Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão

Humberto Gabriel Rodrigues¹

Maria Thereza Alves Batista¹

Lúbia Cristina Fonseca¹

Tales Alexandre Aversi-Ferreira^{2*}

¹PPG em Genética e Bioquímica na Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB), Uberlândia – MG, Brasil

²Universidade Federal de Goiás, Departamento de Enfermagem
Laboratório de Bioquímica e Neurociências (LABINE), bloco K
Avenida Dr. Lamartine Pinto de Avelar, 1120, Setor Universitário, Catalão – GO, Brasil

*Autor para correspondência
aversiferreira@hotmail.com

Submetido em 07/02/2008
Aceito para publicação em 14/10/2008

Resumo

Apesar da sua aplicação em outros setores, a agricultura tem sido a maior fonte de contaminação ambiental por praguicidas. Alguns praguicidas e seus metabólitos têm sido encontrados como poluentes no fundo e superfície de águas, no solo, e na atmosfera e são prováveis responsáveis pela perda da biodiversidade e a deterioração de habitats naturais. Dentre os herbicidas, o Roundup® (Brasil) é o mais comum. Estudos recentes têm demonstrado que o glifosato, o pesticida mais utilizado na agricultura e considerado de baixo risco pelo EPA-US gera fragilidade osmótica de eritrócitos humanos e de ratos dentro das concentrações indicadas pelos fabricantes. As características da intoxicação por esse praguicida podem ser explicadas pela hipóxia causada pela hemólise dos eritrócitos. Os pesticidas podem estar associados com a aquisição de demências, com o aumento da população de idosos no país, o contato tempo-dependente dos indivíduos com substâncias nocivas aumentam e putativamente, o aumento de demências provocadas por fatores exógenos tende a aumentar também, desse modo a contaminação do ambiente por pesticidas e as doenças assim derivadas devem ser consideradas como um problema de saúde pública.

Unitermos: praguicidas, membrana, fragilidade osmótica

Abstract

Effects of pesticides on the osmotic fragility of erythrocytes – A brief review. Despite their applications in other fields, agriculture is the main source of environmental contamination by pesticides. Pesticides and their metabolites have been found in the oceans, soil and atmosphere, and are probably responsible for the loss of biodiversity and deterioration of the natural environment. Roundup® is the pesticide most used in Brazil. Recent studies have demonstrated that glyphosate (the main ingredient of Roundup®), while considered to be of low risk, generates osmotic fragility at the concentrations recommended by the manufactures. The problems caused by this pesticide can be explained by hypoxia caused by hemolysis of erythrocytes. Such pesticides can be

associated with the acquisition of dementia. With the growth of populational aging rates in Brazil, the time-dependent contact of individuals with dangerous substances is correspondingly greater, and putatively, the growth of dementia caused by exogenous factors also increase. Contamination of the environment by pesticides and the diseases provoked by them can therefore be considered to constitute a problem of public health.

Key words: pesticide, membranes, osmotic fragility

Considerando a ampla utilização de praguicidas atualmente, o desconhecimento dos riscos associados a sua utilização, o desrespeito às normas básicas de segurança, a livre comercialização e o conseqüente agravamento dos quadros de contaminação humana e ambiental, é importante o estudo e a avaliação dessas substâncias na saúde humana e animal. Nessa revisão da literatura, procuramos mostrar quais são as implicações dos praguicidas e principalmente do herbicida [glifosato (N-fosforometilglicina – $C_3H_8NO_3P$)] na saúde humana e no ambiente. Como a membrana e sua fragilidade em eritrócitos são essenciais para a manutenção do metabolismo, é importante verificar os efeitos de várias substâncias, tanto mais de praguicidas sobre a fragilidade da membrana de eritrócitos.

Estrutura da membrana plasmática

Internamente, as células são compartimentadas por uma membrana semelhante à membrana plasmática que delimita as organelas celulares, essa compartimentação é importante para que ocorram as diversas reações bioquímicas no interior das células (Lodish et al., 2004).

Segundo Singer e Nicholson (1972), a membrana é representada pelo modelo Modelo em Mosaico Fluido, em que a membrana biológica é um fluido bidimensional de lipídios e proteínas orientados. As moléculas de proteínas estão inseridas em diferentes partes da bicamada lipídica. A constituição bioquímica das membranas oscila em torno dos valores médios de 20 a 80% de proteínas (De Weer, 2000).

Dentre os principais lipídios presentes nas membranas podemos citar os fosfolipídios, os esfingolipídios e os esteróis (Cascio, 2005). Os lipídios das membranas são moléculas longas e anfipáticas: possuem duas extremidades com propriedades de solubilidade diferentes. Os lipídios estão dispostos em dupla camada, sendo que as cabeças polares dos fosfolipídios ficam expostas para o meio aquoso, seja

o meio citoplasmático ou o meio extracelular; já as duas caldas apolares dos fosfolipídios se dirigem umas para as outras no interior da bicamada lipídica (Boon e Smith, 2002).

As proteínas estão mergulhadas na bicamada (proteínas intrínsecas) ou estão na superfície interna ou externa da bicamada lipídica (proteínas extrínsecas) (Lague et al., 2001). As membranas de organelas subcelulares tais como mitocôndrias e núcleos raramente contêm colesterol (Halliwell e Gutteridge, 1999). O colesterol desempenha um papel fundamental em muitos processos biológicos tais como: permeabilidade da membrana, organização lateral de lipídios, transdução de sinais e passagem de substâncias através da membrana (Wustner, 2007). Quanto maior a quantidade de esteróis menor é a fluidez da membrana (facilidade de movimento e representa os valores recíprocos de viscosidade da membrana (Tsuda e Nishio, 2003)), devido à presença do núcleo rígido do anel esteróide, o qual diminui a liberdade de rotação das ligações carbono-carbono (Murray e Granner, 2002).

Quanto à assimetria, as duas faces da membrana não possuem a mesma composição lipídica (Di et al., 2006), glicídica e protéica. Em geral, os glicídios encontram-se na face externa (Robertson, 1957 e 1960) e as cargas elétricas se distribuem diferentemente, sendo a face citoplasmática, a que tem maior carga negativa, em geral. A fluidez da membrana é essencial para as numerosas funções celulares (García et al., 2005). Ser uma estrutura fluida significa dizer que os seus componentes não ocupam posições definidas e são susceptíveis de difusão lateral de moléculas no plano da membrana (Singer, 1974; Frick et al., 2007) de deslocamentos bidimensionais, de translação ou de rotação e flexibilidade das cadeias acil (Goldstein, 1984). Isso acontece devido ao fato de não ocorrer ligações fortes (covalentes) entre as moléculas, mas sim ligações fracas (ligações de Van der Waals e pontes de hidrogênio)

(Murray e Granner, 2002). Além disso, os fosfolípidios podem trocar de camada em um movimento denominado de *flip-flop* (Goldstein, 1984).

Quanto a permeabilidade diferenciada, aplica-se o conceito de membrana semi-permeável, devido ao fato de ser impermeável aos íons, por isso existem canais iônicos na membrana (Goldberg et al., 2004), diferentemente permeável às moléculas devido ao seu respectivo peso molecular e lipossolubilidade, permeável a água (Agre, 2006) e aos gases como o oxigênio e o gás carbônico (Wang et al., 2007).

A integridade da membrana animal pode ser afetada por vários diferentes fatores principalmente por não possuir parede celular como as células vegetais e bacterianas. A ausência dessa integridade pode comprometer a fisiologia celular e até levar a célula afetada a morte (Mcneil e Steinhardt, 1997).

Os eritrócitos ou células vermelhas do sangue são utilizados em muitos estudos relacionados à composição e ao comportamento de membrana, contribuindo com informações para estimar o comportamento de outras membranas celulares, devido, principalmente, a disponibilidade e acessibilidade. Além disso, qualquer alteração da membrana dos eritrócitos, seja em sua composição ou estabilidade, serve de ferramenta diagnóstica para uma série de doenças e para estudos de comportamentos celulares mediante ganho de idade, exercícios físicos, dieta, etanol e praguicidas (Marigliano et al., 1999; Mazzanti et al., 2002; Gouvêa-e-Silva, 2006; Srinivasan e Kempaiah, 2006; Batista et al., 2007; Firmino, 2007).

Praguicidas

Apesar da sua aplicação em outros setores, a agricultura tem sido a maior fonte de contaminação ambiental por praguicidas (Bastos, 1999). Alguns praguicidas e seus metabólitos têm sido encontrados como poluentes no fundo e superfície de águas, no solo (Kolpin et al., 2004; Fava et al., 2005; Worrall e Besien, 2005), e na atmosfera (Dubus et al., 2000; Duyzer, 2003) e são prováveis responsáveis pela perda da biodiversidade e a deterioração de habitats naturais (Pauli et al., 1999).

O aumento da consciência dos riscos relacionados ao uso intensivo de praguicidas tem levado a uma atitude mais crítica pela sociedade agrícola, gerando mudanças concernentes ao uso para evitar danos ambientais e gerar maior segurança alimentar (Saba e Messina, 2003). As classes de praguicidas são constituídas por grande variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais, e diferentes formas de ação biológica e eliminação. Dentre as classes químicas encontradas temos organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, ditiocarbamatos, organoestânicos, dicarboximidas, bupiridílios, dinitrofenóis, entre outros (INCA, 2005).

Os praguicidas oferecem risco à saúde humana (Hapeman et al., 2003; Sorensen et al., 2003). Pesticidas organoclorados (OCPs) têm sido associados com disfunções do sistema reprodutor (Safe, 2004), doença de Parkinson, e toxicidades envolvendo o sistema neural central (Kamel e Hoppin, 2004). Estudos animais sugerem que exposição a OCPs pode também estar ligado a riscos de defeitos de fetos, doenças respiratórias (Garry et al., 1996), e anormalidades do sistema imunológico (Handy et al., 2002). Apesar de terem sido banidos a mais de 30 anos praguicidas organoclorados permanecem no ambiente por décadas devido à sua longa vida média e podem tornar-se biologicamente concentrados, pois se movem através da cadeia alimentar (Muhlen Dahl, 1999).

Estudos “in vitro” têm mostrado que o praguicida Lindano despolariza a membrana de espermatozoides humanos e inibe a resposta do mesmo a progesterona, um agonista fisiológico que estimula um passo da reação do acrossomo no local da fertilização. Tem sido relatado que Lindano se intercala na membrana do espermatozoide e altera a dinâmica molecular da bicamada (Silvestroni e Palleschi, 1999).

Envenenamento de crianças tem sido associado com exposição materna aos praguicidas nas residências ou local de trabalho (Whyatt et al., 2002; Cerrillo et al., 2005; Ribas-Fitó et al., 2005). Tem sido relatada a presença de praguicidas organofosforados no leite humano (Sanghi et al., 2003).

O potencial neurotóxico de inseticidas organofosforados tem sido descrito (Farahat et al., 2003; Smulders et al., 2004). Praguicidas organofosforados conhecidos por seu

efeito inibitório sobre a acetilcolinesterase, demonstraram em modelos experimentais animais, utilizando doses que são baixas para produzir sinais colinérgicos, uma variedade de efeitos, que variaram desde aumento de dificuldades na aprendizagem a retardamento da condução nervosa (Peeples et al., 2005).

O praguicida clorotalonil tem um potencial para causar danos hepáticos e renais (Suzuki et al., 2004) e consequentemente altera o metabolismo e a excreção de drogas.

Em estudos feitos com ratos tratados oralmente com concentrações baixas e altas de piretróides, foram constatados mudanças nas propriedades físico-químicas da bicamada dos eritrócitos e modificações na atividade de enzimas antioxidantes (Nasuti et al., 2003).

Glifosato

Dentre os herbicidas, o Roundup® (Brasil) é o mais comum (Baylis, 2000). Tem como princípio ativo o Glifosato (N-fosforometilglicina), cujo grupo funcional é a glicina substituída. O uso desse herbicida na agricultura iniciou-se em 1974 para o controle seletivo de ervas daninhas em lavouras de arroz, milho e soja (Smith e Oehme, 1992).

O glifosato é vendido em concentrações de 48% (m/v) e as doses aplicadas são em torno de 5 L/ha (Amarante Junior et al., 2002).

Atualmente, uma variedade de formulações contendo glifosato é produzida nos Estados Unidos, Europa, Ásia e América do Sul (Bukowska et al., 2002) e estão registradas em mais de 100 países, comercializadas com diferentes nomes (Williams et al., 2000).

A agência de proteção ambiental norte americana (EPA-US, 1992), que classifica os herbicidas pela sua toxicidade aguda em quatro categorias onde I é o mais tóxico e IV é o menos tóxico, classifica o glifosato como um herbicida de categoria IV.

Embora a toxicidade aguda do glifosato seja considerada baixa, alguns autores (Sawada, 1988; Dallegrave et al., 2003) têm sugerido que o herbicida pode causar defeitos crônicos de nascimento em determinadas espécies de animais, quando administrado

em doses elevadas e por um período prolongado, e considerando a bioacumulação no organismo, ele se torna potencialmente tóxico.

Os produtos à base de glifosato são mais tóxicos se inalados que absorvidos por via oral; a inalação de Roundup por ratos provocou toxicidade em todos os grupos testados com sintomas que consistiram de falta de ar, olhos congestionados, redução da atividade e perda de peso (EPA-US, 1992).

Os sintomas da toxicidade aguda de glifosato em humanos, inclui dores abdominais, vômitos, excesso de líquido nos pulmões, dores de cabeça, perda de consciência, destruição de células vermelhas do sangue (Sawada, 1988), palpitações cardíacas, dormência facial, coceiras, formigamento entre outros (Temple e Smith, 1992), disfunção dos pulmões, erosão do trato gastrointestinal (Tominack, 1991; Talbot et al., 1991; Temple e Smith, 1992), eletrocardiogramas anormais, danos nos rins (Menkes et al., 1991; Tominack, 1991; Temple e Smith, 1992), danos na laringe (Hung et al., 1997), riscos de ocorrência de linfoma não-Hodgkin que pode formar metástases para muitos órgãos e tumores intestinais.

Há também estudos que relacionaram o glifosato ao aumento da incidência de abortos entre a 12ª e a 19ª semana de gravidez em mulheres de fazendeiros expostas a esse componente em Ontario, Canadá (Arbackie et al., 2001).

Esse herbicida, não-seletivo, inibe o crescimento de plantas através de interferência na produção de aminoácidos aromáticos essenciais por inibição da enzima 5-enolpiruvato-siquimato-3-fosfato-sintetase (EPSPS), que é responsável pela biossíntese do corismato, um intermediário na biossíntese da fenilalanina, triptofano e tirosina, fontes de metabólitos secundários como folatos, ubiquinonas e naftoquinas. Inibe a síntese de clorofila, estimula a produção de etileno, reduz a síntese de proteínas e eleva a concentração do AIA (Ácido indol acético) (Cole, 1985), em vegetais (Kruse et al., 2000; Williams et al., 2000).

O glifosato tem fórmula molecular $C_3H_8NO_3P$ e, na forma de sal de isopropilamônio, apresenta-se acrescido do grupo $(CH_3)_2CHNH_3^+$ (BCPC, 1994). Em condições ambientais, tanto glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos, muito solúveis em água (12g/L

a 25°C, para glifosato) e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, entre outros. Glifosato funde a 200°C possui densidade de 0,5g/cm³ e se apresenta bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60°C (BCPC, 1994).

Os valores de pK encontrados na literatura (Wauchope, 1976; Pastore et al., 1990; BCPC, 1994; Mallat e Barcelo, 1998) para o glifosato são: pK1 = 0,8; pK2 = 2,16; pK3 = 5,46; pK4 = 10,14. Os valores de suas constantes de ionização foram elucidados (Amarante Junior et al., 2002).

Cikalo et al., (1996), consideram um comportamento zwitteriônico do glifosato quando descrevem sua dissociação. Neste caso, nas primeiras dissociações, o glifosato perderia os hidrogênios ligados a oxigênio, e apenas na última dissociação aquele ligado ao nitrogênio.

Fragilidade osmótica de eritrócitos

Para se obter informações sobre a composição e a estrutura das membranas eritrocitárias, assim como averiguar os efeitos de substâncias na sua integridade, geralmente os pesquisadores usam várias abordagens bioquímicas, como o SDS-PAGE (Wagner et al., 2002; Rossi et al., 2006), impedância elétrica (Ivanov et al., 2007), aplicação de enzimas específicas (Nasuti et al., 2003), calorimetria (Wagner et al., 2002), além de técnicas morfológicas, dentre as quais se incluem a microscopia óptica e as microscopias eletrônicas (Murray e Granner, 2002).

Um teste também bastante utilizado, de baixo custo e eficiente na avaliação da estabilidade das membranas (Moeckel et al., 2002; Elias et al., 2004; Aldrich, 2006; Ivanov et al., 2007), assim como na avaliação de efeitos toxicológicos como de praguicidas sobre sua estabilidade, é a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) (Nishihara e Utsumi, 1983; Blasiak et al., 1991; Bhalla e Agrawal, 1998; Nasuti et al., 2003; Barakat, 2005; Batista et al., 2007; Narendra et al., 2007).

A FOE é constantemente usada no diagnóstico de hemoglobinopatias, principalmente esferocitoses, na avaliação do efeito de drogas sobre a hematopoiese

(Sirichotiyakul et al., 2004) e para identificar alterações de membrana em portadores de câncer cervical e de apnéia obstrutiva do sono (Oztürk et al., 2003).

A FOE expressa a habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (Aldrich, 2006). Nesse tipo de teste é conveniente fazer um monitoramento da lise de eritrócitos mediante a leitura de absorbância da hemoglobina em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 540nm (Moeckel et al., 2002).

A osmolaridade com que a célula sofre lise relaciona-se a fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos destaca-se a forma e tamanho celular, razão área/volume, espécie e propriedades inerentes às membranas. Segundo Maede (1980), em pacientes humanos, a FOE é influenciada pela quantidade de colesterol presente na membrana citoplasmática, tornando-se os eritrócitos mais resistentes à medida que aumenta o nível de colesterol sanguíneo. Eritrócitos nucleados são mais resistentes que eritrócitos não-nucleados. Os eritrócitos maiores são proporcionalmente mais resistentes que eritrócitos menores. Eritrócitos de animais ectotérmicos possuem maior resistência osmótica que os endotérmicos. (Aldrich, 2006). A idade do ser vivo exerce influência na FOE. Em humanos verifica-se que eritrócitos de prematuros possuem maior resistência do que recém-nascidos e adultos. O tempo de vida da célula também é muito importante, já que os eritrócitos senescentes, que correspondem a 30% da população eritrocitária, são mais frágeis do que os eritrócitos jovens (Perk et al., 1964).

Os fatores extrínsecos responsáveis pela redução da FOE compreendem variações fisiológicas, como as pós-prandiais, e também variações patológicas, que incluem a presença de hematozoários, uremia, cirrose e processos autoimunes (Makinde e Bobade, 1994).

Outro fator extrínseco cujos efeitos podem ser avaliados pela FOE são os praguicidas, principalmente os inseticidas e herbicidas. (Nishihara e Utsumi, 1983; Blasiak et al., 1991; Bhalla e Agrawal, 1998; Nasuti et al., 2003; Barakat, 2005; Batista et al., 2007; Narendra et al., 2007).

A resistência osmótica diminuída em decorrência da exposição ao DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) já foi observada (Nishihara e Utsumi, 1983) assim como mudanças na fragilidade osmótica de eritrócitos de ratos expostos a hexaclorocicloexano, um outro inseticida organoclorado (Bhalla e Agrawal, 1998).

Em 2005, Barakat utilizando-se de FOE, averiguou os efeitos de quatro inseticidas a citar dursban (organofosfatado), Iannate (carbamato), Lindano (organoclorado) e decametrin (piretróide) sobre eritrócitos humanos e de peixes (*Tilapia niloticus*) com concentrações variando de 10^{-10} a 10^{-4} M. Observaram-se valores relativos de hemólise quando em baixas concentrações de Lindano e decametrin e em altas concentrações com dursban e Iannate.

Atualmente, Batista et al. (2007) observaram efeitos deletérios do herbicida glifosato sobre a estabilidade das membranas de eritrócitos humanos e de ratos Wistar utilizando-se de FOE mesmo dentro das concentrações indicadas pelo fabricante, o que pode justificar o aparecimento de sintomas como hipóxias, tonteados, dores de cabeça, dentre outros, presentes em indivíduos que se expunham a esse herbicida (Delgado e Paumgartner, 2004).

Possíveis mecanismos moleculares, fragilidade osmótica de eritrócitos, pesticidas e danos à saúde

Os pesticidas são considerados como mutagênicos químicos em potencial, e para vários deles e seus componentes, foram demonstradas atividades associadas às alterações dos ácidos nucleicos (Gabbianelli et al., 2004), com possível indução à apoptose celular e alterações dos produtos gênicos finais.

Estudos com piretróides demonstram que essa substância gera alterações na permeabilidade da membrana de eritrócitos com concomitante aumento das enzimas que atuam contra o estresse oxidativo (Nasuti et al. 2003).

A destruição de eritrócitos resulta em hipóxia que é uma causa comum de lesões e danos celulares (Carneiro et al., 2007) podendo gerar fadiga, sentimento

de euforia, náuseas e dores de cabeça, todos sintomas também associados à intoxicação por praguicidas (Sawada, 1988).

Assim como outras moléculas pequenas e anfipáticas, como o etanol, um dos possíveis mecanismos de ação do glifosato sobre as membranas pode ser a diminuição da constante dielétrica do solvente (água) que a envolve e torna possível sua conhecida organização em bicamada, com concomitante diminuição das forças hidrofóbicas entre os seus lipídios, associado, também, com o aumento da pressão osmótica do sistema sanguíneo (Penha-Silva et al. 2008), esses são os mecanismos comuns da ação dos caotrópicos que atuam sobre as forças hidrofóbicas estabilizadoras de proteínas (Fonseca et al. 2006).

Esses efeitos conduzem a membrana do eritrócito para um estado energético mais favorável em termos termodinâmicos na presença do agente praguicida, com a formação das formas expandidas (E) e contraídas (C) dos eritrócitos, ambas com possibilidades de sofrerem lise (Penha-Silva et al. 2008), de acordo com a Figura 1. A Figura 2 mostra as fotomicrografias dos estados E e C de eritrócitos tratados com etanol.

Estudos recentes têm demonstrado que o glifosato, um componente do pesticida mais utilizado na agricultura e considerado de baixo risco pelo EPA-US gera fragilidade osmótica de eritrócitos humanos e de ratos dentro das concentrações indicadas pelos fabricantes. As características da intoxicação por esse praguicida podem ser explicadas pela hipóxia causada pela hemólise dos eritrócitos. Como todos os estudos sobre praguicidas têm demonstrado, cuidados na utilização e precauções para se evitar contaminação do ambiente são essenciais. É ainda incipiente, mas os pesticidas podem estar associados com a aquisição de demências, com o aumento da população de idosos no país, o contato tempo-dependente dos indivíduos com substâncias nocivas aumentam e putativamente, o aumento de demências provocadas por fatores exógenos tende a aumentar também, desse modo a contaminação do ambiente por agrotóxicos e as doenças assim derivadas devem ser consideradas como um problema de saúde pública.

FIGURA 1: Esquema mostrando os estados possíveis para os eritrócitos. Apesar dos praguicidas gerarem lise direta, podem também gerar um estado intermediário de menos energia, o estado (C), que também poderá sofrer lise, dependendo das condições externas como concentração do agente caotrópico, temperatura, fluidez do sangue e outros. (fonte: Nilson-Penha et al. 2008).

FIGURA 2: Fotomicrografia de eritrócitos que sofreram a ação danosa do etanol, marcados com sudan preto. As setas cheias brancas indicam o estado E dos eritrócitos, as setas cheias pretas indicam o estado C e a seta preta fina indica um eritrócito que sofreu lise (barra = 4 μ m). (cedido por Aversi-Ferreira, T. A.).

Referências

- Agre, P. 2006. The aquaporin water channels. **Proceedings of the American Thoracic Society**, 3 (1): 5-13.
- Aldrich, K.; Saunders, D.K. 2006. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**, 26: 179 - 182.
- Amarante Junior, O. P.; Santos, T. C. R.; Brito, N. M.; Ribeiro, M. L. 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, 25 (4): 589-593.
- Arbuckle, T. E.; Lin, Z.; Mert, L. S. 2001. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. **Environmental Health Perspectives**, 109: 851-857.
- Barakat, K. K. 2005. Effect of certain insecticides on the stabilization and lysis of human and fish erythrocyte. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, 1 (2): 195-199.
- Bastos, L. H. 1999. **Investigação da contaminação do solo por organoclorados, na Cidade dos Meninos, Duque de Caxias, RJ, avaliação dentro de um novo cenário, após adição de cal**. Dissertação de Mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, 175pp.
- Batista, M. T. A.; Rodrigues, H. G.; Fonseca, L. C.; Bonetti, A. M.; Penha-Silva, N.; Neres, A. C.; Aversi-Ferreira, T. A. 2007. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3 (supl.)(2): 22-24.
- Baylis, A. D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. **Pest Management Science**, 56: 299-308.
- Bhalla, P.; Agrawal, D. 1998. Alterations in rat erythrocyte membrane due to hexachlorocyclohexane (technical) exposure. **Human and Experimental Toxicology**, 17 (11): 638-642.
- Blasiak, J.; Walter, Z.; Gawronska, M. 1991. The changes of osmotic fragility of pig erythrocytes induced by organophosphorus insecticides. **Acta Biochimica Polonica**, 38 (1): 75-78.
- Boon, J.M.; Smith, B.D. 2002. Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. **Medicinal Research Reviews**, 22, (3): 251 - 281.
- Bukowska, B.; Pieniazek, D.; Duda, W. 2002. Hemolysis and lipid peroxidation in human erythrocytes incubated with roundup. **Current Topics in Biophysics**, 26 (2): 245-249.
- Carneiro, G.; Ribeiro Filho, F. F.; Togeiro, S. M.; Tufik, S.; Zanella, M. T. 2007. Interações entre síndrome da apnéia obstrutiva do sono e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 51 (7): 1035-1040b.
- Cascio, M. 2005. Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1711 (2): 142-153.
- Cerrillo, I.; Granada, A.; López-Espinosa, M. J.; Olmos, B.; Jiménez, M.; Canó, A.; Olea, N.; Olea-Serrano, M. F. 2005. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. **Environmental Research**, 98 (2): 233-239.
- Cikalo, M. G.; Goodal, D. M.; Mathews, W. 1996. Analysis of glyphosate using capillary electrophoresis with indirect detection. **Journal of Chromatography**, 745 (12): 189-200.
- Cole, D. J. 1985. Mode of action of glyphosate - a literature analysis. In: Grossbard, E. & Atkinson, D. (Eds). **The herbicide glyphosate**. Butterworths, London, UK, p.49-54.
- De Weer, P. 2000. A century of thinking about cell membranes. **Annual Review of Physiology**, 62 (1): 919-926.
- Delgado, I. F.; Paumgarten, F. J. R. 2004. Intoxicações e usos de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, 20: 180-185.
- Dallegrave, E.; Mantese, F. D.; Coelho, R. S.; Pereira, J. D.; Dalsenter, P. R.; Langeloh, A. 2003. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicology Letters**, 142: 45-52.
- Di, L.; Liu, W.; Liu, Y.; Wang, J. Y. 2006. Effect of asymmetric distribution of phospholipids ghost membrane from rat blood on peroxidation induced by ferrous ion. **FEBS Letters**, 580: 685-690.
- Dubus, I. G.; Hollis, J. M.; Brown, C. D. 2000. Pesticides in rainfall in Europe. **Environmental Pollution**, 110 (2): 331-344.
- Duyzer, J. 2003. Pesticide concentrations in air and precipitation in the Netherlands. **Journal of Environmental Monitoring**, 5 (4): 77N-80N.
- Elias, F.; Lucas, S. R. R.; Hagiwara, M. K.; Kogika, M. M.; Miranda, M. S. 2004. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, 34 (2): 413-418.
- EPA-US (Environmental Protection Agency U. S.). 1992. Pesticide tolerance for glyphosate. **Federal Register**, 57: 8739-8740.
- Farahat, T. M.; Abdelrasoul, G. M.; Amir, M. M.; Shebl, M. M.; Farahat, F. M.; Anger, W. K. 2003. Neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides. **Occupational Environmental Medicine**, 60 (4): 279-286.
- Fava, L.; Orrù, M. A.; Crobe, A.; Caracciolo, A. B.; Bottoni, P.; Funari, E. 2005. Pesticide metabolites as contaminants of groundwater resources: assessment of the leaching potential of endosulfan sulfate, 2,6-dichlorobenzoic acid 3,4-dichloroaniline 2,4-dichlorophenol and 4-chloro-2-methylphenol. **Microchemical Journal**, 79 (1-2): 207-211.
- Firmino, C. B. 2007. **Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 89pp.
- Fonseca, L. C.; Corrêa, N. C. R.; Garrote-Filho, M. S.; Cunha, C. C.; Penha-Silva, N. 2006. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, 29 (3): 543-548.
- Frick, M.; Schmidt, K.; Nichols, B. J. 2007. Modulation of lateral diffusion in the plasma membrane by protein density. **Current Biology**, 17 (5): 462-467.
- Gabbianelli, R.; Nasuti, C.; Falcioni G.; Cantalamessa, F. 2004. Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrethroids: Effect of supplementation with Vitamins E and C. **Toxicology**, 203 (1-3): 17-26.
- García, J. J.; Martínez-Ballarín, E.; Millán-Plano, S.; Allué, J. L.; Albadea, C.; Fuentes, L.; Escanero, J. F. 2005. Effects of trace elements on membrane fluidity. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 19 (1): 19-22.
- Garry, V. F.; Schreinemachers, D.; Harkins, M. E.; Griffith, J. 1996. Pesticide applicators, biocides, and birth defects in rural Minnesota. **Environmental Health Perspectives**, 104 (4): 394-399.

- Goldberg, G. S.; Valiunas, V.; Brink, P. R. 2004. Selective permeability of gap junction channels. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1662** (1-2): 96-101.
- Goldstein, D. B. 1984. The effects of drugs on membrane fluidity. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, **24**: 43-64.
- Gouvêa-e-Silva, L. F. 2006. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 53pp.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. 1999. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: Halliwell B. & Gutteridge J. M. C. (Eds). **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford University Press, New York, USA, p.246-350.
- Handy, R. D.; Abd-El Samei, H. A.; Bayomy, M. F. F.; Mahran, A. M.; Abdeen, A. M.; El-Elaimy, E. A. 2002. Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. **Toxicology**, **172** (1): 13-34.
- Hapeman, C. J.; McConnell, L. L.; Rice, C. P.; Sadeghi, A. M.; Schmidt, W. F.; Mccarty, G. W.; Starr, J. L.; Rice, P. J.; Angier, J. T.; Harman-Fetcho, J. A. 2003. Current United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service research on understanding agrochemical fate and transport to prevent and mitigate adverse environmental impacts. **Pest Management Science**, **59** (6-7): 681-690.
- Hung, D.; Deng, J.; Wu, T. 1997. Laryngeal survey in glyphosate intoxication: a athophysiological investigation. **Human and Experimental Toxicology**, **16**: 596-599.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer 2005. **Vigilância do Câncer Ocupacional e Ambiental**. Disponível em <http://www.inca.gov.br/inca/Arquivos/publicações/vigilanciadocancerocupacional.pdf>. Acesso em 22 de fevereiro de 2006.
- Ivanov, I.; Tolekova, A.; Chakaarova, P. 2007. Erythrocyte membrane defects in hemolytic anemias found through derivative thermal analysis of electric impedance. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, **70**: 641-648.
- Kamel, F.; Hoppin, J. A. 2004. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. **Environmental Health Perspectives**, **112** (9): 950-958.
- Kolpin, D. W.; Schnoebelen, D. J.; Thurman, E. M. 2004. Degradates provide insight to spatial and temporal trends of herbicides in ground water. **Ground Water**, **42** (4): 601-608.
- Kruse, N. D.; Trezzi, M. M.; Vidal, R. A. 2000. Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, **1** (2): 139-146.
- Lague, P.; Zuckermann, M. J.; Roux, B. 2001. Lipid-mediated interactions between intrinsic membrane proteins: Dependence on protein size and lipid composition. **Biophysical Journal**, **81** (1): 276-284.
- Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Zipursky, S. L.; Darnell, J. 2004. **Molecular Cell Biology**. 5th ed. W. H. Freeman and Company, New York, USA, 1344pp.
- Maede, Y. 1980. Studies on feline haemobartonellosis. VI. Changes of erythrocyte lipids concentration and their relation to osmotic fragility. **Japanese Journal of Veterinary Science**, **42** (3): 281-288.
- Makinde, M. O.; Bobade, P. A. 1994. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Research in Veterinary Science**, **57** (3): 343-348.
- Mallat, E.; Barcelo, D. 1998. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ionexchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-postcolumn derivatization with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, **823**: 129-136.
- Marigliano, V.; Tarzia, A.; Modesti, D.; Masella, R.; Cantafora, A.; Bauco, C.; Salvati, A. M.; Scuteri, A.; Caprari, P. 1999. Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. **Experimental Gerontology**, **34** (1): 47-57.
- Mazzanti, L.; Franceschi, C.; Nanetti, L.; Salvolini, E.; Staffolani, R.; Moretti, N.; Rabini, R. A. 2002. Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. **Experimental Gerontology**, **37**: 657-663.
- Mcneil, P. L.; Steinhardt, R. A. 1997. Loss, restoration, and maintenance of plasma membrane integrity. **Journal Cell Biology**, **137**: 1-4.
- Menkes, D. B.; Temle, W. A.; Edwards, I. R. 1991. Intentional self-poisoning with glyphosate-containing herbicides. **Human Experimental Toxicology**, **10** (1): 103-107.
- Moeckel, G. W.; Shadman R.; Fogel J. M.; Sadrzadeh S. M. H. 2002. Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocytes membrane ATPase. **Life Sciences**, **71** (20): 2413-2424.
- Muhlendahl, K. E. V. 1999. Hormonally active organochlorines and breast cancer: don't believe every abstract. **European Journal Pediatrics**, **158** (7): 603-604.
- Murray, R. K.; Granner, D. K. 2002. **Membranas: estrutura, montagem e função**. In: Granner, D. K.; Mayes, P. A. & Rodwell, V. W. (Eds). **Harper: Bioquímica**. 9^a ed. Atheneu Editora, São Paulo, Brasil, p.505-533.
- Narendra, M.; Bhattacharyulu, N. C.; Padmavathi, P.; Varadacharyulu, N. C. 2007. Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers. **Chemosphere**, **67** (6): 1065-1071.
- Nasuti, C.; Cantalamessa, F.; Falcioni, G.; Gabbianelli, R. 2003. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, **191** (2): 233-244.
- Nishihara, Y.; Utsumi, K. 1983. Diminished osmotic fragility and shape alterations of human erythrocytes following the treatment with 1,1,1-trichloro-2,2-bis(P-chlorophenyl) ethane (DDT). **Cell Molecular Biology**, **29** (1): 103-111.
- Oztürk, L.; Mansour, B.; Yüksel, M.; Gökhan, N. 2003. Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. **Clinica Chimica Acta**, **332**: 83-88.
- Pastore, P.; Lavagnini, I.; Boaretto, A.; Magno, F. 1990. Ion chromatographic determination of N-nitrosoglyphosate in a glyphosate matrix. **Analytica Chimica Acta**, **230**: 29-34.
- Pauli, B. D.; Coulson, D. R.; Berrill, M. 1999. Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to Mimic ® 240 LV insecticide following single or double exposures. **Environmental Toxicology Chemical**, **18** (11): 2538-2544.

- Peebles, E. S.; Schopfer, L. M.; Duysen, E. G.; Spaulding, R.; Voelker, T.; Thompson, C. M.; Lockridge, O. 2005. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry. **Toxicological Sciences**, **83** (2): 303-312.
- Penha-Silva, N.; Arvelos, L. R.; Cunha, C. C.; Aversi-Ferreira, T. A.; Gouvêa-e-Silva, L. F.; Garrote-Filho, M. S.; Finotti, C. J.; Bernardino-Neto, M.; Freitas Reis, F. G. 2008. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, **73**: 23-29.
- Perk, K.; Frei, Y. F.; Herz, A. 1964. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. **American Journal Veterinary Research**, **25**: 1241-1248.
- Ribas-Fitó, N.; Grimalt, J. O.; Marco, E.; Sala, M.; Mazón, C.; Sunyer, J. 2005. Breastfeeding and concentrations of HCB and p,p'-DDE at the age of 1 year. **Environmental Research**, **98** (1): 8-13.
- Robertson, J. D. 1957. The cell membrane concept. **The Journal of Physiology**, **140**: 58-59.
- Robertson, J. D. 1960. The molecular structure and contact relationship of cell membranes. **Progress Biophysics and Biophysical Chemistry**, **10**: 344-418.
- Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A.; Dalle-Donne, I. 2006. Membrane skeletal protein S-glutathionylation and hemolysis in human red blood cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, **37**: 180-187.
- Saba, A.; Messina, F. 2003. Attitudes towards organic foods and risk/benefit perception associated with pesticides. **Food Quality and Preference**, **14** (8): 637-645.
- Safe, S. 2004. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. **Toxicology**, **205** (1-2): 3-10.
- Sanghi, R.; Pillai, M. K.; Jayalekshmi, T. R.; Nair, A. 2003. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. **Human & Experimental Toxicology**, **22** (2): 73-76.
- Sawada, Y. 1988. Probable toxicity of surface-active agent in commercial herbicide containing glyphosate, **Lancet**, **1** (8580): 299.
- Silvestroni, L.; Palleschi, S. 1999. Effects of organochlorine xenobiotics on human spermatozoa. **Chemosphere**, **39** (8): 1249-1252.
- Singer, S. J. 1974. The molecular organization of membranes. **Annual Review of Biochemistry**, **43** (1): 805-833.
- Singer, S. J.; Nicholson, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, **175**: 720-731.
- Sirichotiyakul, S.; Tantipalakon, C.; Sanguanserm, T.; Wanapirak, C.; Tongsong, T. 2004. Erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia trait in pregnancy. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, **86**: 347-350.
- Smith, E. A.; Oehme, F. W. 1992. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Veterinary and Human Toxicology**, **34**: 531-543.
- Smulders, C. J. G. M.; Bueters, T. J. H.; Vailati, S.; Van-Kleef, R. G. D. M.; Vijverberg, H. P. M. 2004. Block of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by organophosphate insecticides. **Toxicological Sciences**, **82** (2): 545-554.
- Sorensen, S. R.; Bending, G. D.; Jacobson, C. S.; Walker, A.; Aamand, J. 2003. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. **FEMS Microbiology Ecology**, **45** (1): 1-11.
- Srinivasan, K.; Kempaiah, R. K. 2006. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, **17**: 471-478.
- Suzuki, T.; Nojiri, H.; Isono, H.; Ochi, T. 2004. Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil. **Toxicology**, **204** (2-3): 97-107.
- Talbot, A. R.; Shiaw, M. H.; Huang, J. S.; Yang, S. F.; Goo, T. S.; Wang, S. H.; Chen, C. L.; Sanford, T. R. 1991. Acute poisoning with a glyphosate-surfactant herbicide ('Roundup'): A review of 93 cases. **Human Experimental Toxicology**, **10** (1): 1-8.
- Temple, W. A.; Smith, N. A. 1992. Glyphosate herbicide poisoning experience in New Zealand. **New Zealand Medical Journal**, **105**: 173-174.
- Tominack, R. L.; Yang, G. Y.; Tsai, W. J.; Chung, H. M.; Deng, J. F. 1991. Taiwan National Poison Center: Survey of glyphosate-surfactant herbicide ingestions. **Clinical Toxicology**, **29** (1): 91-109.
- Tsuda, K.; Nishio, I. 2003. Membrane fluidity and hypertension. **American Journal of Hypertension**, **16** (3): 259-261.
- Wagner, C. T.; Martowicz, M. L.; Livesey, S. A.; Connor, J. 2002. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation. **Cryobiology**, **45**: 153-166.
- Wang, Y.; Cohen, J.; Boron, W. F.; Schulten, K.; Tajkhorshid, E. 2007. Exploring gas permeability of cellular membranes and membrane channels with molecular dynamics. **Journal of Structural Biology**, **157**: 534-544.
- Wauchope, D. 1976. Acid dissociation constants of arsenic acid, methylarsonic acid (MAA), dimethylarsinic acid (cacodylic acid), and N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **24** (4): 717-721.
- Whyatt, R. M.; Camann, D. E.; Kinney, P. L.; Reyes, A.; Ramirez, J.; Dietrich, J.; Diaz, D.; Holmes, D.; Perera, F. P. 2002. Residential pesticide use during pregnancy among a cohort of urban minority women. **Environmental Health Perspectives**, **110** (5): 507-514.
- 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. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, **31**: 117-165.
- Worrall, F.; Besien, T. 2005. The vulnerability of groundwater to pesticide contamination estimated directly from observations of presence or absence in wells. **Journal of Hydrology**, **303** (1): 92-107.
- Wustner, D. 2007. Fluorescent sterols as tools in membrane biophysics and cell biology. **Chemistry and Physics of Lipids**, **146**: 1-25.