



Simulação de pulverização ambiental: Efeitos reprodutivos do glifosato em modelo animal

Jamile Silveira Tomiazzi Simões

Doutora, UNOESTE, Brasil.
jamilie.tomiazzi@gmail.com

Mariana Esperendi Bastianini

Doutoranda, UNOESTE, Brasil.
marianaesperendi@gmail.com

Mariany Kerriany Gonçalves Uzelotto

Doutoranda, UNOESTE, Brasil.
kerriany_gon@yahoo.com.br

Renata Calciolari Rossi

Professora Doutora, UNOESTE, Brasil.
renata@unoeste.br

Ana Paula Alves Favareto

Professora Doutora, UNOESTE, Brasil.
anafavareto@unoeste.br

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos reprodutivos causados pela exposição crônica inalatória ao glifosato em animais. Para isso, foi usado um modelo que simula a pulverização ambiental real com concentrações ambientalmente relevantes do glifosato. Ratos Wistar foram divididos em 4 grupos, expostos a 0 (grupo controle - GC), 20,69 (grupo de baixa concentração - GBC), 34,63 (grupo de média concentração - GMC) ou 51,66 ppm/dia (grupo de alta concentração - GAC). Os animais foram expostos por 15 minutos durante 180 dias. Após o período exposição, os animais sofreram eutanásia e os testículos e epidídimos foram coletados para a análise de contagens, motilidade, morfologia e vitalidade espermáticas. Os números absoluto e relativo de espermatozoides no testículo e epidídimo e a produção espermática diária foram reduzidos em todos os grupos expostos ao herbicida, indicando impacto sobre a espermatogênese. A motilidade progressiva foi reduzida no GAC, com conseqüente aumento da motilidade não progressiva e imóveis. Entretanto não houve atraso no tempo de trânsito espermático no epidídimo. A integridade da membrana plasmática e a porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais foram reduzidas nos grupos expostos, com aumento de anormalidades de cabeça e cauda. A exposição ao glifosato por meio de modelo de simulação de pulverização ambiental afetou a quantidade e qualidade espermática em modelo animal. Isso alerta para riscos à fertilidade masculina, demandando regulação rigorosa sobre o uso de agrotóxicos para prevenir danos à saúde reprodutiva e ambiental. Desta forma, medidas agrícolas mais sustentáveis são cruciais para equilibrar produção e saúde global.

PALAVRAS-CHAVE: Herbicida. Reprodução. Saúde Ambiental.

1 INTRODUÇÃO

A exposição aos agrotóxicos tem sido associada a uma gama de impactos adversos na saúde humana, incluindo distúrbios do sistema nervoso central, malformações, doenças cardíacas, câncer e a diversas alterações reprodutivas (HOPPIN et al., 2007; RIQUINHO, HENNINGTON, 2012; UPADHAYAY et al., 2020; LOMBARDI et al., 2021; WADANI et al., 2022; GILDEN et al., 2023). Estudos têm associado a exposição a estes compostos a alterações na contagem e motilidade dos espermatozoides, desequilíbrios hormonais e um aumento na prevalência de infertilidade masculina (JUREWICZ et al., 2009; LONGO et al., 2021; KAPELEKA, SAULI, NDAKIDEMI, 2021).

Entre os agrotóxicos com potencial toxicidade destaca-se o glifosato (N-fosfonometilglicina) (ZHANG et al., 2017; ISLAM et al., 2018; VAN BRUGGEN et al., 2018; ZHANG et al., 2019), um herbicida amplamente empregados na agricultura mundial (Todd et al., 2020). Ele apresenta a finalidade de controlar o crescimento de vegetação indesejada em culturas e outras áreas agrícolas (LOZANO et al., 2018). Possui amplo espectro, ação pós-emergente e caráter não-seletivo, sendo utilizado em pastagens e nas culturas de milho, arroz e soja, entre outras (AMARANTE, SANTOS, 2002; ROQUETTI, TAKEDA, KUNO, 2011).

Quando presente no solo, este herbicida é prontamente degradado em dióxido de carbono pela atividade microbiana, enquanto que a forma adsorvida do glifosato tem uma taxa de degradação mais lenta ou pode persistir inativa por longos períodos no ambiente (AMARANTE et al., 2002).

A exposição ao glifosato e a outros agrotóxicos pode ocorrer durante a aplicação ou manuseio, bem como por meio da contaminação ambiental (MAMANE et al., 2015). A intoxicação por inalação pode ocorrer em ambientes agrícolas e industriais (YE et al., 2013; WEILER et al., 2018; TARMURE et al., 2020; RATANACHINA et al., 2022), com sugestões de que

esta via possa agravar esses efeitos (WILLIAMS; WATSON; DESESSO, 2012; DE MARIA SERRA et al., 2021; STRILBYSKA et al., 2022).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020) destaca a importância de medidas de segurança durante o uso e manuseio dos agrotóxicos, juntamente com a formulação de políticas públicas para mitigar a exposição ambiental a esses produtos e os potenciais riscos à saúde (DAMALAS, ELEFTHEROHORINOS, 2011; BURALLI et al., 2018; SILVA et al., 2019).

Diante desse cenário, a compreensão aprofundada dos efeitos do glifosato em diferentes contextos torna-se crucial para uma avaliação holística de seus benefícios e riscos, a fim de fornecer uma perspectiva informada sobre esse herbicida e suas implicações para a agricultura, saúde humana e meio ambiente. Ao adotar um método de exposição por inalação, empregar concentrações que refletem as condições ambientais conforme o uso agrícola do herbicida e considerar um período de exposição prolongado (crônico), nossa abordagem busca simular uma exposição ocupacional, com propósito de avaliar os possíveis efeitos sobre a reprodução.

2 OBJETIVOS

Este estudo pretendeu avaliar os potenciais impactos reprodutivos masculinos causados pela exposição crônica inalatória ao herbicida glifosato, por meio de um modelo experimental, com simulação de pulverização ambiental real.

3 METODOLOGIA

3.1 Agentes Químicos

Para a exposição ao glifosato, a formulação comercial à base de glifosato (Roundup®), registrada sob o número 09106, foi utilizada, contendo 480 g/L (360 g/L equivalente ácido) de sal de isopropilamina de glifosato. A formulação foi diluída em 10 mL de solução salina 0,9% (solução de cloreto de sódio – NaCl) nas concentrações prescritas para cada grupo experimental.

3.2 Modelo Animal de Estudo

Ratos Wistar machos adultos (total de n = 40) foram adquiridos junto ao Biotério Central da Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil. Ao longo do experimento, esses animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (43 cm x 30 cm x 15 cm) contendo maravalha de qualidade laboratorial como substrato. As condições de manutenção envolveram um ambiente controlado, com temperatura mantida a 22 ± 2 °C e um ciclo de iluminação de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Alimentação à base de ração para ratos (Supralab®, Alisul, Brasil) e acesso irrestrito a água filtrada foram providos. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UNOESTE (Protocolos nº6063-CEUA), e estritamente seguiu as diretrizes de bem-estar animal estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

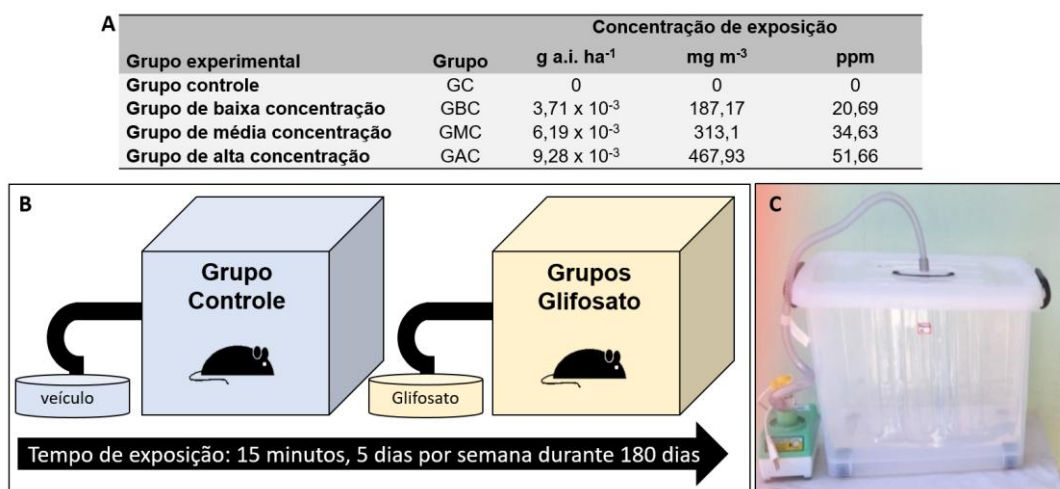
3.3 Grupos Experimentais e Protocolo de Exposição ao Herbicida

Os ratos foram randomicamente divididos em quatro grupos experimentais, totalizando 10 animais por grupo, e expostos a diferentes concentrações de glifosato, conforme Figura 1.

Os ratos do grupo controle (GCI) foram expostos à solução de soro fisiológico 0,9% (veículo) apenas. As concentrações selecionadas para os grupos de exposição ao herbicida refletem níveis ambientalmente relevantes, em consonância com as dosagens de aplicação dos produtos e suas recomendações agrônomicas. As concentrações de glifosato utilizadas na agricultura (expressas em gramas de ingrediente ativo por hectare - g.i.a) foram adaptadas às dimensões das caixas de exposição, conforme mencionado por Parizi et al. (2020) (Figura 1).

Para a exposição dos ratos, foi adotado um sistema composto por duas caixas plásticas (32 x 24 x 32 cm) conectadas a um nebulizador ultrassônico (Pulmosonic Star®, Brasil) (Figura 1), seguindo a metodologia de Mello et al. (2018). Os animais foram submetidos a um período de exposição de 180 dias. A duração da exposição diária (5 dias por semana) por inalação foi de aproximadamente 15 minutos por animal. Esse intervalo de tempo assegurou a completa nebulização da solução.

Figura 1 – Protocolo de exposição. Grupos experimentais e concentrações de exposição ao glifosato em diferentes unidades (A). Modelo de simulação da exposição ao grupo controle e grupos expostos ao glifosato (B). Caixa de exposição acoplada ao nebulizador ultrassônico (C).



Fonte: Elaborado pelos autores, adaptado de Parizi et al. (2020) (A) e Mello et al. (2018) (C).

3.4 Coleta de Materiais Biológicos

Ao término do período de exposição, os ratos de cada grupo experimental foram anestesiados e eutanaziados por administração intraperitoneal de tiopental sódico a uma dose de 100 mg/kg. O testículo direito e os epidídimos foram coletados para as análises espermáticas.

3.5 Avaliação da Motilidade, Morfologia e Integridade Espermática

Imediatamente após a eutanásia, o ducto deferente esquerdo foi coletado para a obtenção de espermatozoides em uma solução salina tampão fosfatada a 34°C. Utilizando uma câmara de contagem de Neubauer aquecida, a motilidade espermática foi avaliada por observação visual (200 espermatozoides por animal, em duplicata), sob um microscópio (Leica DMLS) com ampliação de 200X. Os espermatozoides foram categorizados como imóveis, móveis sem progressão e móveis com progressão, conforme a metodologia de Perobelli et al. (2012).

Para análise da morfologia espermática, o ducto deferente direito foi coletado para fixação dos espermatozoides em formol salino (1,0 mL). A avaliação foi conduzida com auxílio de um microscópio (ampliação de 400X), de acordo com a classificação proposta por Filler (1993).

A integridade da membrana plasmática (vitalidade espermática) foi determinada por meio do teste de coloração de eosina-nigrosina (OMS 1999). Após contagem de 200 espermatozoides em um microscópio de luz (ampliação de 1000X), as células foram divididas em não coradas (indicativo de espermatozoides vivos) e coradas em vermelho (indicativo de espermatozoides mortos).

3.6 Avaliação da Produção Diária de Espermatozoides, Número de Espermatozoides e Tempo de Trânsito no Epidídimo

Os testículos direitos foram desencapsulados e os segmentos cabeça/corpo e cauda do epidídimo direito foram separados. Esses tecidos foram congelados para posterior contagem de espermatozoides. As espermátides no estágio 19 da espermiogênese e os espermatozoides presentes na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram quantificados conforme os protocolos descritos por Robb et al. (1978), com ajustes de Fernandes et al. (2007). A produção diária de espermatozoides (PDE) foi calculada ao dividir o número de espermátides no estágio 19 por 6,1 (representando o número de dias do ciclo seminífero nos quais essas espermátides estão presentes no epitélio seminífero). O tempo de trânsito dos espermatozoides nos segmentos do epidídimo foi determinado dividindo o número total de espermatozoides em cada segmento pela PDE, conforme a metodologia de Robb et al. (1978).

3.7 Análise Estatística

Para a comparação dos parâmetros avaliados, foram conduzidas análises de variância (ANOVA) seguidas do teste de Tukey como pós-teste, ou análises não paramétricas de Kruskal-Wallis seguidas do teste de Dunn. Um teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar a normalidade das distribuições antes das análises estatísticas. Foi considerada significância estatística quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O herbicida glifosato é amplamente empregado na agricultura para facilitar e aumentar a produção de alimentos. Embora esse agrotóxico desempenhe um papel crucial na

produção agrícola, seu uso excessivo pode acarretar diversas consequências adversas para a saúde humana e ambiental (ARL, 2021).

Nos últimos anos, têm sido observada uma diminuição progressiva da função reprodutiva masculina, com possíveis correlações com a exposição à contaminantes ambientais, especialmente a agrotóxicos (GORGA et al., 2020). No presente estudo, as diferentes concentrações de glifosato em exposição inalatória levaram a alterações na quantidade e qualidade de espermatozoides em modelo animal, indicando potencial risco à fertilidade masculina.

Os efeitos tóxicos reprodutivos mais comumente observados após exposição a agrotóxicos incluem: a redução do volume de ejaculação, redução da concentração de testosterona, redução na produção de espermatozoides, diminuição na concentração espermática e alteração na morfologia e motilidade espermática (ROMANO et al., 2012; DAI et al., 2016; OWAGBORIAYE et al., 2017; CAI et al., 2017; ANIFANDIS et al., 2018; VANLAEYS et al., 2018; PHAM et al., 2019; GORGA et al., 2020; JARRELL; AHAMMAD; BENSON, 2020; BWANA MUTWEDU et al., 2021), o que é consistente com os achados de nosso estudo.

Os números absoluto e relativo de espermatozoides no testículo e a produção espermática diária (PDE) absoluta e relativa foram reduzidos em todos os grupos expostos ao herbicida quando comparados ao GC (Tabela 3), indicando impacto sobre a espermatogênese. Entretanto, o peso dos testículos não foi alterado pelo herbicida (Tabela 1).

Tabela 1 - Contagem de espermatozoides no testículo em ratos dos quatro grupos experimentais: Controle (GC) e expostos ao glifosato por via inalatória em diferentes concentrações (GBC, GMC e GAC).

Contagens no testículo	CG	GBC	GMC	GAC
Peso testicular (g)	1,58±0,10	1,59±0,11	1,59±0,13	1,60±0,12
Nº de espermatozoides (x10 ⁶)	196.15±20.43a	181.08±19.98b	178.49±11.31b	176.70±18.18b
Nº de espermatozoides/g (x10 ⁶ /g)	127.11±12.71a	118.55±19.20b	117.00±13.77b	116±15.77b
PDE (x10 ⁶ /testículo/dia)	31.44±3.12a	22.12±2.67b	22.10±1.89b	21.91±1.76b
PDE relativa (x10 ⁶ /g/dia)	21.88±2.44a	17.01±2.52b	16.23±2.61b	16.68±2.30b

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p < 0,05).

Fonte: Elaborado pelos autores.

Dai et al., (2016) observaram alterações das contagens espermáticas e redução do número absoluto e relativo de espermatozoides no testículo e produção diária total e por grama de testículo de ratos expostos as concentrações de 5, 50 e 500mg/kg do herbicida glifosato. Os resultados assemelham-se aos encontrados nesse estudo. Sinais de toxicidade reprodutiva também foram encontrados no estudo de Romano (2012), onde foram observados o decréscimo no número de espermatozoides, na produção diária de espermatozoides e aumento da percentagem de espermatozoides anormais.

Os números absolutos e relativos de espermatozoides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram reduzidos (p < 0,05) nos três grupos expostos ao glifosato, quando comparados ao GC (Tabela 2). Entretanto não houve atraso significativo (p < 0,05) no tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo e cauda do epidídimo em comparação ao GC (Tabela 2), apesar

das alterações de motilidade observadas (Figura 2), que indicam potencial impacto na maturação espermiática.

Tabela 2 - Contagem de espermatozoides no testículo em ratos dos quatro grupos experimentais: Controle (GC) e expostos ao glifosato por via inalatória em diferentes concentrações (GBC, GMC e GAC).

Contagens no epidídimo	CG	GBC	GMC	GAC
Cabeça/corpo				
Nº. de espermatozoides (x10 ⁶)	136.74±22.60a	114.19±19.97b	109.78±21.09b	107.50±22.06b
Nº de espermatozoides/g (x10 ⁶ /g)	345.39±22.70a	321.30±29.82b	319.31±22.83b	318.76±21.81b
Tempo de trânsito (dias)	4.95±1.14	4.87±1.01	4.73±1.05	4.11±1.04
Cauda				
Nº. de espermatozoides (x10 ⁶)	224.25±41.33a	202.06±32.90b	198.37±42.34b	197.04±32.08b
Nº de espermatozoides/g (x10 ⁶ /g)	984.06±89.01a	976.93±68.77a	921.83±102.97b	922.97±77.24b
Tempo de trânsito (dias)	6.56±1.57	7.52±2.46	7.72±1.62	7.09±2.03

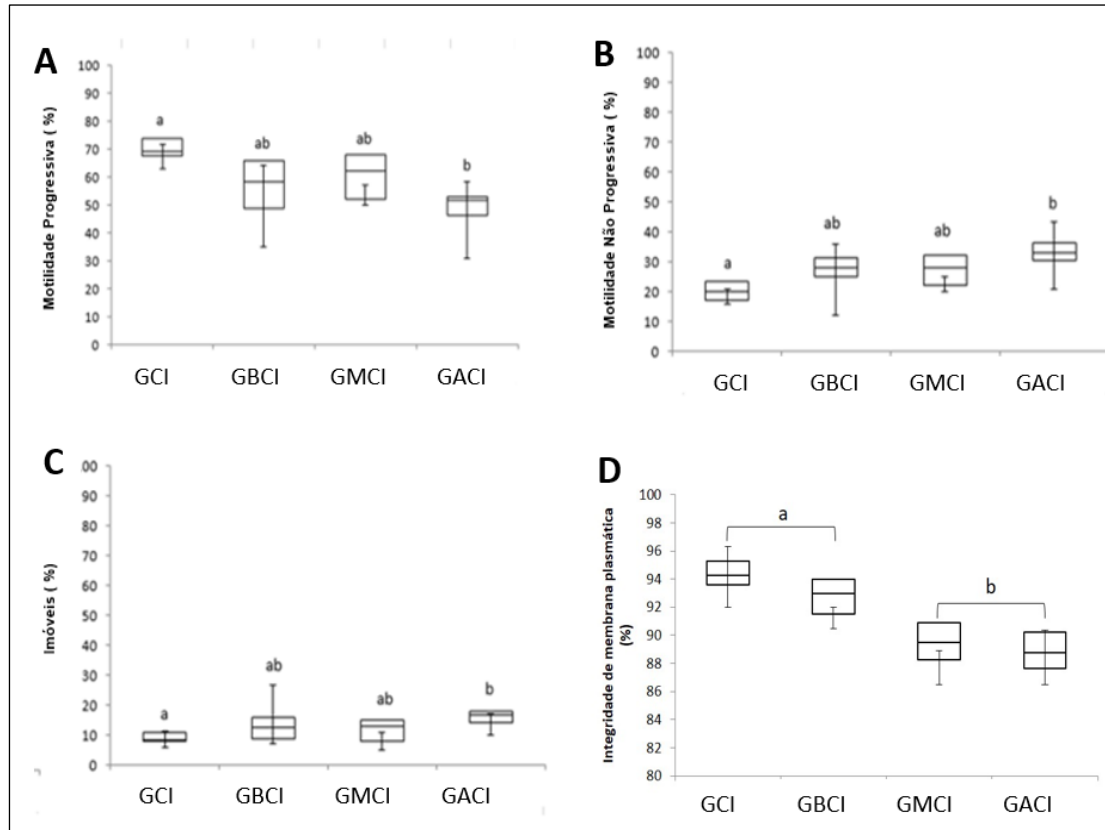
Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p < 0,05).

Fonte: Elaborado pelos autores.

A motilidade dos espermatozoides é um dos aspectos fundamentais em relação à fertilização, pois apenas os espermatozoides móveis conseguem alcançar o ovócito para a fecundação. Portanto, a diminuição na motilidade implica diretamente na capacidade reprodutiva dos espermatozoides (CAI et al., 2017). Inúmeras investigações têm ilustrado os efeitos de agrotóxicos nesse parâmetro específico. Anifandis et al., (2018) realizaram um estudo com amostras de espermatozoides expostos a 1mg/L de glifosato após 1 hora e observaram a diminuição na motilidade progressiva.

No presente estudo, a porcentagem de espermatozoides com movimentação progressiva (Figura 2A) apresentou-se reduzida significativamente (p < 0,05) no GAC quando comparados ao GC, e semelhantes entre os grupos expostos ao glifosato (p > 0,05). Consequentemente, a porcentagem de espermatozoides com motilidade não progressiva (Figura 2B) e de imóveis (Figura 2C) foi aumentada nos animais expostos à maior concentração do herbicida. Isso demonstra que houve uma tendência de redução da capacidade móvel dos espermatozoides em todas as concentrações de exposição ao glifosato, no entanto, apenas na maior concentração a diferença foi estatisticamente significativa (p < 0,05). Os grupos de média e alta concentração de exposição foram os que mais apresentaram alterações, sendo um indicativo de que a dose de exposição está diretamente relacionada aos danos espermiáticos, conforme estudo de Joshi et al. (2012).

Figura 2 – Motilidade espermática (A-C) e integridade de membrana plasmática (D) dos quatro grupos experimentais: Controle (GC) e expostos ao glifosato por via inalatória em diferentes concentrações (GBC, GMC e GAC).



Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelos autores.

A análise da morfologia dos espermatozoides também desempenha um papel significativo não apenas na avaliação da funcionalidade dos testículos, mas também como um indicador do estresse induzido pelo ambiente. Anomalias na forma dos espermatozoides podem indicar mudanças que ocorreram durante o processo de espermatogênese, afetando diretamente sua capacidade de fertilização (NAJAFI, 2015). No presente estudo, houve redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais, com consequente aumento de anormalidades de cabeça e cauda nos grupos expostos, quando comparados ao GC (Tabela 3). Além disso, a integridade da membrana plasmática foi reduzida ($p < 0,05$) nos grupos GMC e GAC expostos ao glifosato em comparação com o GC e GBC (Figura 2D).

Tabela 3 - Morfologia espermática em ratos dos quatro grupos experimentais: Controle (GC) e expostos ao glifosato por via inalatória em diferentes concentrações (GBC, GMC e GAC).

Morfologia	CG	GBC	GMC	GAC
Normal (%)	96,50 (94,00-99,00)a	90,00 (83,00-95,00)b	88,60 (78,00-94,00)b	86,30 (76,00-91,00)b
Anormalidades de cabeça (%)	2,00 (1,00-11,00)a	4,50 (1,00-14,00)a	5,50 (1,00-17,00)ab	8,00 (2,00-19,00)b
Anormalidades de cauda (%)	0,27 (0,00-1,00)a	0,70 (0,00-3,00)ab	1,07 (0,00-3,00)b	1,72 (0,00-8,00) bc

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelos autores.

A redução de espermatozoides morfológicamente normais e o aumento de anormalidades de cabeça e cauda de espermatozoides se assemelham às alterações encontradas no estudo de Owagboriaye et al. (2017). Estes autores observaram uma redução significativa no número de espermatozoides morfológicamente normais em ratos expostos ao glifosato. Os autores propõem que tais alterações tenham um impacto negativo sobre a saúde reprodutiva dos ratos resultantes a exposição ao herbicida. Romano et al. (2010) também encontraram uma redução significativa nas concentrações de testosterona e alterações na morfologia testicular de ratos machos expostos ao glifosato em diferentes doses. Assim como nesse estudo, a ocorrência de alterações morfológicas e a redução de espermatozoides normais com aumento de anormalidades de cabeça e cauda nos grupos expostos indicam que a utilização do glifosato pode alterar a qualidade espermática.

5 CONCLUSÃO

Os resultados revelaram que a exposição inalatória ao glifosato em concentrações ambientalmente relevantes realizada com um modelo que simula a pulverização ambiental real levou a alterações significativas tanto na quantidade, quanto na qualidade dos espermatozoides animais. As diferentes concentrações de exposição demonstraram efeitos graduais, onde as concentrações mais elevadas apresentaram os maiores danos. Particularmente, observou-se uma diminuição na motilidade espermática, um fator crucial para a fertilização bem-sucedida, além de alterações na morfologia dos espermatozoides e na integridade da membrana plasmática. Essas alterações indicam um potencial risco à fertilidade masculina, reforçando a importância de regulamentações rigorosas na utilização de agrotóxicos para minimizar impactos adversos. Em síntese, os resultados deste estudo reforçam a necessidade de outros estudos e uma análise cuidadosa dos riscos associados ao uso do glifosato e de outros agrotóxicos, considerando seu impacto sobre a saúde reprodutiva masculina e a possibilidade de transmissão de efeitos negativos para as gerações futuras. Medidas regulatórias e estratégias de manejo mais sustentáveis na agricultura podem ser necessárias para equilibrar a produção de alimentos e a preservação da saúde humana e ambiental.

6 AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001 e Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE).

7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T.C.R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, v. 25, p. 589-593, 2002. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/Z9DJG6fy8ZQR79ch8cdxwVP/?lang=pt>> Acesso em: 19 jun. 2022. doi: 10.1590/S0100-40422002000400014.

ANIFANDIS, G. et al. The effect of glyphosate on human sperm motility and sperm DNA fragmentation. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 6, p. 1117, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/15/6/1117>> Acesso em: 20 jun. 2022. doi: 10.3390/ijerph15061117.

ARL, R. **Toxicidade reprodutiva do glifosato e herbicidas à base de glifosato**: uma abordagem bibliográfica. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Farmácia). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2021.

BURALLI, R. J. et al. Respiratory condition of family farmers exposed to pesticides in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 6, p. 1203, 2018. doi: 10.3390/ijerph15061203.

CAI, W. et al. Effects of glyphosate exposure on sperm concentration in rodents: A systematic review and meta-analysis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 55, p. 148-155, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668917302041>> Acesso em: 20 jun. 2022. doi: 10.1016/j.etap.2017.07.015.

DAI, P. et al. Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 5, p. 519-526, 2016.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 5, p. 1402-1419, 2011. doi: 10.3390/ijerph8051402.

DE MARIA SERRA, F. et al. Subchronic exposure to a glyphosate-based herbicide causes dysplasia in the digestive tract of Wistar rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 43, p. 61477-61496, 2021. doi: 10.1007/s11356-021-15051-6.

FILLER, R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. **Methods in Toxicology**, v. 3, p. 334-343, 1993.

GILDEN, R. C. et al. Systematic Review: Association of Pesticide Exposure and Child Wheeze and Asthma. **Current Pediatric Reviews**, v. 19, n. 2, p. 169-178, 2023. doi: 10.2174/1573396318666220510124457.

GORGA, A. et al. In vitro effects of glyphosate and Roundup on Sertoli cell physiology. **Toxicology in Vitro**, v. 62, p. 104682, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233319304588> Acesso em: 20 jun. 2022. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104682.

HOPPIN, J. A. et al. Pesticides and other agricultural factors associated with self-reported farmer's lung among farm residents in the Agricultural Health Study. **Occupational and environmental medicine**, v. 64, n. 5, p. 334-341, 2007. Disponível em: <<https://oem.bmj.com/content/64/5/334>> Acesso em: 19 jun. 2022. doi: 10.1136/oem.2006.028480.

ISLAM, F. et al. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment Internacionalo** 111, p. 332-351, 2018. doi: 10.1016/j.envint.2017.10.020.

JARREL, Z. R.; AHAMMAD, M. U.; BENSON, A. P. Glyphosate-based herbicide formulations and reproductive toxicity in animals. **Veterinary and animal science**, v. 10, 100126, 2020.

JOSHI, S. C.; TIBREWAL, P.; SHARMA, A.; SHARMA, P. Evaluation of toxic effect of 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) on fertility and biochemical parameters of male reproductive system of albino rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 338-342, 2012.

JUREWICZ, J. et al. Environmental factors and semen quality. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 22, n. 4, p. 305-29, 2009. doi: 10.2478/v10001-009-0036-1.

KAPELEKA, J. A.; SAULI, E.; NDAKIDEMI, P. A. Pesticide exposure and genotoxic effects as measured by DNA damage and human monitoring biomarkers. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 31, n. 7, p. 805-822, 2021. doi: 10.1080/09603123.2019.1690132.

LOMBARDI, C. et al. Residential proximity to pesticide application as a risk factor for childhood central nervous system tumors. **Environmental research**, v. 197, p. 111078, 2021. doi: 10.1016/j.envres.2021.111078.

LONGO, V. et al. Human biomonitoring of environmental and occupational exposures by gc-ms and gas sensor systems: A systematic review. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 19, p. 10236, 2021. doi: 10.3390/ijerph181910236.

LOZANO, V. L. et al. Effects of glyphosate and 2, 4-D mixture on freshwater phytoplankton and periphyton communities: a microcosms approach. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 148, p. 1010-1019, 2018. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.006.

MAMANE, A. et al. Occupational exposure to pesticides and respiratory health. **European Respiratory Review**, v. 24, n. 136, p. 306-319, 2015. doi: 10.1183/16000617.00006014

MELLO, F. A. et al. Evaluation of the nasal cavity mice submitted to the inhalation exposure to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **Medicina (Ribeirão Preto, Online)**, v. 51, n. 4, p. 247-253, 2018. doi: 10.11606/issn.2176-7262.v51i4p247-253

MUTWEDU, V. B. et al. Growth performance and reproductive function impairment of glyphosate-based herbicide in male guinea pig (*Cavia porcellus*). **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 3, p. 1047-1055, 2021.

NAJAFI, T.F. et al. Air pollution and quality of sperm: a meta-analysis. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 15, n.4, e26930, 2015. doi: 10.5812/ircmj.17(4)2015.26930

OWAGBORIAYE, F. O. et al. Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 69, n. 7, p. 461-468, 2017.

PEROBELLI, J. E. et al. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reproductive toxicology**, v. 33, n. 3, p. 308-315, 2012. doi: 10.1016/j.reprotox.202011.12.011

PHAM, T. H. et al. Perinatal exposure to glyphosate and a glyphosate-based herbicide affect spermatogenesis in mice. **Toxicological Sciences**, v. 169, n. 1, p. 260-271, 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/toxsci/article/169/1/260/5345574?login=false>> Acesso em: 20 jun. 2022. doi: 10.1093/toxsci/kfz039.

RATANACHINA, J. et al. Farming, pesticide exposure and respiratory health: a cross-sectional study in Thailand. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 79, n. 1, p. 38-45, 2022. doi: 10.1136/oemed-2020-107325.

RIQUINHO, D. L.; HENNINGTON, E. A. Health, environment and working conditions in tobacco cultivation: a review of the literature. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1587-1600, 2012.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 103-107, 1978. doi: 10.1530/jrf.0.0540103

ROMANO, M. A. et al. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 4, p. 663-673, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22120950/>> Acesso em: 19 jun. 2022. doi: 10.1007/s00204-011-0788-9.

ROMANO, R. M. et al. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 4, p. 309-317, 2010. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-009-0494-z>> Acesso em: 19 jun. 2022. doi: 10.1007/s00204-009-0494-z.

ROQUETTI, M. H.; TAKEDA, S.H.K.; ROUBICEK, D. A.; KUNO, R. Agrotóxicos: Proposta de metodologia para derivar critérios de qualidade da água para consumo humano. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, 17., 2011, Ribeirão Preto. *Revista Brasileira de Toxicologia*. 2011. v. 24, p. 52.

SILVA, A. M. C. et al. Environmental exposure to pesticides and breast cancer in a region of intensive agribusiness activity in Brazil: a case-control study. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 20, p. 3951, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/16/20/3951/htm>> Acesso em: 17 jun. 2022. doi: 10.3390/ijerph16203951.

STRILBYSKA, O. M. et al. The effects of low-toxic herbicide Roundup and glyphosate on mitochondria. **EXCLI journal**, v. 21, p. 183, 2022. doi: 10.17179/excli2021-4478.

TARMURE, S. et al. Influence of pesticides on respiratory pathology-a literature review. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 27, n. 2, 2020. Disponível em: <<https://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-afa88487-fbb6-4f04-8f28-b18ec18aa239>> Acesso em: 19 jun. 2022. doi: 10.26444/aaem/121899.

TODD, O. E. et al. Synthetic auxin herbicides: finding the lock and key to weed resistance. **Plant Science**, v. 300, p. 110631, 2020. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110631.

UPADHAYAY, J. et al. Impact of pesticide exposure and associated health effects. **Pesticides in crop production: physiological and biochemical action**, p. 69-88, 2020. doi: 10.1002/9781119432241.ch5.

VAN BRUGGEN, A. H. C. et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of the total environment**, v. 616, p. 255-268, 2018. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.309.

VANLAEYS, A. et al. Formulants of glyphosate-based herbicides have more deleterious impact than glyphosate on TM4 Sertoli cells. **Toxicology in Vitro**, v. 52, p. 14-22, 2018. doi: 10.1016/j.tiv.2018.01.002.

WADANI, Z. H. et al. Pesticides use and impaired lung function among male agricultural farmers in rural Sindh, Pakistan. **Asia Pacific Journal of Public Health**, v. 34, n. 2-3, p. 230-235, 2022. doi: 10.1177/10105395211065647.

WEILER, B. A. et al. Small airways disease in an Operation Desert Storm Deployer: Case report and review of the literature on respiratory health and inhalational exposures from Gulf War I. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 61, n. 10, p. 793-801, 2018. doi: 10.1002/ajim.22893.

WHO (World Health Organization). Chemical safety: Pesticides, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/chemical-safety-pesticides>> Acesso em: 18 fev. 2023

WHO (World Health Organization). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. **Cambridge University Press**, United Kingdom, 4ed, p. 128, 1999. Disponível em: <https://www.aab.org/images/WHO%204th%20manual.pdf> Acesso em: maio 2019.

WILLIAMS, A. L.; WATSON, R. E.; DESESSO, J. M. Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 15, n. 1, p. 39-96, 2012. doi: 10.1080/10937404.2012.632361.

YE, M.; BEACH, J.; MARTIN, J. W.; SENTHILSELVAN, A. Occupational pesticide exposures and respiratory health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6442-6471, 2013. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/10/12/6442/htm>> Acesso em: 19 jun. 2022. doi: 10.3390/ijerph10126442.

ZHANG, D. et al. Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces oxidative stress and apoptosis in mouse testis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 141, p. 18-22, 2017. doi: 10.1016/j.pestbp.2016.10.006.

ZHANG, J. W.; XU, D. Q.; FENG, X. Z. The toxic effects and possible mechanisms of glyphosate on mouse oocytes. **Chemosphere**, 237, 124435, 2019.