido-alvo e os parâmetros biológicos avaliados (Padhi et al. 2008, Blystone et al. 2009). Assim, o uso dessas associações constitui prática relativamente comum na agricultura (Castro 2009) com seus resíduos coexistindo em um mesmo ambiente podendo causar diferentes danos aos sistemas biológicos, segundo as interações entre seus diferentes compostos (Laetz et al.

2009, Wang et al. 2014). Além disso, na literatura científica, existe poucas pesquisas sobre os efeitos danosos decorrentes dessas associações em diferentes organismos com relatos de estudos reprodutivos e de desenvolvimento animal (McCarty & Borgert 2006). O mesmo acontece quando se trata dos feitos sinérgicos de doses subletais (Boobis et al. 2011).

Neste contexto, alguns estudos sinalizam a importância do problema. Assim, ROUIMI et al. (2012) reportaram em estudos *in vitro* com células hepáticas expostas à associação contendo o herbicida Atrazina desregulação gênica responsável pela codificação de enzimas metabólicas e vias de desintoxicação. Esses resultados, em um contexto de exposição crônica, poderiam eventualmente promover patologias em seres humanos e animais. Além disso, associações contendo os herbicidas Alachlor, Captan, Diazinon, normalmente ingeridos através do consumo de frutas e legumes, promoveram alterações importantes em metabólitos hepáticos envolvidos no estresse oxidativo e na regulação do metabolismo da glicose em camundongos (Merhi et al. 2010).

Em associações contendo os herbicidas Sulfentrazone e Atrazina foram reportados toxicidade reprodutiva e/ou no desenvolvimento dos organismos expostos (Castro et al. 2009). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA 1997), contaminantes ambientais como os herbicidas que podem interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais como o LH, FSH, Testosterona, Estrogênio e Progesterona responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos são conhecidos como desreguladores endócrinos. Demur et al. (2013) mostraram que a exposição à dose subletal de herbicidas associados desde o desenvolvimento fetal até a idade adulta levou a grandes mudanças nos níveis de glicose plasmática e desordens hematopoiéticas, sugerindo que, mesmo quando os contaminantes não excedam a dose de referência como o nível de risco mínimo (MLR), ingestão diária aceitável (ADI) e a NOAEL, a segurança alimentar ainda pode ser um problema sério. Roustan et al. (2014) demonstraram em ensaios *in vitro* com células de ovário de hamster (CHO-K1) que a associação dos herbicidas Glifosato e Atrazina e seus produtos de degradação AMPA e desetilatraxina (DEA), respectivamente, revelaram propriedades genotóxicas induzindo a formação de micronúcleos.

Estudos experimentais em ratos e camundongos têm evidenciado uma série de alterações no desenvolvimento intrauterino, cujos danos são observados somente *a posteriori*. Entretanto, estudos em seres humanos ainda são contraditórios, porém indicam maior risco destes desfechos em recém-nascidos cujas mães se expuseram a herbicidas (Clementi et al. 2007). Neste contexto, a transferência de herbicidas na interfase materno-fetal pode promover danos ao feto, bem como à placenta, tecidos e órgãos maternos (Barr et al. 2007).

MELATONINA: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (MLT) é um neuro-hormônio pertencente ao grupo das indolaminas

sintetizada, principalmente, na glândula pineal. Além da pineal, a MLT também pode ser secretada em menor quantidade pela retina, ossos, pele, intestino, plaquetas, bile (Acuña-Castroviejo et al. 2014), timo, baço, coração, músculo esquelético, fígado, estômago, intestino, placenta, testículos, ovários, córtex cerebral e corpo estriado (Stefulj et al. 2001, Sanchez-Hidalgo et al. 2009). A MLT de produção extrapineal tem uma ação parácrina, autócrina e/ou intrácrina de proteção contra estresse oxidativo (Luchetti et al. 2011) e modulação da resposta imunológica (Carrillo-Vico et al. 2005).

A MLT é metabolizada principalmente no fígado (Fig.1) através de uma via clássica de hidroxilação, envolvendo enzimas do sistema citocromo P450, que catalisa a formação de 6-hidroximelatonina que então sofre conjugação com ácido glicurônico ou sulfato, gerando o composto 6-sulfatoximelatonina, que posteriormente será excretado na urina (Boutin et al. 2005). Patologias hepáticas e renais, como cirrose e insuficiência renal crônica, são conhecidos por alterar as taxas de eliminação desse composto (Viljoen et al. 1992, Kunz et al. 1999).

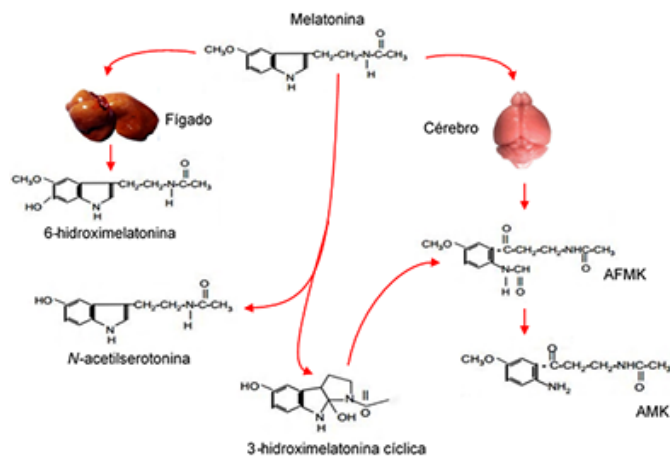


Fig.1. Representação esquemática de vias metabólicas de degradação da MLT (Adaptado de Zlotos et al. 2014).

No tecido cerebral (Fig.1), uma parte da MLT é convertida a N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikynuramina (AFMK) (Hirata et al. 1974), possivelmente através de clivagem oxidativa do anel indólico, catalisada por enzimas como a indolamina-2,3-dioxigenase, seguida de deformilação, formando N-acetil-5-metoxikynuramina (AMK), por ação da enzima formamidase. A MLT pode ser convertida em AFMK por reações enzimáticas, pseudoenzimáticas e ainda por irradiação de ultravioleta e reação com EROs (Kvetnoy et al. 1997).

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem a ação direta da MLT sobre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERNs) (Horstman et al. 2002), muitos outros atribuem sua ação antioxidante aos metabólitos que são gerados durante o estresse oxidativo. A degradação da MLT em N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikynuramina (AFMK) e N-acetil-5-metoxikynuramina (AMK) eleva a ação de enzimas antioxidantes e inibe a ação de mediadores pró-inflamatórios (Silva et al. 2004 Mayo et al. 2005, Tan et al. 2007). Outras vias metabólicas menos importantes, que

ocorrem em diversos tipos celulares, levam à formação de N-acetilsertonina e de 3-hidroximelatonina cíclica (Fig.1), sendo esse último uma possível fonte de AFMK (Zlotos et al. 2014).

A MLT também é relatada como agente anti-inflamatório, contribui para a eliminação de radicais livres e regula a síntese da cicloxigenase 2 (COX-2) (Mayo et al. 2005). Assim, apresenta uma estrutura semelhante a COX-2 e, por isso pode se ligar ao seu sítio ativo, atuando como um inibidor natural das funções dessa enzima, ao modular de maneira natural a sua atividade (De la Rocha et al. 2007), limitando a produção de quantidades excessivas de óxido nítrico (NO), prostanoídes e leucotrienos, bem como outros mediadores do processo inflamatório, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Martins et al. 2013). Acredita-se que as ações anti-inflamatórias da MLT são decorrentes da formação do metabólito AMK, capaz de causar inibição e infrarregulação da COX-2 (Hardeland et al. 2006).

Finalmente, a MLT é uma molécula evolutivamente conservada, que reduz direta e indiretamente a peroxidação lipídica (LPO) em animais e plantas, especialmente *in vivo*. Assim, não se sabe se essa ação protetora é exclusivamente imputável à sua capacidade de eliminar radicais livres ou se é uma consequência desta ação por seus metabólitos o c3OHM, AFMK ou AMK, uma vez que todos os metabólitos são formados durante a cascata antioxidante da MLT. Outro aspecto importante sobre MLT e seus metabólitos é a ausência de qualquer atividade pró-oxidante em células normais, uma característica que ocorre com alguns antioxidantes clássicos (Reiter et al. 2014).

MELATONINA E INTOXICAÇÃO POR HERBICIDAS

As intoxicações por herbicidas representam, com já mencionado anteriormente, um problema de saúde pública em virtude da elevada incidência. O maior interesse no tratamento das intoxicações por pesticidas tem-se concentrado em medidas que impeçam ou minimizem as lesões celulares (Serra et al. 2003). Nesse sentido, enfatiza-se a utilização de várias substâncias, entre elas a MLT (Cagnoli et al. 1995, Melchiorri et al. 1996).

Nas duas últimas décadas, muitos estudos têm reportado que a MLT atua como antioxidante dentre outras propriedades funcionais (Reiter et al. 1997, Galano et al. 2011). Neste contexto, Bhatti et al. (2011) constataram efeito protetor da MLT na dose de 10mg/kg/dia via intraperitoneal (i.p.) contra danos oxidativos em eritrócitos de ratos expostos a 300mg/kg/dia de herbicida Atrazina. Em outro estudo, a MLT em dose de 20 mg/kg/dia e administrada pela mesma via (i.p.) promoveu ação hepatoprotetora contra a LPO, reduziu a taxa de mortalidade e toxicidade renal em ratos expostos ao herbicida Diquat na dose 40mg/kg/dia (Zhang et al. 2006, Xu et al. 2007). Em estudo *in vitro*, a MLT nas concentrações de 0,1 e 0,5nM foi capaz de neutralizar a maioria das mudanças redox nas células granulares do cerebelo produzidos pelo herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético na concentração de 1 mM. Assim, a MLT destaca-se mais uma vez como um agente protetor, sendo nesse caso um efeito direto no sistema nervoso central (Bongiovanni et al. 2007).

O papel citoprotetor da MLT sobre o mecanismo imunotóxico do herbicida Atrazina foi estudado em ratos por Sharma et al. (2014). Estes observaram que a MLT na dose de 20 mg/kg via (i.p.) reduziu o estresse do retículo endoplasmático, apoptose mitocondrial, bem como os sinais de autofagia. Já em relação ao herbicida PQ extremamente tóxico por via oral e o Diquat tóxico, especialmente no intestino e fígado (Paredes & Reiter 2010), a MLT na dose de 10mg/kg foi capaz de reduzir danos oxidativos provocados por ambos os herbicidas. Além disso recuperou os níveis de glutatona reduzida (GSH) hepática e pulmonar, bem como elevou a DL50 dos ratos de 75mg/kg para 251 mg/kg de PQ (Melchiorri et al. 1995, 1996). Ortiz et al. (2000) observaram que após a administração de MLT na dose de 10mg/kg em ratos expostos ao PQ (20mg/kg) houve redução significativamente de micronúcleos em células do sangue periférico e de medula óssea. Esse mesmo resultado foi observado por Melchiorri et al. (1998). O efeito protetor da MLT também foi demonstrado por García-Rubio et al. (2005) em estudo *in vitro* com hepatócitos expostos a 10mM de PQ, pois, a MLT na concentração de 2 mM protegeu completamente os hepatócitos contra o estresse oxidativo melhorando os níveis de GSH hepático.

CONCLUSÃO

Associações de herbicidas representam um problema de saúde pública ainda maior em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento com base econômica agroindustrial. Embora o uso associado de herbicidas seja generalizado, o seu perfil toxicológico é desconhecido. Assim, os antioxidantes têm assumido um papel importante contra as intoxicações por esses produtos. Este quadro mostra a necessidade de realizar estudos relacionados à exposição de herbicidas em associação, pois raramente a aplicação dos herbicidas nas lavouras é realizada individualmente. Dessa forma, estudos sobre os efeitos da exposição individual de herbicidas e coadministrados com MLT são poucos ainda e quando se trata dos herbicidas em associação, não há relatos na literatura científica. Por isso, são necessários estudos sobre a exposição de herbicidas em associação, sobretudo, investigar os efeitos da MLT sobre essas intoxicações.

REFERÊNCIAS

- Acuña-Castroviejo D., Escames G., Venegas C., Díaz-Casado M.E., Lima-Cabello E., López L.C., Rosales-Corral S., Tan D. & Reiter R.J. 2014. Extraneal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 71(17):2997-3025.
- Adam A., Marzuki A., Abdul R.H. & Abdul AM. 1997. The oral and intratracheal toxicities of ROUNDUP and its components to rats. *Vet. Hum. Toxicol.* 39(3):47-51.
- Almeida G.L., Schmitt G.C., Bairos A.V., Emanuelli T. & Garcia S.C. 2007. Os riscos e danos nas intoxicações por paraquat em animais domésticos. *Ciência Rural* 37(50):1506-1512.
- Amarante Junior O.P. & Santos T.C.R. 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova* 25(4):589-593.
- ANVISA 2007. Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Disponível em <<http://www.portal.anvisa.gov.br>> Acessado em 12 jun. 2014.
- ANVISA 2014. Monografias de Produtos Agrotóxicos, atualizada em 2007. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>> Acessado em 5 de abril, 2015.
- Barr D., Bishop A. & Needham L. 2007. Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. *Reprod. Toxicol.* 23(3):260-266.
- Benachour N. & Seralini G. 2009. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.* 22(1):97-105.
- Benachour N., Sipahutar H., Moslemi S., Gasnier C., Travert C. & Seralini G.E. 2007. Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Arch. Environ. Con. Tox.* 53(1):126-133.
- Bhatti J.S., Sidhu I.P. & Bhatti G.K. 2011. Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 353(1/2):139-149.
- Blystone C.R., Lambright C.S., Cardon M.C., Furr J., Rider C.V., Hartig P.C., Wilson V.S. & Gray Jr L.E. 2009. Cumulative and antagonistic effects of a mixture of the antiandrogens vinclozolin and iprodione in the pubertal male rat. *Toxicol. Sci.* 111(1):179-188.
- Bongiovanni B., De Lorenzi P., Ferri A., Konjuh C., Rassetto M., Evangelista D.A.M., Cardinali D.P. & Duffard R. 2007. Melatonin decreases the oxidative stress produced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat cerebellar granule cells. *Neurotox. Res.* 11(2):93-9.
- Boobis A., Budinsky R., Collie S., Crofton K., Embry M., Felter S., Hertzberg R., Kopp D., Mihlan G., Mumtaz M., Price P., Solomon K., Teuschler L., Yang R. & Zaleski R. 2011. Critical analysis of literature on low-dose synergy for use in screening chemical mixtures for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 41(5):369-383.
- Boutin J.A., Audinot V., Ferry G. & Delagrangre P. 2005. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol. Sci.* 26(8):412-419.
- Bradberry S.M., Proudfoot A.T. & Vale J.A. 2004. Glyphosate poisoning. *Toxicol. Rev.* 23(3):159-167.
- Brewster D., Warren J. & Hopkins W. 1991. Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: Tissue distribution, identification and quantification of glyphosate derived materials following a single oral dose. *Fund. Appl. Toxicol.* 17(1):43-51.
- Çağlar S. & Kolankaya D. 2008. The effect of sub-acute and sib-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. *Environ. Toxicol. Phar.* 25(1):57-62.
- Cagnoli C.M., Atabay C., Kharlamova E. & Manev H. 1995. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J. Pineal Res.* 18(4):222-226.
- Carraro G. 1997. Agrotóxico e Meio Ambiente: uma proposta de ensino de ciências e de química, 95p.
- Carrillo-Vico A., Calvo J.R., Abreu P., Lardone P.J., Garciamaurino S., Reiter R.J. & Guerrero J.M. 2004. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 18(3):537-539.
- Castro V.L.S.S. 2009. Uso de misturas de agrotóxicos na agricultura e suas implicações toxicológicas na saúde. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 4(1-3):87-94.
- Clementi M., Causin R., Marzocchi C., Mantovani A. & Tenconi R. 2007. A study of the impact of agricultural pesticide use on the prevalence of birth defects in Northeast Italy. *Reprod. Toxicol.* 24(1):1-8.
- Cox C. & Sorgan M. 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ. Health Persp.* 114(12):1803-1806.
- Dallegrave E., Mantese F.D.G., Coelho R.S., Pereira J.D., Dalsenter P.R. & Langeloh A. 2003. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup im Wistar rats. *Toxicol. Lett.* 142(1/2):45-52.
- Dallegrave E., Antese F.D.G., Dalsenter P.R. & Langeloh A. 2002. Acute oral toxicity of glyphosate in Wistar rats. *J. Vet. Res.* 1:29-36.
- De La Rocha N., Rotelli A., Aguilar C.F. & Pelzer L. 2007. Structural basis of the anti-inflammatory activity of melatonin. *Arzneimittelforschung* 57(12):782-786.

- Demur C., Métais B., Canlet C., Tremblay-Franco M., Gautier R., Blas-Y-Estrada F., Sommer C. & Gamet-Payrastre L. 2013. Dietary exposure to a low dose of pesticides alone or as a mixture: The biological metabolic fingerprint and impact on hematopoiesis. *Toxicology* 308:74-87.
- Denis-Oliveira R.J., Duarte J.A., Sánchez-Navarro A., Remião F., Bastos M.L. & Carvalho F. 2008. Paraquat poisonings mechanisms of lung toxicity, clinical features and treatment. *Crit. Rev. Toxicol.* 38(1):13-71.
- EPA U.S. Environmental Protection Agency 1997. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: an effects assessment and analysis, Report EPA/630/R-96/012. Disponível em <<http://www.epa.gov/osainter/raf/publications/pdfs/ENDOCRINE.PDF>> Acessado em 22 de jun. 2015.
- Feber A. & Cabral R. 1991. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. *Food Addit. Contam. A* 8(6):755-776.
- Galano A., Tan D.X. & Reiter R.J. 2011. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J. Pineal Res.* 51(1):1-16.
- García-Rubio L., Matas P. & Miguez M. 2005. Protective effect of melatonin on paraquat-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Hum. Exp. Toxicol.* 24(9):475-480.
- Guyton K.Z., Loomis D., Grosse Y., Ghisassi F., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Scoccianti C., Mattock H. & Straif K. 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* 17:1-2.
- Hardeland R., Pandi-Perumal S.R. & Cardinali D.P. 2006. Melatonin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 38(3):313-316.
- Hirata F., Hayaishi O., Tokuyama T. & Seno S. 1974. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* 249(4):1311-1313.
- Honoré P., Hantson P.H., Fauville J.P.H., Peeters A. & Mahieu P. 1994. Paraquat poisoning: state of the art. *Acta Clin. Belg.* 49(5):220-228.
- Horstman J.A., Wrona M.Z. & Dryhurst G. 2002. Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. *Bioorg. Chem.* 30(5):371-382.
- Houze P., Baud F.J., Mouy R., Bismuth C., Bourdon R. & Scherrmann J.M. 1990. Toxicokinetics of paraquat in humans. *Hum. Exp. Toxicol.* 9(1):5-12.
- IBGE 2012. Indicadores de desenvolvimento sustentável. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2012.pdf>> Acessado em 10 nov. 2013.
- Kortenkamp A. 2008. Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology. *Int. J. Androl.* 31(2):233-240.
- Kunz D., Schmitz S., Mahlberg R., Mohr A., Stöter C., Wolf K.-J. & Hermann W.M.A. 1999. A new concept for melatonin deficit: on pineal calcification and melatonin excretion. *Neuropsychopharmacology* 21(6):765-772.
- Kvetnoy I.M., Sandvik A.K. & Waldum H.L. 1997. The diffuse neuroendocrine system and extrapineal melatonin. *J. Mol. Endocrinol.* 18(1):1-3.
- Laetz C.A., Baldwin D.H., Collier T.K., Hebert V., Stark J.D. & Scholz N.L. 2009. The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered pacific salmon. *Environ. Health Perspect.* 117(3):348-353.
- Luchetti F., Canonico B., Betti M., Arcangeletti M., Pilolli F., Piroddi M., Canesi L., Papa S. & Galli F. 2010. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J.* 24:(10)3603-3624.
- Magalhães P.C., Silva J.B., Durães F.O.M., Karam D. & Ribeiro L.S. 2001. Efeito de doses reduzidas de glyphosate e paraquat simulando deriva na cultura do milho. *Planta Daninha* 19(2):247-253.
- Marc J., Mulner-Lorillon O., Boulben S., Hureau D., Durand G. & Bellé R. 2002. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol.* 15(3):326-331.
- Maroni M., Fanetti A.C. & Metruccio F. 2006. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. *Med. Lav.* 97(2):430-437.
- Martins T. 2013. Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas. *Semin. Ciênc. Biol. Saúde* 34(2):175-186.
- Mascarenha T.K.S.F. & Pessoa Y.S.R.Q. 2013. Aspectos que potencializam a contaminação do trabalhador rural com agrotóxicos: uma revisão integrativa. *Trabalho e Educação* 22(2):87-103.
- Mayo J.C., Sainza R.M., Tan D., Hardeland R., Leon J., Rodríguez C. & Reiter R.J. 2005. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J. Neuroimmunol.* 165(1/2):139-149.
- McCarty L.S. & Borgert C.J. 2006. Review of the toxicity of chemical mixtures: theory, policy, and regulatory practice. *Regul. Toxicol. Pharm.* 45(2):119-143.
- Melchiorri D., Reiter R.J., Attia A.M., Hara M., Burgos A. & Nistico G. 1995. Potent protective effect of melatonin on *in vitro* paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci.* 56(2):83-89.
- Melchiorri D., Reiter R.J., Sewerynek E., Hara M., Lidun Chen L. & Nistico G. 1996. Paraquat toxicity and oxidative damage reduction by melatonin. *Biochem. Pharmacol.* 51(8):1095-1099.
- Melchiorri D., Ortiz G.G., Reiter R.J., Sewerynek E., Daniels W.M.U., Pablos M.I. & Nistico G. 1998. Melatonin reduces paraquat-induced genotoxicity in mice. *Toxicol. Lett.* 95(2):103-108.
- Merhi M., Demur C., Racaud-Sultanb C., Bertrandb J., Canlet C., Blas F., Estrada Y. & Gamet-Payrastre L. 2010. Gender-linked haematopoietic and metabolic disturbances induced by a pesticide mixture administered at low dose to mice. *Toxicology* 267(1/3):80-90.
- Mostafalou S. & Abdollahi M. 2013. Pesticides and human chronic diseases: evidences, 1119 mechanisms and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268(2):157-177.
- Ogata T. & Manabe S. 2009. Correlation between lipid peroxidation and morphological manifestation of paraquat-induced lung injury in rats. *Arch. Toxicol.* 64(1):7-13.
- Ohta Y., Kongo M., Sasaki E., Nishida K. & Ishiguro I. 2000. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *J. Pineal Res.* 28(2):119-126.
- Ohta Y., Kongo M., Sasaki E., Ishiguro I. & Harada N. 2000. Protective effect of melatonin against α -naphthylisothiocyanate induced liver injury in rats. *J. Pineal Res.* 29(1):15-23.
- Ortiz G.G., Reiter R.J., Zúñiga G., Melchiorri D., Sewerynek E., Pablos M.I., Oh C.S., García J.J. & Bitzer-Quintero O.K. 2000. Genotoxicity of paraquat: micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin. *Mutat. Res.* 464(2):239-245.
- Padhi B.K., Pelletier G., Williams A., Berndt-Weis L., Yauk C., Bowers W.J. & Chu I. 2008. Gene expression profiling in rat cerebellum following in utero and lactational exposure to mixtures of methylmercury, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. *Toxicol. Lett.* 176(2):93-103.
- Paredes S.D. & Reiter R.J. 2010. Melatonin: Helping cells cope with oxidative disaster. *Cell Membr. Free Radical Res.* 2(3):99-111.
- Peixoto F. 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61(8):1115-1122.
- Pires D.X., Caldas E.D. & Recena M.C.P. 2005. Uso de agrotóxicos e suicídios no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 21(2):598-605.
- Reiter R.J., Carneiro R.C. & Oh C.S. 1997. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm. Metab. Res.* 29(8):363-372.
- Reiter R.J., Tan D., Tamura H., Cruz M.H.C. & Fuentes-Broto L. 2014. Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review. *Gynecol. Endocrinol.* 30(2):83-89.
- Richard S., Moslemi S., Sipahutar H., Benachour N. & Seralini G. 2005. Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. *Environ. Health Persp.* 113(6):715-720.
- Rider C.V., Furr J.R., Wilson V.S. & Gray Jr L.E. 2010. Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt

- common target tissues via diverse mechanisms of toxicity. *Int. J. Androl.* 33(2):443-462.
- Romano R.M., Romano M.A., Bernardi M.M., Furtado P.V. & Oliveira C.A. 2010. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Reprod. Toxicol.* 84(4):309-317.
- Rouimi P., Zucchini-Pascal N., Dupont G., Razpotnik A., Fouché E., Sousa G. & Rahmani R. 2012. Impacts of low doses of pesticide mixtures on liver cell defence systems. *Toxicol. In Vitro* 26(5):718-726.
- Roustan A., Aye M., De Meo M. & Di Giorgio C. 2014. Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation. *Chemosphere* 108:93-100.
- Sanchez-Hidalgo M., De La Lastra C.A., Carrascosa-Salmoral M.P., Naranjo M.C., Gomez-Corvera A., Caballero B. & Guerrero J.M. 2009. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp. Gerontol.* 44(5):328-334.
- Sanin L.H., Carrasquilla G., Solomon K.R., Cole D.C. & Marshall E.J.P. 2009. Regional differences in time to pregnancy among fertile women from five Colombian regions with different uses of glyphosate. *J. Toxicol. Environ. Health A* 72(15/16):949-960.
- Satoh M., Naganuma A. & Imura N. 1992. Effect of preinduction of metallothionein on paraquat toxicity in mice. *Arch. Toxicol.* 66(2):145-148, 1992.
- Schimitt G.C., Paniz C., Grotto D., Valentini J., Schott K.L., Pomblum V.J. & Garcia S.C. 2006. Aspectos gerais e diagnóstico clinicolaboratorial da intoxicação por paraquat. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 42(4):235-243.
- Serra A., Domingos F. & Prata M.M. 2003. Intoxicação por paraquat. *Acta Medica Port.* 16(1):25-32.
- Sharma S., Sarkar J., Haldar C. & Sinha S. 2014. Melatonin reverses fas, E2F-1 and endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis and dysregulation of autophagy induced by the herbicide Atrazine in murine splenocytes. *PLOS One* 9(9):1-11.
- Silva J.B., Rodrigues M.A.T. & Begliomini E. 1998. Indicações para o controle de plantas daninhas na cultura do milho em pós-emergência com o herbicida Sanson 40 SC e sua mistura 1+2 com atrazine. *O Ruralista* 35(440):9-11.
- Silva S.O., Rodrigues M.R., Ximenes V.F., Bueno-Da-Silva A.E., Amarante-Mendes G.P. & Campa A. 2004. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. *J. Neuroimmunol.* 156(1-2):146-152.
- Shimizu K. 2003. Paraquat induces long - lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of fruly moving rats. *Brain Res.* 976(2):243-252.
- Stefulj J., Hortner M., Ghosh M., Schauenstein K., Rinner I., Wolfner A., Semmler J. & Liebmman P.M. 2001. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J. Pineal Res.* 30(4):243-247.
- Surgan M.H. 2005. Toxicity tests: "inert" and active ingredients. *Environ. Health Persp.* 113(10):657-658.
- Tan D., Manchester L.C., Terron M.P., Flore J. & Reiter R.J. 2007. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* 42(1):28-42.
- Vasiluk L., Pinto L.J. & Moore M.M. 2005. Oral bioavailability of glyphosate: studies using two intestinal lines. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(1):153-60.
- Viljoen M., Steyn M.E., Van Rensburg B.W. & Reinach S.G. 1992. Melatonin in chronic renal failure. *Nephron.* 60(2):138-143.
- Zhang L., Wei W., Xu J., Min F., Wang L., Wang X., Cao S., Tan D., Qi W. & Reiter R.J. 2006. Inhibitory effect of melatonin on diquat-induced lipid peroxidation *in vivo* as assessed by the measurement of F2-isoprostanes. *J. Pineal Res.* 40(4):326-331.
- Walsh L.P., McCormick C., Martin C. & Stocco D.M. 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ. Health Persp.* 108(8):769-776.
- Wang P., Wang H., Xu M., Liang Y., Sun Y., Yang L., Li L., Li W. & Wu Y. 2014. Combined subchronic toxicity of dichlorvos with malathion or pirimicarb in mice liver and serum: a metabonomic study. *Food Chem. Toxicol.* 70:222-230.
- Who-World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. Geneva, 2005. 56 p. Disponível em <http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_rev_3.pdf> Acessado em: 15 set. 2015.
- Williams G.M., Kroes R. & Munro I.C. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharm.* 31(2):117-165.
- Xarau S.N. & Laita A.D. 2000. Intoxicación por paraquat: um puzzle al que le faltan piezas. *Med. Clin.* 115(14):546-548.
- Xu J., Sun S., Wei W., Fu J., Qi W., Manchester L.C., Tan D.X. & Reiter R.J. 2007. Melatonin reduces mortality and oxidatively mediated hepatic and renal damage due to diquat treatment. *J. Pineal Res.* 42(2):166-171.
- Zlotos D.P., Jockers R., Cecon E., Rivara S. & Witt-Enderby P.A. 2014. MT1 and MT2 melatonin receptors: ligands, models, oligomers, and therapeutic potential. *J. Med. Chem.* 57(8):3161-3185.