



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

LUCAS LEONARDO FRANÇA DE OLIVEIRA

EFEITO DA NANOPARTÍCULA DE FERRIHIDRITA CONTRA ESTRESSE
OXIDATIVO PROMOVIDO POR HERBICIDAS EM RATAS WISTAR

Londrina

2023

LUCAS LEONARDO FRANÇA DE OLIVEIRA

**EFEITO DA NANOPARTÍCULA DE FERRIHDRITA CONTRA ESTRESSE
OXIDATIVO PROMOVIDO POR HERBICIDAS EM RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cássia Thaïs B. V. Zaia

**Londrina
2023**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

D278 de Oliveira, Lucas Leonardo França.
EFEITO DA NANOPARTÍCULA DE FERRIHIDRITA CONTRA ESTRESSE OXIDATIVO PROMOVIDO POR HERBICIDAS EM RATAS WISTAR / Lucas Leonardo França de Oliveira. - Londrina, 2023.
49 f.

Orientador: Cássia Thaïs Bussamra Vieira Zaia.
Coorientador: Ernane Torres Uchôa .
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2023.
Inclui bibliografia.

1. glifosato - Tese. 2. atrazina - Tese. 3. Roundup® - Tese. 4. antioxidante - Tese. I. Zaia, Cássia Thaïs Bussamra Vieira. II. , Ernane Torres Uchôa. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

CDU 612

LUCAS LEONARDO FRANÇA DE OLIVEIRA

**EFEITO DA NANOPARTÍCULA DE FERRIHIDRITA CONTRA ESTRESSE
OXIDATIVO PROMOVIDO POR HERBICIDAS EM RATAS WISTAR**

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Profa. Dra. Cássia Thais Bussamra Vieira Zaia
Universidade Estadual de Londrina-UEL
Orientadora: Presidente da Banca

Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Suplentes:

Profa. Dra. Graziela Scialanti Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Londrina, 5 de junho de 2023

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Thaïs Zaia, por todo carinho, paciência, disponibilidade para qualquer situação e todos os ensinamentos, com certeza lembrarei desses momentos por toda a minha vida. Sem dúvidas você é um exemplo de docente e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Dimas Augusto Morozin Zaia, pelo apoio, auxílio, colaboração com a síntese das nanopartículas de ferrihidrita e todo o auxílio neste trabalho sempre que necessário. Agradeço também a todos os membros do Laboratório de Química Prebiótica (LQP), especialmente ao Giulio.

Ao Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa pela orientação e oportunidade de desenvolver esse trabalho nos laboratórios do Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo (LaFiNeM), fornecendo todo o suporte sempre que necessário.

Um agradecimento especial à Profa. Cláudia Bueno dos Reis Martinez por ter cedido a estrutura do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) e aos alunos que auxiliaram nas análises desenvolvidas nesse projeto, principalmente à Dra. Mariana Lauer e ao MSc. Thiago Alvim.

Aos professores, Dr. Fábio Goulart de Andrade, Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior, Dra. Graziela Sciantti Ceravolo e Dra. Flávia Alessandra Guarnier por terem aceito o convite para compor a banca examinadora e, com isso, enriquecer este trabalho.

Aos colegas que já fizeram ou fazem parte do LaFiNeM: Andressa, Ana, Camila, Larissa, Letícia, Maria Heloísa, Marcela, Nicole, Polyana, Renato, Rhauany e Fabiano

Gostaria de agradecer especialmente ao Fabiano por todos os momentos descontraídos, as músicas, as conversas e claro, por toda a ajuda com este trabalho, com certeza isso tudo não seria possível sem você, obrigado por tornar os nossos dias de trabalho mais leves e divertidos.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e aos técnicos, especialmente o Afonso e a Fujiko sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Aos meus pais, Carlos Alexandre de Oliveira e Andréa França de Oliveira, por todo o apoio, incentivo e por sempre terem investido e acreditado

em mim, me fornecendo educação de qualidade e me apoiando em cada decisão, sem eles nada do que realizei seria possível. À minha irmã, Juliana, por ser companheira e sempre me divertir.

Agradeço também a minha noiva, Yhassodara Narimatsu, por todo o apoio nessa parte final do trabalho e por me incentivar a sempre realizar tudo com excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa.

Ao PRONEX - CNPq - Fundação Araucária (convênio 250/2013, protocolo- 24732) pelo auxílio financeiro.

**``Quanto mais eu estudo a natureza,
mais me maravilho com a obra do
Criador``**

Louis Pasteur

DE OLIVEIRA, LUCAS LEONARDO FRANÇA. **Efeito da nanopartícula de ferrihidrita contra estresse oxidativo promovido por herbicidas em ratos Wistar**. 2023. 49p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas, Londrina, 2023.

RESUMO

O Brasil é uma das maiores potências agrícolas do mundo. Essa elevada produção se deve ao emprego de agrotóxicos, principalmente os herbicidas. Uma forma de avaliar efeitos tóxicos em seres vivos é por meio do estresse oxidativo, que é caracterizado por um desbalanço a favor de pró-oxidantese contra a capacidade do organismo em combater suas ações por meio das defesas antioxidantes. Trabalhos mostram que o glifosato, Roundup® e a atrazina são capazes de provocar danos oxidativos em lipídeos e proteínas pela diminuição das defesas antioxidantes ou aumento de espécies reativas. Neste contexto, as nanopartículas de óxido de ferro, como a ferrihidrita, por terem a capacidade de adsorver contaminantes, apresentam potencial capacidade de minimizar esses efeitos. Desta forma, este trabalho avaliou a capacidade de proteção da nanopartícula de ferrihidrita contra alterações provocadas pelo glifosato, Roundup® e atrazina. Para isso, 72 fêmeas adultas de ratos Wistar foram organizadas em grupos que receberam os contaminantes ou a ferrihidrita isolados, ou a associação de ambos; o grupo controle recebeu água de torneira. O estresse oxidativo foi determinado pelas análises da glutathiona reduzida (GSH), catalase (CAT), glutathiona-S-transferase (GST), carbonilação proteica (PCO) e lipoperoxidação (LPO), nos tecidos hepático, renal e cerebral e acetilcolinesterase (AChE) no cérebro. Animais expostos à ferrihidrita isolada apresentaram redução da PCO no fígado e diminuição da atividade da GST no cérebro. O glifosato reduziu a PCO no fígado e a LPO e PCO no rim e aumentou a concentração de GSH no fígado, sendo que a ferrihidrita associada ao glifosato evitou essas alterações. A ferrihidrita evitou a redução da LPO no rim, mas não o aumento da concentração de GSH no cérebro, promovidos pelo Roundup®. A ferrihidrita evitou a diminuição da atividade da CAT no rim, mas não o aumento da GSH e redução da LPO, no cérebro, promovidos pela atrazina. Não houve alteração de AChE no cérebro exceto aumento da enzima para o grupo que recebeu a associação da nanopartícula com a atrazina. Sendo assim, conclui-se que a ferrihidrita foi capaz de evitar parcialmente as alterações de estresse oxidativo causadas pelo glifosato, Roundup® e atrazina.

Palavras-chave: glifosato; atrazina; Roundup®; antioxidante; lipoperoxidação.

DE OLIVEIRA, LUCAS LEONARDO FRANÇA. **Effect of ferrihydrite nanoparticle against oxidative stress promoted by herbicides in Wistar rats.** 2023. 49p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas, Londrina, 2023.

ABSTRACT

Brazil is one of the greatest agricultural powers in the world. This high production is due to the use of pesticides, mainly herbicides. One way to assess toxic effects in living beings is through oxidative stress, which is characterized by an imbalance in favor of pro-oxidant and against the body's ability to combat its actions through antioxidant defenses. Studies show that glyphosate, Roundup® and atrazine are capable of causing oxidative damage to lipids and proteins by reducing antioxidant defenses or increasing reactive species. In this context, iron oxide nanoparticles, such as ferrihydrite, due to their ability to adsorb contaminants, have the potential to minimize these effects. Thus, this work evaluated the protective capacity of the ferrihydrite nanoparticle against alterations caused by glyphosate, Roundup® and atrazine. For this, 72 adult female Wistar rats were organized into groups that received isolated contaminants or ferrihydrite, or a combination of both; the control group received tap water. Oxidative stress was determined by analysis of reduced glutathione (GSH), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), protein carbonylation (PCO) and lipoperoxidation (LPO) in liver, kidney and brain tissues and acetylcholinesterase (AChE) in the brain. Animals exposed to isolated ferrihydrite showed a reduction in PCO in the liver and a decrease in GST activity in the brain. Glyphosate reduced PCO in the liver and LPO and PCO in the kidney and increased the concentration of GSH in the liver, and ferrihydrite associated with glyphosate prevented these changes. Ferrihydrite prevented the reduction of LPO, in the kidney, but not the increase in the concentration of GSH, in the brain, promoted by Roundup®. Ferrihydrite prevented the decrease in CAT activity in the kidney, but not the increase in GSH and reduction in LPO in the brain, promoted by atrazine. There was no change in AChE in the brain, except for an increase in the enzyme for the group that received the association of the nanoparticle with atrazine. Therefore, it is concluded that ferrihydrite was able to partially avoid the changes in oxidative stress caused by glyphosate, Roundup® and atrazine.

Key words: glyphosate; atrazine; Roundup®; antioxidant; lipid peroxidation.

Lista de Figuras e Tabela

- Figura 1** Valores no tecido hepático de glutathiona-reduzida (GSH), glutathiona-S-transferase (GST), catalase (CAT), malondialdeído (MDA) e proteína carbonil (PCO) de ratas que receberam, via gavagem, dose única diária (1000 mg/kg de peso corpóreo), por 4 dias, de água de torneira (C, controle), nanopartícula de ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R), atrazina (A) ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas. **26**
- Figura 2** Valores no tecido renal de glutathiona-reduzida (GSH), glutathiona-S-transferase (GST), catalase (CAT), malondialdeído (MDA) e proteína carbonil (PCO) de ratas que receberam, via gavagem, dose única diária (1000 mg/kg de peso corpóreo), por 4 dias, de água de torneira (C, controle), nanopartícula de ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R), atrazina (A) ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas. **27**
- Figura 3** Valores no tecido nervoso de glutathiona-reduzida (GSH), glutathiona-S-transferase (GST), malondialdeído (MDA), proteína carbonil (PCO) e acetilcolinesterase (AChE) de ratas que receberam, via gavagem, dose única diária (1000 mg/kg de peso corpóreo), por 4 dias, de água de torneira (C, controle), nanopartícula de ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R), atrazina (A) ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas. **28**
- Tabela 1** Compilação dos resultados obtidos em tecidos de ratas Wistar: glutathiona-reduzida (GSH, $\mu\text{g GSH.g prot}^{-1}$), glutathiona-S-transferase (GST, $\text{nmol CDNB conjugado.min}^{-1}.\text{g prot}^{-1}$), catalase (CAT, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{g prot}^{-1}$), malondialdeído (MDA, $\mu\text{mol.g prot}^{-1}$), proteína carbonil (PCO, $\text{nmol carbonil.g prot}^{-1}$) e acetilcolinesterase (AChE, $\text{nmol DTNB.min}^{-1}.\text{g prot}^{-1}$). **29**

Lista de abreviaturas

A: atrazina

AChE: acetilcolinesterase

ALDH: aldeído desidrogenase

BChE: butirilcolinesterase

CAT: catalase

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CIF: Departamento de Ciências Fisiológicas

DNPH: 2,4-dinitrofenil-hidrazina

EPSPS: 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase

ERO: espécies reativas de oxigênio

F: ferrihidrita

G: glifosato

GPx: glutaciona-peroxidase

GR: glutaciona-redutase

GSH: glutaciona-reduzida

GST: glutaciona-S-transferase

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

LaFiNeM-UEL: Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo da UEL

LEFA-UEL: Laboratório de Ecofisiologia Animal da UEL

LFNA-UEL: Laboratório de Física Nuclear Aplicada da UEL

LPO: Lipoperoxidação

LQP-UEL: Laboratório de Química Prebiótica da UEL

MDA: malondialdeído

PCO: carbonilação proteica

POEA: polioxietilenoamina

R: Roundup®

SNK: Student Newman Keuls

SOD: superóxido dismutase

SPEC-UEL: Laboratório de Espectroscopia da UEL

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivos gerais.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 METODOLOGIA	19
3.1 Animais.....	20
3.2 Nanopartícula.....	20
3.3 Herbicidas	20
3.4 Protocolo experimental.....	21
3.5 Eutanásia.....	22
3.6 Análises bioquímicas do estresse oxidativo	22
3.6.1 Antioxidante não enzimático.....	22
3.6.2 Enzimas antioxidantes.....	23
3.6.3 Lipoperoxidação (LPO).....	23
3.6.4 Carbonilação proteica (PCO).....	23
3.6.5 Acetilcolinesterase (AChE).....	23
3.7 Análise estatística	23
4 RESULTADOS	25
4.1 Efeito da nanopartícula de ferrihidrita.....	25
4.2 Efeito do glifosato e da associação deferridrita com glifosato	25
4.3 Efeito do Roundup® e da associação deferridrita com Roundup®	25
4.4 Efeito da atrazina e da associação deferridrita com atrazina	25
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	36
7 REFERÊNCIAS	37
Anexo 1: Aprovação da CEUA	48

1 INTRODUÇÃO

O elevado crescimento populacional das últimas décadas impôs a necessidade de aumentar a produção de alimentos (RIGOTTO et al., 2014). O Brasil é atualmente uma das maiores potências agrícolas do mundo (EMBRAPA, 2018; EMBRAPA, 2022) e, de acordo com os dados mais recentes da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, foi o maior exportador das seguintes commodities em 2021: soja, café, açúcar bruto e cana-de-açúcar, algodão e laranja (FAOSTAT, 2023). Essa elevada produção se deve a alguns fatores, como: melhoramento genético, mecanização do campo, ao emprego de transgênicos e, principalmente, à elevada utilização de agrotóxicos, mesmo sendo danosos em organismos vivos (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2016).

A partir de 2008, o Brasil assumiu o posto de maior consumidor mundial de agrotóxicos (PELAEZ, 2012), onde cada brasileiro é exposto, em média, a 7 litros por ano dessas substâncias (CARNEIRO, 2015). Em 2018, a agricultura brasileira utilizou 549.280,44 toneladas de ingredientes ativos e, no primeiro semestre de 2020, a área tratada com agrotóxicos cresceu 7,3% (EMBRAPA, 2020). Entre 2016 e 2019 mais de 1200 agrotóxicos foram registrados, sendo que quase a metade destes estão presentes na lista da *Pesticide Action Network's*, uma organização não governamental que lista os pesticidas altamente perigosos (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2020). Países em desenvolvimento, como o Brasil, se destacam pela utilização irregular e excessiva de agrotóxicos (GONÇALVES, 2012). Como consequência, a população é exposta a diversas classes e quantidades cada vez maiores desses produtos (CARNEIRO, 2015).

Diante disso, Ramos et al. (2021) avaliaram a saúde de agricultores expostos aos agrotóxicos em municípios da região centro-oeste do Brasil. Pelo ensaio do cometa, observou-se maior dano no DNA nos grupos de pessoas expostas aos contaminantes, de forma direta ou indireta. Lopes e Albuquerque (2018) realizaram uma revisão sistemática a partir de estudos brasileiros que mostravam os impactos ambientais e na saúde humana provocados pelos agrotóxicos. Os autores constataram que essas substâncias são capazes de: alterar a composição do solo, contaminar água e ar, modificar a morfologia de organismos terrestres e aquáticos, bem como, alterar as funções desses organismos dentro do ecossistema. Concomitantemente, foram observados danos no DNA, aumento nas taxas de

suicídio, depressão, ansiedade, neoplasias, alterações hormonais, malformações congênitas, dentre outros impactos na saúde humana.

Os agrotóxicos possuem alvos específicos, sendo classificados em: inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscidas e formicidas. Os herbicidas, representaram cerca de 59,6% do total de agrotóxicos comercializados no Brasil (IBAMA, 2020). Estes produtos têm a capacidade de inibir o crescimento de plantas invasoras específicas e até mesmo eliminá-las. O princípio ativo do herbicida atua em sítios específicos de vias bioquímicas vitais, diminuindo a atividade de enzimas, proporcionando um desequilíbrio na homeostase dessas plantas (ROMAN, 2007). Por operarem em processos biológicos importantes, o excesso de herbicidas pode afetar a saúde humana gerando uma série de danos e estresse oxidativo (TOWNSON, 1990; VANDENBERG, 2017).

Em 2019, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) divulgou os ingredientes ativos, que compõem os agrotóxicos, mais comercializados no país, sendo: o glifosato, o mais comercializado, com 207 mil toneladas, seguido pelo 2,4-D com 45 mil toneladas, e a atrazina com 18 mil toneladas (IBAMA, 2020).

O glifosato é considerado como moderadamente tóxico, classificação indicada pela faixa azul presente na sua embalagem (AMARANTE JR et al., 2002). Este ingrediente ativo é formulado com adjuvantes, como o surfactante polioxietilenoamina (POEA), sendo que a formulação comercial mais conhecida é o Roundup® (VAN BRUGGEN et al., 2018). A atuação do glifosato ocorre na via metabólica do ácido shikimato, provocando a inibição competitiva da 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que converte shikimato-3-fosfato em 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato, enzima envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos essenciais de plantas como fenilalanina, tirosina e triptofano (STEINRÜCKEN; AMRHEIN, 1980; MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008). A inibição da EPSPS reduz o controle por retroalimentação negativa resultando em um intenso fluxo de carbono para o shikimato-3-fosfato, o qual é convertido em shikimato. Como resultado, a morte da planta invasora pode ocorrer pela insuficiência dos aminoácidos essenciais ou pelo desvio do carbono para a via do shikimato, tornando-o escasso em outras vias essenciais (DUKE et al., 2008).

A atrazina, age na planta interrompendo o fluxo de elétrons durante o processo de fotossíntese, o que afeta a produção de glicose. Porém, a interrupção da

fotossíntese não é o suficiente para matar a planta. O fator chave é que, com a interrupção do fluxo de elétrons, esses elétrons levam à formação de espécies reativas de oxigênio, os quais provocam a peroxidação de lipídeos das membranas, sendo este o processo determinante para a morte da planta (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008).

Estudos utilizando glifosato, Roundup® ou atrazina mostram que esses contaminantes provocam alterações celulares e enzimáticas no sistema nervoso central (CATTANI et al., 2014; CHÁVEZ-PICHARDO et al., 2020). Verificam-se também alterações metabólicas, hormonais, inibição de enzimas hepática (JASPER et al., 2012) e de estresse oxidativo (DJABER et al., 2020), além de convulsões, enjoos, dermatites, teratogenicidade, dificuldade respiratória e cânceres em humanos e outros mamíferos (TOWNSON, 1992).

Avaliar estresse oxidativo é uma das formas de se identificar presença de toxicidade de substâncias. Em uma situação fisiológica, existe o equilíbrio entre o sistema pró-oxidante, responsável por formar as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio, e o sistema de defesa anti-oxidante. Quando há um desbalanço a favor do sistema pró-oxidante, se estabelece o quadro de estresse oxidativo (NIKINMAA, 2014; PERSSON, 2014). Espécies reativas de são moléculas que contém átomos com um ou mais elétrons desemparelhados (JAKUBCZYK et al., 2020). Os organismos vivos produzem continuamente as ERO e outros radicais livres. As ERO são geradas a partir de mecanismos endógenos como um subproduto da cadeia respiratória mitocondrial ou de processos inflamatórios, principalmente em hepatócitos e macrófagos. Além disso, as ERO podem também ser geradas por agentes exógenos, como fumaça de cigarro, radiação, luz ultravioleta e poluentes ambientais como os herbicidas (JAKUBCZYK et al., 2020).

Para manter a quantidade de espécies reativas dentro da normalidade, o corpo possui defesas antioxidantes, que fazem a remoção desses radicais por diferentes meios, podendo ser divididas em enzimáticas e não enzimáticas. A não enzimática é composta por moléculas como a glutathiona-reduzida (GSH) e as vitaminas C e E. Essas moléculas atuam em conjunto com a defesa antioxidante enzimática, representada por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-redutase (GR) e glutathiona-peroxidase (GPx) (LOPEZ-ALARCÓNA; DENICOLA, 2013; NIKINMAA, 2014; BURELLA, 2018). Além disso, outra molécula importante é a glutathiona-S-transferase (GST) que consiste em um grupo de enzimas

detoxificantes polimórficas de fase II envolvidas na biotransformação, catalisando a conjugação da GSH à metabólitos endógenos e exógenos, facilitando a sua excreção, além de também possuir atividade peroxidase (PRABHU et al., 2004; HAYES et al., 2005).

Danos oxidativos provocados por radicais livres podem ocorrer em biomoléculas, como lipídios de membrana, pelo aumento da concentração de malondialdeído (MDA), em proteínas, pelo aumento da carbonilação protéica (PCO) e em ácidos nucleicos. As condições do estresse oxidativo estão associadas como origem ou consequência em mais de 100 doenças como Parkinson, Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, enfisema, doenças cardiovasculares (MAULIK; 2013), inflamatórias e em neoplasias (GUTTERIDGE, 1993). Com isso, o número de publicações com estudos mostrando o papel dos marcadores do estresse oxidativo em diversas doenças humanas é crescente, tornando essas análises extremamente relevantes para determinar a extensão e a natureza dos danos oxidativos (FRIJHOFF, 2015).

Outro importante marcador para avaliar toxicidade de substâncias é a metabolização da acetilcolina (LIONETTO et al., 2013). Este neurotransmissor desempenha um papel essencial no comportamento, com sistemas colinérgicos do prosencéfalo envolvidos em processos importantes como, atenção, memória, aprendizado e ciclo sono-vigília (SARTER; BRUNO, 1997). A acetilcolina participa, também, dos mecanismos de atividade motora voluntária e do comportamento motor (SERGUTINA; RAKHMANOVA, 2014) sendo o principal neurotransmissor nas junções neuromusculares. A acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) são as mais importantes enzimas da família colinesterase. Essas enzimas estão presentes nas fendas sinápticas que catalisam a degradação a acetilcolina, impedindo que novas moléculas se liguem aos receptores. Herbicidas podem afetar a atividade da AChE, afetando a função sináptica (NIKINMAA, 2014), provocando estimulação excessiva, tendo como efeitos: depressão respiratória, salivação, broncoespasmos e bradicardia (MARRS, 1993).

Aplicando estes conceitos aos herbicidas, Milić et al. (2018) verificaram, em ratos Wistar, que a exposição de 10 mg/kg de glifosato durante 28 dias provocou danos no DNA de células hepáticas e de leucócitos, diminuição significativa de GSH e aumento da atividade da GPx no fígado. Neste mesmo estudo, doses menores de glifosato (0,1 e 0,5 mg/kg) provocaram diminuição de AChE. Turkmen et al. (2019)

avaliaram os efeitos do glifosato em ratos Wistar em doses diárias de 375 mg/kg durante 56 dias. Os pesquisadores observaram que o glifosato provocou redução de GSH, SOD e CAT nos tecidos nervoso, cardíaco, hepático e renal, caracterizando diminuição das defesas antioxidantes. Del Rio (2005) constatou aumento na concentração de MDA, o qual é derivado da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Este fenômeno foi observado nesses mesmos tecidos e também no sangue, indicando lipoperoxidação.

Peixoto (2005) comparou os efeitos do glifosato e do Roundup® na fosforilação oxidativa mitocondrial, verificando que as alterações provocadas pelo Roundup® não podem ser exclusivamente atribuídas ao ingrediente ativo, o glifosato. Isso se deve a outras substâncias como o surfactante POEA, que é utilizado para aumentar a eficácia do herbicida (COX; SURGAN, 2006), favorecendo a difusão do glifosato pela cutícula da folha (LIU, 2004). Alguns estudos sugerem que o POEA tenha efeitos tóxicos, sendo inclusive considerado até três vezes mais tóxico que o próprio glifosato (NAVARRO; MARTINEZ, 2014).

Neste contexto, Owagboriaye et al. (2019) mostraram que ratos Wistar tratados por 12 semanas com doses diárias de 3,6 mg/kg, 50,4 mg/kg e 248,4 mg/kg de Roundup® apresentaram diminuição na concentração de GSH para o grupo de dose máxima, redução na atividade da CAT, bem como da BChE, enzima com função semelhante a da AChE, em todos os grupos e aumento da lipoperoxidação dose-dependente. Além disso, Djaber et al. (2020), utilizando ratos Wistar que receberam doses de 269,9 mg/kg de Roundup® por 30 dias, observaram diminuição de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, como CAT, GPx, SOD, GST, GSH e vitamina C. Somado a isso foi constatado na concentração de MDA e elevação da carbonilação proteica no fígado e nos rins desses animais. Corroborando as observações anteriores em outros organismos diferentes de mamíferos, De Melo et al. (2020) observaram diminuição na transcrição das enzimas SOD, CAT e GST em *Macrobrachium potiuna* machos e fêmeas expostos à 0,28 mg/L de Roundup® durante 14 dias.

Liu et al. (2014) observaram no tecido renal de ratas Wistar, que receberam 125 mg/kg de atrazina durante 28 dias, aumento da concentração de óxido nítrico e redução da atividade da CAT, SOD e da GPx, demonstrando indução de estresse oxidativo pelo contaminante. Campos-Pereira et al. (2012) também verificaram estresse oxidativo, lipoperoxidação no fígado e degeneração tecidual, em fase inicial,

após 14 dias de gavagem de 400 mg/kg de atrazina em ratos Wistar. Além dessas alterações, foi também observada genotoxicidade com doses de 300 mg/kg, por 7 dias de atrazina (SINGH et al., 2008). Assim como os autores anteriormente constataram, Abarikwu (2014) observou que houve diminuição da atividade de enzimas antioxidantes SOD e CAT e aumento na concentração de MDA no cérebro, rins e fígado de ratos Wistar submetidos a administração de 120 mg/kg de atrazina.

Após avaliar todos esses estudos, foi possível observar a amplitude, a extensão e natureza dos efeitos tóxicos causados por herbicidas, em especial, pelo glifosato, Roundup® e atrazina, investigados por meio de diferentes doses e modelos experimentais. Dessa forma, uma molécula ou um conjunto de moléculas que possa oferecer proteção contra esses efeitos tóxicos é de extrema importância.

Nanopartículas de óxido de ferro têm se mostrado promissoras como potenciais remediadoras de contaminantes ambientais (GUTIERREZ; DZIUBLA; HILT, 2017), como os herbicidas. Devido ao seu pequeno tamanho (1-100 nm), essas nanopartículas possuem alta razão superfície/volume, reatividade e elevada capacidade de adsorção (PEREIRA et al., 2019) para uma série de herbicidas (SCHWANDT et al., 1992) como as imidazolinonas (LEONE et al., 2001), a atrazina (PROCÓPIO et al., 2001) e o glifosato (ORCELLE et al., 2018).

Hematita (α -Fe₂O₃), maghemita (γ -Fe₂O₃) e magnetita (Fe₃O₄) são nanopartículas de óxido de ferro que tem sido estudadas. Resultados mostram que elas possuem a capacidade de cruzar membranas e barreiras biológicas. Sendo importantes para alcançar locais específicos do corpo sob ação de um campo magnético (MODY, 2014), depósitos amiloides cerebrovasculares (PODUSLO, 2011), inibir células microgliais (GLAT, 2013), transportar fármacos (XIONG et al., 2015) e aumentar o contraste na ressonância magnética (KIM et al., 2015). Entretanto, dependendo da dose, podem ocasionar citotoxicidade (LEE et al., 2010). Ao entrar nas células, os lisossomos degradam as nanopartículas liberando o seu conteúdo de ferro que, pela reação de Fenton pode agir como catalisador na formação das ERO e, portanto, no aumento do estresse oxidativo (VOLATRON et al., 2017; YARJANLI et al., 2017).

Nesse contexto, Alarifi et al. (2014) avaliaram os efeitos das nanopartículas de magnetita em células de câncer de mama humano, da linhagem MCF-7. Essas nanopartículas foram diluídas no meio de cultura celular nas concentrações 10, 30, 60, e 120 µg/mL. Os autores observaram que houve depleção de GSH, SOD e CAT,

e elevação da lipoperoxidação com o aumento das concentrações de magnetita, bem como aumento de danos no DNA celular. A danificação do material genético poderia levar à carcinogênese e até mesmo à morte celular. Zhu et al. (2017) avaliaram os efeitos de 100-600 mg/L da nanopartícula de hematita em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, por 24 horas. Os autores observaram diminuição da viabilidade celular e do potencial de proliferação, o qual foi seguido por morte celular. Isso se deve ao aumento significativo na atividade enzimática da SOD, CAT e GPx.

Em contrapartida, há outra nanopartícula de óxido de ferro que tem despertado interesse, a ferrihidrita ($\text{Fe}_5\text{OH}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Ela está presente no meio ambiente, sendo muito abundante, tanto no solo quanto no corpo humano, compondo o núcleo da ferritina, proteína responsável pelo armazenamento de ferro no organismo (CHILOM et al., 2020; SVOBODOVA et al., 2020). Sabe-se que essa nanopartícula possui uma das maiores áreas superficiais (200 a 400 m^2/g), sendo maior que a de outros óxidos de ferro ($<100\text{m}^2/\text{g}$); isso faz com que a ferrihidrita possua uma grande capacidade de adsorver moléculas orgânicas (PEREIRA et al., 2019) e de coprecipitar íons, sendo utilizada para remover contaminantes industriais e ambientais (WEATHERILL et al., 2016).

As propriedades físico-químicas da ferrihidrita tornam-na uma forte candidata para a remediação ambiental. Neste contexto, a atrazina, o glifosato e o Roundup® demonstram ser altamente tóxicos e a nanopartícula ferrihidrita pode ser uma possível remediadora dos efeitos deletérios desses herbicidas. São raros os estudos descrevendo o papel protetor de nanopartículas sobre agentes tóxicos, como herbicidas em animais de experimentação, avaliando o estresse oxidativo. Sendo assim, trabalhos que avaliem o papel da ferrihidrita em parâmetros do estresse oxidativo em animais que receberam os herbicidas são essenciais para agregar conhecimento ao meio científico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em ratas Wistar, se a nanopartícula de ferrihidrita é eficaz em evitar os efeitos tóxicos provocados pelos contaminantes glifosato, Roundup® e atrazina, por meio da quantificação de parâmetros que avaliam a defesa antioxidante e danos oxidativos.

2.2 Objetivos específicos

Por meio da administração dos contaminantes e da ferrihidrita isoladamente ou na associação de ambos, avaliou-se:

- a) concentração ou atividade das defesas antioxidantes, para determinar a capacidade do organismo em eliminar as espécies reativas;
- b) danos teciduais pelas análises de lipoperoxidação e carbonilação proteica, com o intuito de determinar a extensão dos danos causados pelos contaminantes e a possível proteção provocada pela nanopartícula.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Para este trabalho, foram utilizadas 72 ratas da linhagem Wistar, pesando entre 240 e 260 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As ratas foram mantidas no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF), em gaiolas individuais, por 5 dias para adaptação antes do início dos experimentos, em ambiente controlado de luz (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 °C) e com alimento e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados no LaFiNeM - Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo, do CIF, sempre entre 9 e 11 h da manhã para minimizar as interferências do ciclo circadiano dos animais. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA: protocolo nº. 057.2021, OF.CIRC.CEUA nº 11/2022, Anexo 1).

3.2 Nanopartícula

A nanopartícula de óxido de ferro - ferrihidrita ($\text{Fe}_5\text{OH}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) - foi sintetizada em água destilada (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003), caracterizada e analisada por diferentes técnicas físico-químicas (CANHISARES-FILHO et al., 2015) pelos laboratórios: Química Prebiótica (LQP-UEL), Física Nuclear Aplicada (LFNA-UEL), Espectroscopia (SPEC-UEL) e Agronomia Experimental (UEM), apresentando tamanho menor que 200 nm, área superficial entre 200-400 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e pH_{pzc} entre 6,4-8,5 (PEREIRA et al., 2019).

A ferrihidrita, dissolvida em água de torneira, foi administrada via gavagem na dose de 1000 mg/kg peso corpóreo isolada ou associada aos herbicidas. Considerando que o glifosato interage fortemente com a ferrihidrita, que 80% desta interação é como um complexo de esfera interna e que os grupos fosfato e amina estão envolvidos, a dose da nanopartícula foi escolhida baseada nessa capacidade adsorptiva para garantir boa adsorção aos herbicidas (PEREIRA et al., 2019).

3.3 Herbicidas

Foram adquiridos na ADAMA Brasil (Londrina, PR), o glifosato, na forma de sal puro, e o herbicida Roundup® Original (Monsanto do Brasil, LTDA), composto de 480 g/L de sal de isopropilamina de glifosato, 360 g/L de equivalente ácido de n-fosfonometil-glicina (glifosato) e 684 g/L de ingredientes inertes. O formulado da atrazina (6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina), Gesaprim 500

CibaGeigy, possuindo 500 g/L do princípio ativo atrazina e 600 g/L de ingredientes inertes em sua composição.

As doses dos herbicidas, o número de animais por grupo, a via de administração e o volume administrado (0,4 mL/100 g peso corpóreo) basearam-se nos protocolos de avaliação de toxicidade do *Guideline Test No.423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method* elaborado pela *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2001) e do *Guideline on Repeated Dose Toxicity* elaborado pela *European Medicines Agency* (EMA, 2010).

Previamente, foram realizados testes piloto com doses menores (100, 300 e 600 mg/kg) dos herbicidas, conforme indicado no *guideline* elaborado pela OECD (2001). Porém, não foram observadas alterações significativas em relação ao controle. Como o objetivo do trabalho é averiguar o papel protetor da nanopartícula de ferrihidrita, é necessário, que haja alterações provocadas pelo herbicida e pelos formulados a fim de se avaliar esse efeito protetor. Com isso, optou-se pela dose de 1000 mg/kg, valor este que consta no *guideline* da EMA (2010) e que é a metade da dose máxima indicada pela OECD (2001). Além disso, foi usada a mesma dose entre o herbicida glifosato e os formulados Roundup® e atrazina a fim de se permitir as comparações entre o herbicida e os formulados. Por fim, outro ponto observado no piloto é que, após 4 dias, a mortalidade dos grupos era muito elevada comprometendo a análise estatística do estudo. Assim, as quatro administrações e a dose foram escolhidas a fim de provocar algum grau de mortalidade entre os animais, fato este recomendado pelo *guideline* da OECD (2001), e alterar os parâmetros avaliados neste trabalho.

3.4 Protocolo experimental

As ratas foram submetidas à gavagem, sempre entre 9 e 11 h, uma dose única por dia, durante 4 dias consecutivos, constituindo 8 grupos, com 9 animais cada, sendo eles:

- Glifosato (grupo G), 1000 mg/kg de peso corpóreo;
- Formulado a base de glifosato-Roundup® (grupo R), 1000 mg/kg de peso corpóreo;
- Formulado a base de atrazina (grupo A), 1000 mg/kg de peso corpóreo;
- Ferrihidrita (grupo F), 1000 mg/kg de peso corpóreo;
- Ferrihidrita associada ao glifosato (grupo FG), 1000 mg/kg de peso corpóreo de cada substância;

- Ferrihidrita associada ao formulado à base de glifosato- Roundup® (grupo FR), 1000 mg/kg de peso corpóreo de cada substância;
- Ferrihidrita associada ao formulado à base de atrazina (grupo FA), 1000 mg/kg de peso corpóreo de cada substância.

Todas as soluções foram administradas utilizando cânula de gavagem apropriada para ratos (agulha-cânula de gavagem para roedores, Insight Ltda., SP).

3.5 Eutanásia

Todos os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação, 24 h após a última gavagem. Coletou-se o sangue em tubos heparinizados, os quais foram centrifugados a 14.000 x g por 20 min e o plasma obtido foi armazenado em freezer (-20 °C). Foram também retirados os seguintes órgãos: lobo médio do fígado, rime encéfalo com a retirada da porção imediatamente caudal do bulbo, após o cerebelo; esses órgãos foram armazenados em freezer a -86 °C e posteriormente destinados às análises de estresse oxidativo.

3.6 Análises bioquímicas do estresse oxidativo

Todas as análises bioquímicas do estresse oxidativo foram realizadas no LEFA Laboratório de Ecofisiologia Animal da UEL. Os tecidos hepático, renal e nervoso foram pesados e homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1M; pH 7,0), na diluição 1:10, centrifugados (20 min, 14.700 x g, 4 °C) e o sobrenadante separado e utilizado para as análises descritas nos itens posteriores. Os resultados foram expressos em gramas (g) de proteína (prot), a qual foi determinada pelo método de Bradford et al. (1976).

3.6.1 Antioxidante não enzimático

A concentração de GSH foi mensurada pela reação da glutathiona com o 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB) de cor amarelada, sendo determinado em 412 nm. A concentração de GSH foi expressa em $\mu\text{g GSH.g prot}^{-1}$, a partir de uma curva padrão para GSH (BEUTLER et al., 1963).

3.6.2 Enzimas antioxidantes

Foram determinadas nos tecidos as enzimas GST e CAT. A atividade da GST foi medida pela complexação da GSH com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm, sendo expressa em nmol CNBD conjugado $\text{min}^{-1}.\text{g prot}^{-1}$ (KEEN et al., 1976).

A atividade da CAT se deu pela velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelo decréscimo da absorvância, em 240 nm, sendo expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{g prot}^{-1}$ (BEUTLER et al., 1963). A atividade da CAT não foi medida no tecido nervoso.

3.6.3 Lipoperoxidação (LPO)

O grau de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) tecidual foi determinado pela concentração de MDA no tecido, sendo medida pelo ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo Federici et al. (2007). A concentração de MDA foi expressa em $\mu\text{mol.g prot}^{-1}$, a partir de uma curva padrão para LPO.

3.6.4 Carbonilação proteica (PCO)

O dano oxidativo às proteínas foi mensurado pelo teor de proteína carbonil (PCO), determinado segundo Levine et al. (1994), por meio da reação da 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com proteínas carboniladas formando dinitrofenil-hidrazona, que pode ser detectada à 360nm, sendo sua concentração expressa em $\text{nmol.carbonil.g prot}^{-1}$.

3.6.5 Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi determinada com base no método calorimétrico de Ellman et al.(1961) adaptado para leitura em microplaca, de acordo com Alves Costa et al. (2007). A atividade da enzima foi determinada pela quantificação do produto da reação da acetilcolina com 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), em 415 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\text{nmol DTNB.min}^{-1}.\text{g prot}^{-1}$.

3.7 Análise estatística

Nos dados que atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade, foi utilizado o teste ANOVA *one-way*. Nos dados em que o teste ANOVA indicou diferença entre as médias, foi utilizado o pós-teste Student Newman

Keuls (SNK). Os resultados obtidos pelo teste paramétrico foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e representados por gráficos de barras. No caso nos quais os dados não atenderam os pressupostos, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Estes resultados foram expressos em gráficos de *boxplot* como mediana, primeiro e terceiro quartis. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da nanopartícula de ferrihidrita

A nanopartícula de óxido de ferro ferrihidrita isolada provocou alterações pontuais durante o período estudado, sendo elas, diminuição da carbonilação proteica ($p < 0,05$) no fígado (figura 1) e redução ($p < 0,05$) da atividade da enzima GST no cérebro (figura 3).

4.2 Efeito do glifosato e da associação de ferrihidrita com glifosato

O glifosato promoveu redução da PCO ($p < 0,05$) no fígado (figura 1), aumento da concentração de GSH ($p < 0,001$) e diminuição da concentração de MDA ($p < 0,001$) e de PCO ($p < 0,05$) no rim (figura 2). A associação com a nanopartícula evitou essas alterações (figuras 1 e 2). Porém, o grupo FG apresentou redução da atividade da CAT ($p = 0,004$) e da GST ($p < 0,05$) no rim (figura 2).

4.3 Efeito do Roundup® e da associação de ferrihidrita com Roundup®

Observou-se efeitos do Roundup® no rim (figura 2), pela diminuição da concentração de MDA ($p = 0,003$), e no cérebro (figura 3), pelo aumento da concentração de GSH ($p < 0,05$). A associação com a ferrihidrita não evitou o aumento de GSH ($p < 0,05$) no cérebro (figura 3) e, no rim (figura 2), apesar da associação provocar redução da atividade da CAT ($p = 0,01$), a nanopartícula foi capaz de evitar a redução da concentração de MDA promovida pelo Roundup®.

4.4 Efeito da atrazina e da associação de ferrihidrita com atrazina

No rim (figura 2), a atrazina promoveu diminuição da atividade da CAT ($p = 0,002$) e no cérebro (figura 3) promoveu aumento na concentração de GSH ($p < 0,05$) e diminuição na de MDA ($p < 0,05$). A associação evitou a redução da atividade da CAT no rim (figura 2), mas não evitou as alterações de GSH ou MDA no tecido nervoso (figura 3). Ainda, grupo FA apresentou diminuição da concentração de PCO ($p < 0,05$) no rim (figuras 2) e aumento ($p < 0,05$) da atividade da enzima AChE no cérebro (figura 3).

Todos os resultados descritos acima estão compilados em uma única tabela (tabela 1). Nesta tabela, pode-se observar os efeitos do glifosato, Roundup®, atrazina e ferrihidrita isolados ou em associação, nos diferentes tecidos analisados frente aos parâmetros avaliados.

FÍGADO

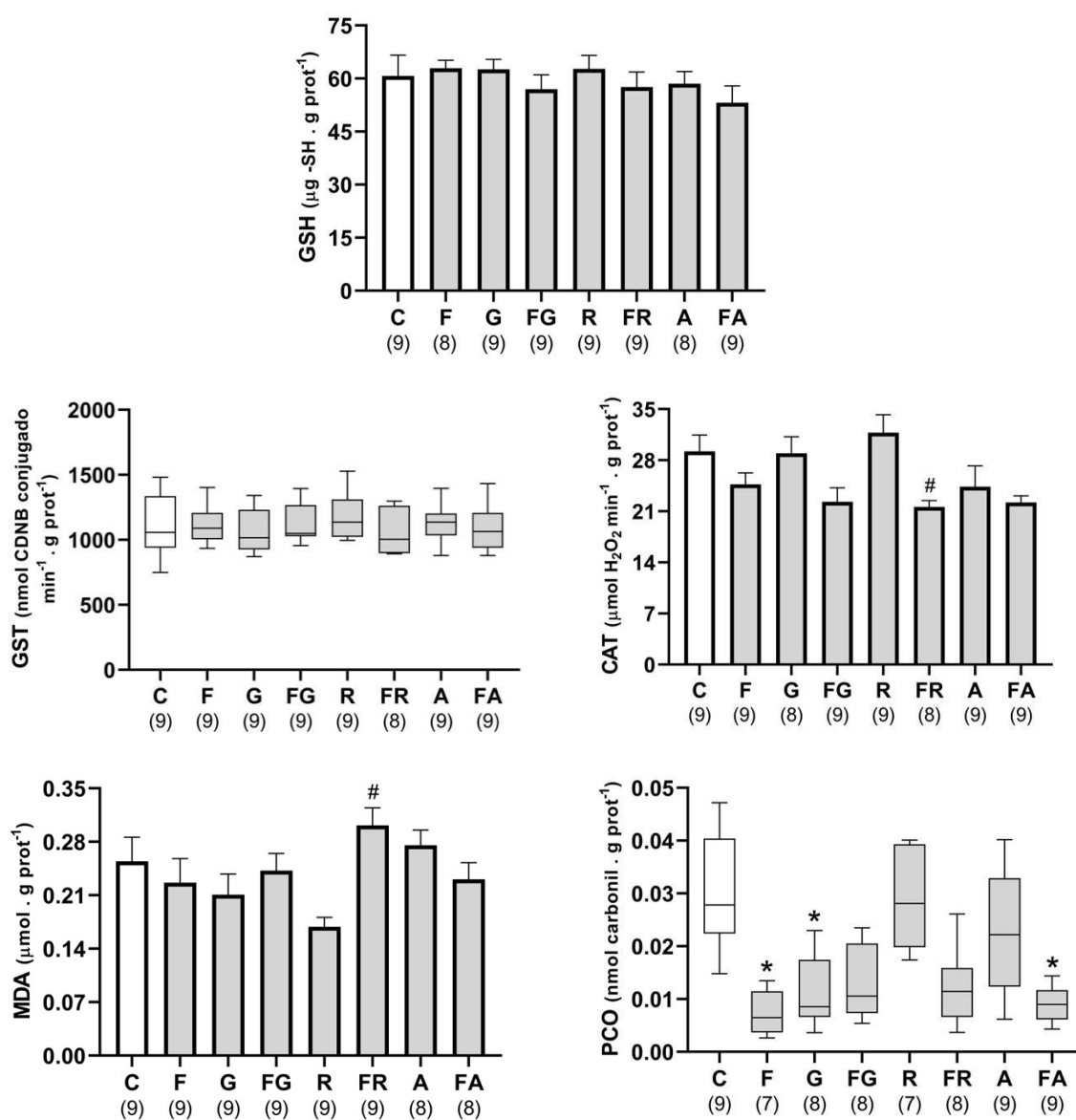


Figura 1. Valores no tecido hepático de glutaciona-reduzida (GSH), glutaciona-S-transferase (GST), catalase (CAT), malondialdeido (MDA) e proteína carbonil (PCO) de ratas que receberam, via gavagem, dose única diária (1000 mg/kg de peso corpóreo), por 4 dias, de água de torneira (C, controle), nanopartícula de ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R), atrazina (A) ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas. Gráficos de barras: média \pm EPM. Gráficos *boxplot*: mediana, primeiro e terceiro quartis. *Diferente do grupo C. #Diferente do respectivo grupo somente com herbicida.

RIM

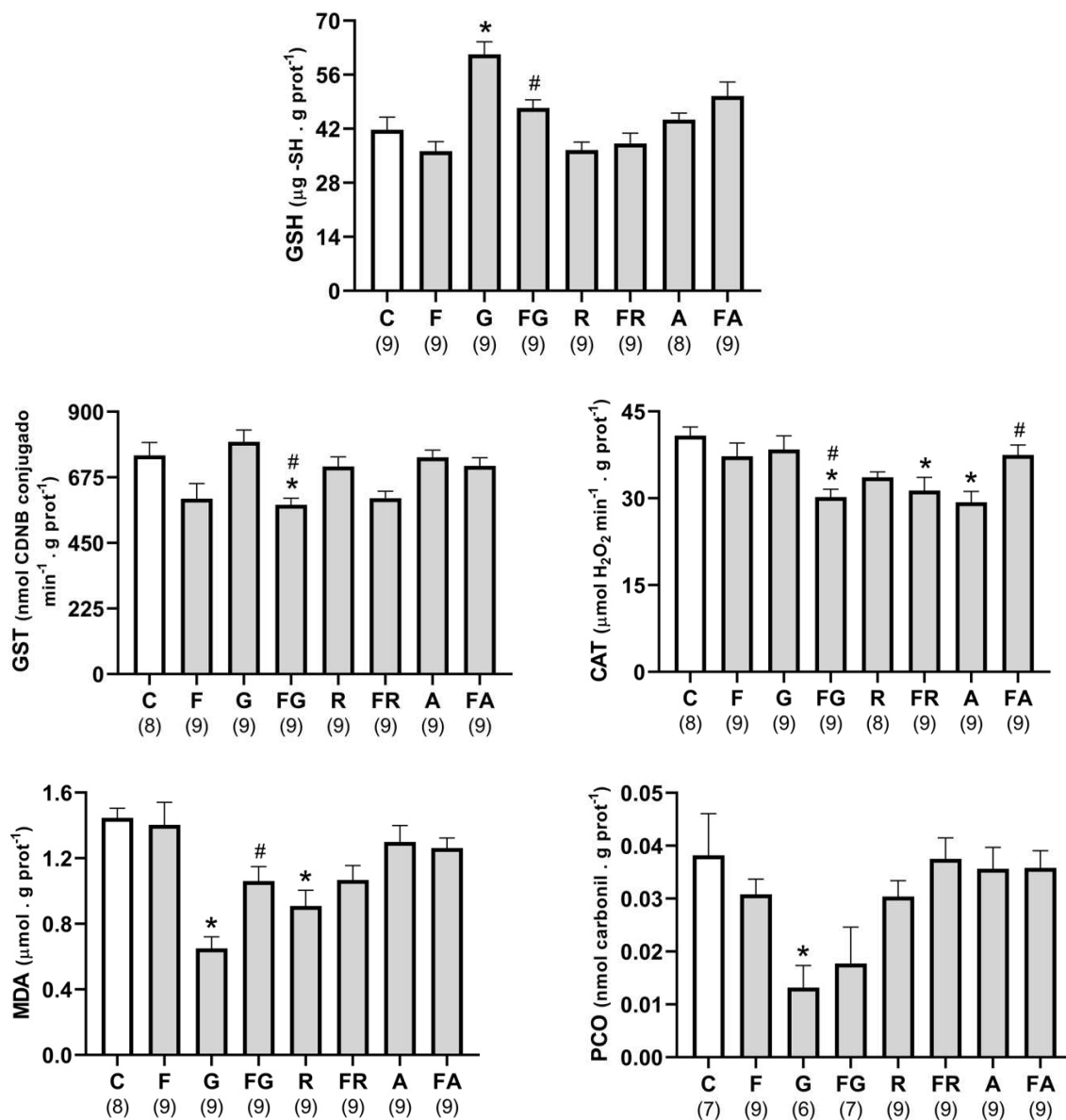


Figura 2. Valores no tecido renal de glutationa-reduzida (GSH), glutationa-S-transferase (GST), catalase (CAT), malondialdeido (MDA) e proteína carbonil (PCO) de ratas que receberam, via gavagem, dose única diária (1000 mg/kg de peso corpóreo), por 4 dias, de água de torneira (C, controle), nanopartícula de ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R), atrazina (A) ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas. Gráficos de barras: média \pm EPM. *Diferente do grupo C. #Diferente do respectivo grupo somente com herbicida.

CÉREBRO

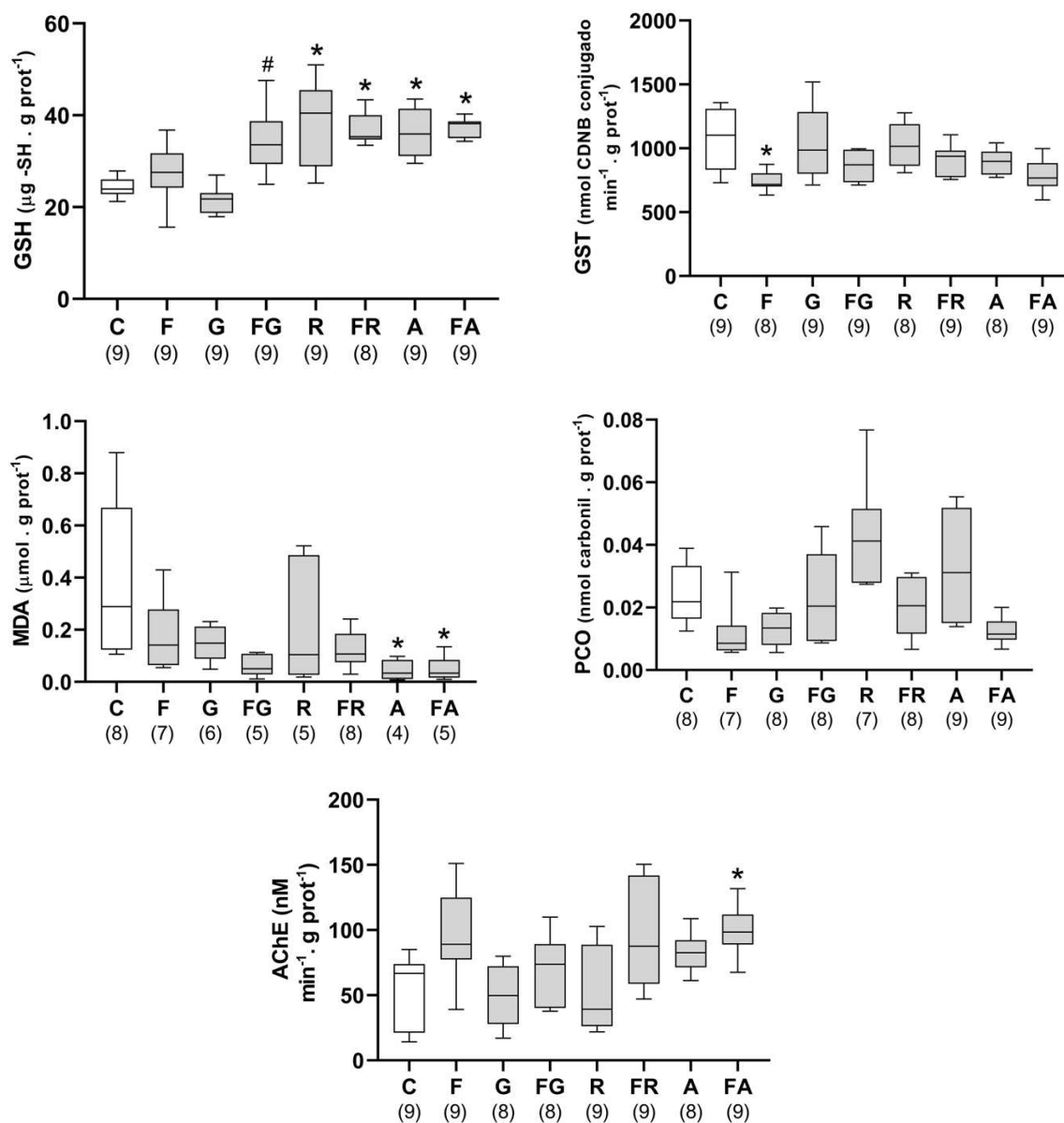


Figura 3. Valores no tecido nervoso de glutaciona-reduzida (GSH), glutaciona-S-transferase (GST), malondialdeido (MDA), proteína carbonil (PCO) e acetilcolinesterase (AChE) de ratas que receberam, via gavagem, dose única diária (1000 mg/kg de peso corpóreo), por 4 dias, de água de torneira (C, controle), nanopartícula de ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R), atrazina (A) ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas. Gráficos *boxplot*: mediana, primeiro e terceiro quartis. *Diferente do grupo C. #Diferente do respectivo grupo somente com herbicida.

Tabela 1. Compilação dos resultados obtidos em tecidos de ratas Wistar: glutathiona-reduzida (GSH, $\mu\text{g GSH.g prot}^{-1}$), glutathiona-S-transferase (GST, $\text{nmol CDNB conjugado.min}^{-1}.\text{g prot}^{-1}$), catalase (CAT, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{g prot}^{-1}$), malondialdeído (MDA, $\mu\text{mol.g prot}^{-1}$), proteína carbonil (PCO, $\text{nmol carbonil.g prot}^{-1}$) e acetilcolinesterase (AChE, $\text{nmol DTNB.min}^{-1}.\text{g prot}^{-1}$).

Grupos	Tecido	GSH	GST	CAT	MDA	PCO	AChE
F	Fígado	=	=	=	=	↓	---
	Rim	=	=	=	=	=	---
	Cérebro	=	↓	---	=	=	=
G	Fígado	=	=	=	=	↓	---
	Rim	↑	=	=	↓	↓	---
	Cérebro	=	=	---	=	=	=
FG	Fígado	=	=	=	=	=	---
	Rim	=	↓	↓	=	=	---
	Cérebro	=	=	---	=	=	=
R	Fígado	=	=	=	=	=	---
	Rim	=	=	=	↓	=	---
	Cérebro	↑	=	---	=	=	=
FR	Fígado	=	=	=	=	=	---
	Rim	=	=	↓	=	=	---
	Cérebro	↑	=	---	=	=	=
A	Fígado	=	=	=	=	=	---
	Rim	=	=	↓	=	=	---
	Cérebro	↑	=	---	↓	=	=
FA	Fígado	=	=	=	=	↓	---
	Rim	=	=	=	=	=	---
	Cérebro	↑	=	---	↓	=	↑

As ratas receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por 4 dias, de água de torneira (C, controle), nanopartícula de ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R), atrazina (A) ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas. ---: parâmetro não avaliado. =: semelhante ao controle. ↑: aumento em relação ao controle. ↓: redução em relação ao controle.

5 DISCUSSÃO

Observando a capacidade da nanopartícula de ferrihidrita em proteger contra os efeitos tóxicos causados pelos contaminantes: glifosato, Roundup® e atrazina, verificou-se que a nanopartícula isolada não provocou alteração na grande maioria dos parâmetros avaliados como GSH, CAT e LPO. As únicas alterações observadas foram no fígado, com a redução de PCO, e no cérebro, com a redução da atividade da GST.

São raros os estudos sobre nanopartículas de óxido de ferro e o estresse oxidativo na literatura em modelos animais de experimentação, sendo mais comuns em culturas de células. Nestes trabalhos, observa-se que, em grande parte deles, as nanopartículas apresentaram toxicidade. Por exemplo, Zhu et al. (2017) estudaram culturas de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com 100-600 mg/L de nanopartículas de hematita. Os autores observaram que ocorreu aumento da formação de ERO e aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a CAT, um importante indicador do estresse oxidativo. Além disso, constataram que essas alterações levaram à morte celular programada dessas bactérias. Alarifi et al. (2014) expuseram células de câncer humano (MCF-7) a diferentes concentrações (10, 30, 60, e 120 µg/mL) de hematita durante 24 horas. Os pesquisadores observaram que houve depleção de GSH e CAT, bem como elevação da LPO por meio do aumento das concentrações de MDA, em todas as doses, indicando o estresse oxidativo induzido pela nanopartícula. Utilizando uma metodologia com ratos Wistar, Dora et al. (2021) avaliaram a proteção da quercetina, um flavonoide que possui propriedades antioxidativas, contra efeitos tóxicos de nanopartículas de cloreto de ferro (III). Para isso os autores injetaram doses de 50 mg/kg de peso corpóreo das nanopartículas por via intraperitoneal associadas ou não à quercetina. Com isso, verificou-se aumento da concentração de MDA e diminuição de GSH em tecido nervoso. Esses efeitos das nanopartículas mencionados acima possivelmente estão relacionados às reações de Fenton, uma vez que, por meio delas, podem ser geradas as ERO. Conforme descrito nesta reação, o Ferro (Fe^{2+}), em ambiente natural e biológico, reage com o H_2O_2 produzindo o radical $OH\cdot$, o qual agride lipídeos resultando na sua peroxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

No presente estudo observou-se a redução da atividade da GST nas ratas que receberam doses de ferrihidrita. Hermes-lima e Storey (1993) observaram, *in vitro*, que a atividade dessa enzima foi inibida pela presença de agentes oxidantes, como o $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 e o Fe^{2+} . O aumento de ferro no cérebro provocado pela nanopartícula pode ser descartado visto que trabalho de Tsutsui (2022), utilizando a mesma dose de ferrihidrita durante 4 dias em ratas Wistar, não observou alteração na concentração deste metal no tecido nervoso em relação ao grupo controle. Desta forma, pode-se propor que ocorreu uma elevação nas concentrações de outros agentes oxidantes, como o $\cdot\text{OH}$ e o H_2O_2 , o que é um indicativo, portanto, de estresse oxidativo. Com relação à diminuição da concentração de PCO, sabe-se que proteínas levemente oxidadas, por se tornarem alvos do sistema ubiquitina-proteassoma, são mais suscetíveis à degradação proteolítica e são rapidamente degradadas (GRUNE et al., 2003). Desta forma, a diminuição da PCO observada neste estudo pode estar relacionada ao aumento da degradação de proteínas levemente oxidadas, o que é um indicativo de um quadro de estresse oxidativo. Com isso, podemos propor que as alterações provocadas pela nanopartícula de ferrihidrita no fígado e no cérebro são indicativos de estresse oxidativo, ainda que de baixa intensidade, fato este reforçado pela não elevação da concentração de MDA.

Em relação ao glifosato, observou-se que, no fígado, ocorreu redução de PCO e, no rim, aumento de GSH e redução de MDA e de PCO. Trabalhos da literatura, como o de Larsen et al. (2012), avaliaram os efeitos hepáticos e renais em ratos Wistar que receberam, por meio da água de consumo, glifosato nas doses de 0,7 ou 7 mg/L durante 30 e 90 dias. Observou-se que houve aumento da concentração de GSH hepática e redução da LPO em todos os grupos que receberam o herbicida, fenômenos esses semelhantes aos observados no presente trabalho. Um outro estudo observou que, em organismos aquáticos, o aumento da síntese de GSH foi reportado como uma resposta adaptativa decorrente de estresse oxidativo moderado (SLANINOVA, 2009). Tal resposta ocorreria por meio da indução da enzima γ -glutamil-cisteína sintetase, a qual controla a biossíntese de GSH no citoplasma (LASH, 2005).

Com relação à diminuição de MDA observada neste estudo, Garcia et al. (2020) observaram que peixes lambari (*Astyanax altiparanae*) expostos a óleo diesel apresentaram diminuição da concentração de MDA no fígado. A hipótese inicial era de que haveria um incremento nas defesas antioxidantes, o que levaria a uma menor

formação de MDA. Todavia a atividade da GPx e da CAT não estavam alteradas, o que permitiu descartar esta hipótese. Outro fato observado foi que a concentração de hidroperóxidos lipídicos, ou seja, os precursores do MDA, também não estava alterada. Desta forma, foi possível constatar que o diesel não provocou lipoperoxidação nos peixes. Por fim, foi observado aumento na atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH), enzima que oxida o MDA formando CO₂ e H₂O (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991). Desta forma, os autores propuseram que a diminuição das concentrações de MDA no fígado dos peixes expostos ao diesel estava relacionada ao aumento do seu metabolismo pela ALDH. A partir dos resultados de Garcia et al. (2020), pode-se propor que uma das possíveis razões para a concentração de MDA estar reduzida no presente trabalho é pelo fato de a atividade da ALDH estar elevada. Avaliações futuras quantificando esta enzima se tornam importantes.

Com base em todos os fatos abordados em relação ao glifosato e que a redução de PCO é um indicativo da presença de espécies reativas, pode-se afirmar que o herbicida provocou estresse oxidativo no tecido hepático e no renal.

A associação da nanopartícula com o glifosato foi capaz de impedir todas as alterações provocadas pelo herbicida, tanto no rim quanto no fígado. Todavia, o grupo FG provocou outras alterações no tecido renal, como redução da atividade da CAT e da GST. A inibição da atividade da CAT pode ser causada pelo aumento de H₂O₂ e/ou de radicais superóxido (RUAS et al., 2008). Por outro lado, a redução da atividade da GST, pode ter ocorrido pela presença de radicais livres ou mesmo pela presença de ferro oriundo na ferrihidrita (HERMES-LIMA; STOREY, 1993). Desta forma, é possível afirmar que no fígado, mas não no rim, a nanopartícula exerceu papel protetor.

Em relação ao Roundup[®], observou-se no rim diminuição da concentração de MDA e aumento de GSH no cérebro. Existem, na literatura, muitos estudos comparando as ações do glifosato e do Roundup[®]. El-Shenawy (2009), por exemplo, pela exposição de ratos Wistar à 269,9 mg/kg de peso corpóreo de Roundup[®] e à 134,95 mg/kg de peso corpóreo de glifosato, por via intraperitoneal durante 14 dias, observou diminuição da GSH e o aumento da LPO no fígado com ambos os contaminantes. O autor menciona que o Roundup[®] proporcionou uma maior elevação da LPO em relação ao glifosato, indicando que esta formulação é um maior disruptor das defesas antioxidantes. Outro trabalho, produzido por Owagboriaye et al. (2019), também comparou os dois contaminantes. Os pesquisadores avaliaram ratos Wistar

expostos a doses (3,6; 50,4 e 248 mg/kg de peso corpóreo) de glifosato e Roundup® por via oral durante 12 semanas. Verificaram que os contaminantes foram capazes de aumentar, no sangue, a concentração de GSH, mas só o Roundup®, de maneira dose dependente, provocou depleção da CAT e aumento da LPO. Dados prévios do laboratório também indicam maiores alterações do Roundup® em relação ao glifosato em parâmetros plasmáticos e metabólicos (TAKASUMI, 2017; TSUTSUI 2022). De maneira interessante, os dados acima diferem dos achados deste trabalho, já que o glifosato foi capaz de alterar 2 vezes mais indicadores que o próprio Roundup®. Todavia, vale destacar que o aumento da concentração de GSH apresentada pelo grupo R é um indicativo de estresse oxidativo conforme mecanismo já explicitado anteriormente (SLANINOVA et al., 2009). Com isso, o formulado foi capaz de induzir o estresse oxidativo no cérebro.

Com relação ao grupo FR, a nanopartícula não evitou o aumento de GSH no cérebro. No rim, apesar de a associação ter evitado a redução da concentração de MDA, ela provocou redução da atividade da CAT. Isso mostra que, além de a associação com a ferrihidrita não ter impedido o estresse oxidativo no cérebro, o grupo FR provocou também estresse oxidativo nos rins. Isso demonstra que a ferrihidrita é inadequada para proteger contra o Roundup® tomando como base os parâmetros analisados neste estudo.

O terceiro contaminante avaliado foi a atrazina. Para os animais que receberam este contaminante, observou-se alterações semelhantes aos que receberam glifosato ou Roundup®. Sabe-se que a atrazina, assim como outros xenobióticos podem gerar as ERO e a avaliação de lipoperoxidação é considerado um importante indicador de estresse oxidativo (COCUZZA, 2007). Verificou-se, no rim, redução de CAT e, no cérebro, aumento de GSH e diminuição de MDA. Com base nos mecanismos já descritos, é possível observar que a atrazina provocou estresse oxidativo tanto no rim quanto no cérebro. Singh et al. (2010), utilizando ratos Wistar que receberam doses de 300 mg/kg de peso corpóreo de atrazina por 7, 14 e 21 dias, também observaram efeitos do estresse oxidativo em eritrócitos. Os autores observaram redução da GSH, bem como aumento da CAT e GST em todos os períodos avaliados. Liu et al. (2014) verificaram que ratas Wistar, submetidas à dose de 125 mg/kg de peso corpóreo de atrazina por 28 dias, apresentaram diminuição da CAT e aumento da concentração de MDA no tecido renal.

No tecido nervoso, a associação da nanopartícula com atrazina não evitou as alterações provocadas pelo formulado e ainda aumentou a atividade da enzima AChE. Observa-se na literatura que os contaminantes presentes neste trabalho podem diminuir a atividade da AChE (PICCIOTTO et al., 2012). O glifosato, por exemplo, devido à sua estrutura química, pode interferir na síntese da glicogênio-sintase-quinase-3, cuja super expressão inibe a síntese da AChE (SAMSEL; SENEFF, 2015; LARSEN, 2016). Os trabalhos de Milić et al. (2018), administrando doses de 0,1 mg/kg e 0,5 mg/kg em ratos Wistar durante 28 dias, e de Larsen et al. (2016), administrando dose de 10 mM, mostram diminuição da atividade da enzima no plasma e no cérebro, enquanto que não observamos alterações em relação aos grupos que receberam o glifosato e o Roundup®. Schmidel et al. (2014) verificaram que peixes *zebrafish* expostos a doses de 1000 µg/L de atrazina por 14 dias também tiveram a atividade da AChE reduzida em tecido cerebral, sugerindo que a essa substância está associada também a alterações no sistema colinérgico. Outro estudo semelhante executado por Xing et al. (2010) com peixes da espécie *Cyprinus carpio*, expostos a doses 4,28, 42,8 e 428 µg/L durante 15 dias, também propõe que a atrazina reduz a atividade da AChE no cérebro de forma dose-dependente. Neste caso, os nossos dados diferem dos encontrados na literatura, sendo que não houve diminuição da atividade da AChE, mas sim aumento, e somente no grupo FA, o qual recebeu a associação com a nanopartícula. Dhakshinamoorthy et al. (2017) avaliou a toxicidade da nanopartícula de óxido de ferro Fe₂O₃ em camundongos, nas doses de 25 e 50 mg/kg, durante 4 semanas, e constataram que a atividade da AChE foi maior nos animais que expostos à nanopartícula, sugerindo que o acúmulo de ferro pode ter levado a alteração no sistema colinérgico, acelerando a metabolização da acetilcolina o que possivelmente levou às demais alterações neurocomportamentais averiguadas. Dados prévios do nosso laboratório (TSUTSUI, 2022) mostram que fêmeas Wistar que receberam as mesmas doses da associação e durante o mesmo tempo empregado neste trabalho tiveram aumento das concentrações de ferro no encéfalo. Dessa forma, podemos inferir que a associação levou ao acúmulo de ferro no cérebro de forma que provocou o aumento da atividade da AChE nesse tecido.

Em suma, a nanopartícula de ferrihidrita em si alterou apenas alguns aspectos pontuais. Além disso, os herbicidas apresentaram semelhantes padrões de alteração dos parâmetros avaliados, sendo que o glifosato apresentou mais alterações, a atrazina intermediária e o Roundup® o que apresentou a menor quantidade de

alterações. O fato é que todos os contaminantes foram capazes de provocar dano oxidativo em algum grau. A nanopartícula de ferrihidrita não se mostrou eficaz em proteger contra as alterações provocadas pelo Roundup® e pela atrazina, sendo que a associação provocou a mesma quantidade de alterações se comparado com o contaminante isolado. Observa-se uma proteção parcial contra o glifosato, uma vez que a associação ainda provocou algumas alterações em menor grau.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, as ratas Wistar foram expostas aos contaminantes glifosato, Roundup® e Atrazina, e à nanopartícula de ferrihidrita em duas situações diferentes, isoladamente e a combinação dos contaminantes com a ferrihidrita, a fim de se avaliar os efeitos protetores da nanopartícula sobre os animais que receberam foram expostos à essas substâncias tóxicas.

Com avaliação dos dados presentes neste trabalho conseguimos observar que a nanopartícula de ferrihidrita isoladamente alterou parâmetros pontuais e foi eficaz de evitar algumas das alterações provocadas pelo Roundup®, pela atrazina e a maioria das alterações provocadas pelo glifosato.

Esses resultados mostram-se importantes, uma vez que o modelo experimental é raro na literatura, abrindo portas para outros estudos que avaliem novas formas de aplicação da ferrihidrita bem como de outras moléculas que possuam caráter protetor contra as alterações do estresse oxidativo provocados pelo glifosato, Roundup® e atrazina.

7 REFERÊNCIAS

ABARIKWU, S. O. Protective effect of quercetin on atrazine-induced oxidative stress in the liver, kidney, brain, and heart of adult Wistar rats. **Toxicology International**, v. 21, n. 2, p. 148–156, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4103/0971-6580.139794>

ALARIFI, S.; ALI, D.; ALKAHTANI, S; ALHADER, M. S. Iron oxide nanoparticles induce oxidative stress, DNA damage, and caspase activation in the human breast cancer cell line. **Biological Trace Element Research**, v. 159, p. 416–424, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9972-0>

ALVES COSTA, J. R. M. A.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, E.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 1, p. 82-88, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.03.013>

AMARANTE JR, O. P.; SANTOS, T, C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000400014>

ARAÚJO, I. M. M.; OLIVEIRA, A. G. R. C. Agronegócio e agrotóxicos: impactos à saúde dos trabalhadores agrícolas no nordeste brasileiro. **Trabalho, Educação e Saúde**, v. 15, n. 1, p. 117–129, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1981-7746-sol00043>

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882–888, 1963.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BURELLA, P. M.; ODETTI, L. M.; SIMONIELLO, M. F.; POLETTA, G. L. Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) exposed *in ovo* to pesticide formulations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 437–443, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.006>

CAMPOS-PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, C. A.; PIGOSO, A. A.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; BARBIERI, R.; SPATTI, E. F.; MARIN-MORALES, M. A.; SEVERI-AGUIAR, G. D. C. Early cytotoxic and genotoxic effects of atrazine on Wistar rat liver: a morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 170-177, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.020>

CANHISARES-FILHO, J. E.; CARNEIRO, C. E. A.; DE SANTANA, H.; URBANO, A.; DA COSTA, A. C. S.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Characterization of the adsorption of nucleic acid bases onto ferrihydrite via Fourier transform infrared and

surface-enhanced Raman spectroscopy and X-ray diffractometry. **Astrobiology**, v. 15, n. 9, p. 728–738, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1309>

CARNEIRO, F. F.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. **Dossiê ABRASCO**. Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1. Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Saúde. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz. São Paulo: Editora Expressão Popular, 2015. Disponível em: <<https://abrasco.org.br/dossieagrotoxicos/>>. <https://www.abrasco.org.br/dossieagrotoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf>. Acesso em: 18 maio 2023.

CATTANI, D.; CAVALLI, V. L. L. O.; RIEG, C. E. H.; DOMINGUES, J. T.; DAL-CIM, T.; TASCA, C. I.; MENA BARRETO SILVA, F. R.; ZAMONER, A. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, p. 34–45, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.001>

CHÁVEZ-PICHARDO, M. E.; REYES-BRAVO, D. Y.; MENDOZA-TREJO, M. S.; MARÍN-LÓPEZ, A. G.; GIORDANO, M.; HERNÁNDEZ-CHAN, N.; DOMÍNGUEZ-MARCHAN, K.; ORTEGA-ROSALES, L. C.; RODRÍGUEZ, V. M. Brain alterations in GABA, glutamate and glutamine markers after chronic atrazine exposure in the male albino rat. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 9, p. 3217–3230, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02806-2>

CHILOM, C. G.; ZORILĂ, B.; BACALUM, M.; BĂLĂȘOIU, M.; YAROSLAVTSEV, R.; STOLYAR, S. V.; TYUTYUNNICOV, S. Ferrihydrite nanoparticles interaction with model lipid membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 226, n. 2, art. 104851, p. 1–12, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.104851>

COCUZZA, M.; SIKKA, S. C.; ATHAYDE, K. S.; AGARWAL, A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 33, n. 5, p. 603–621, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1677-55382007000500002>

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The iron oxydes: structure, properties, reactions, occurrences and uses**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003. ISBN: 9783527602094

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 2, p. 1803–1806, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.9374>

DE MELO, M. S.; NAZARI, E. M.; MÜLLER, Y. M. R.; GISMONDI, E. Modulation of antioxidant gene expressions by Roundup® exposure in the decapod *Macrobrachium potiuna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, art. 110086, p. 1–10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110086>

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316–328, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>

DHAKSHINAMOORTHY, V.; MANICKAM, V.; PERUMAL, E. Neurobehavioural toxicity of iron oxide nanoparticles in mice. **Neurotoxicity Research**, v. 32, p. 187–203. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9721-1>

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Portaria No. 43, de 21 de Fevereiro de 2020. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Governo Federal. Gov.br.**, edição 39, seção 1, p. 4. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-43-de-21-de-fevereiro-de-2020-244958254>>. Acesso em: 18 maio 2023.

DJABER, N.; OUNACEUR, L. S.; MOUBINE, B. N.; KHALDI, T.; ROUAG, M.; BERROUAGUE, S.; AMARA, H.; TAIBI, F.; BOUMENDJEL, M. Roundup-induced biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of rats: the ameliorative effects of *Linum usitatissimum* oil. **Acta Biochimica Polonica**, v. 67, n. 1, p. 53–64, 2020. DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2020_2898

DORA, M. F.; TAHA, N. M.; LEBDA, M. A.; HASHEM, A. E.; ELFEKY, M. S.; EL-SAYED, Y. S.; AL JAOUNI, S.; EL-FAR, A. H. Quercetin attenuates brain oxidative alterations induced by iron oxide nanoparticles in rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, art. 3829, p. 1–18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22083829>

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 319–325, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.1518>

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

EL-SHENAWY, N. S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 379-385, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.06.001>

EMA. Guideline on repeated dose toxicity, 2010. European Medicines Agency. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-repeated-dose-toxicity-revision-1_en.pdf>. Acesso em: 13 maio 2023

EMBRAPA. **Visão 2030**: o futuro da agricultura brasileira. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: Embrapa, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/10180/9543845/Vis%C3%A3o+2030+-+o+futuro+da+agricultura+brasileira/2a9a0f27-0ead-991a-8cbf-af8e89d62829>>. Acesso em: 18 maio 2023.

EMBRAPA. Ciência e tecnologia tornaram o Brasil um dos maiores produtores mundiais de alimentos. EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/75085849/ciencia-e-tecnologia>>

tornaram-o-brasil-um-dos-maiores-produtores-mundiais-de-alimentos>. Acesso em: 18 maio 2023.

EMBRAPA. **Agrotóxico, só se for legal**. Brasília: Embrapa, 2020. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/57568336/artigo-agrotoxico-so-se-for-legal>>. Acesso em: 18 maio 2023.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free radical biology & medicine**, v. 11, n. 1, p. 81–128, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)

FAOSTAT. **Major commodities exporters**. FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/major_commodities_exports>. Acesso em: 18 maio 2023.

FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415–430, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>

FRIJHOFF, J.; WINYARD, P. G.; ZARKOVIC, N.; DAVIES, S. S.; STOCKER, R.; CHENG, D.; KNIGHT, A. R.; TAYLOR, E. L.; OETTRICH, J.; RUSKOVSKA, T.; GASPAROVIC, A. C.; CUADRADO, A.; WEBER, D.; POULSEN, H. E.; GRUNE, T.; SCHMIDT, H. H. H. W.; GHEZZI, P. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 14, p. 1144–1170, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6317>

GARCIA, D.; LIMA, D.; DA SILVA, D. G. H.; DE ALMEIDA, E. A. Decreased malondialdehyde levels in fish (*Astyanax altiparanae*) exposed to diesel: evidence of metabolism by aldehyde dehydrogenase in the liver and excretion in water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, art. 110107, p. 1–11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110107>

GLAT, M.; SKAAT, H.; MENKES-CASPI, N.; MARGEL, S.; STERN, E. A. Age-dependent effects of microglial inhibition *in vivo* on Alzheimer's disease neuropathology using bioactive-conjugated iron oxide nanoparticles. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, art. 32, p. 1–12, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-32>

GONÇALVES, G. M. S.; GURGEL, I. G. D.; COSTA, A. M.; de ALMEIDA, L. R.; LIMA, T. F. P.; SILVA, E. Uso de agrotóxicos e a relação com a saúde na etnia Xukuru do Ororubá. São Paulo. **Saúde e Sociedade, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. Associação Paulista de Saúde Pública**, v. 21, p. 1001–1012, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-12902012000400017>

GRUNE, T.; MERKER, K.; SANDIG, G.; DAVIES, K. J. A. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, n. 3, p. 709–718, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00809-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00809-X)

GUTIERREZ, A. M.; DZIUBLA, T. D.; HILT, J. Z. Recent advances on iron oxide magnetic nanoparticles as sorbents of organic pollutants in water and wastewater treatment. **Reviews on Environmental Health**, v. 32, n. 1-2, p. 111–117, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1515/reveh-2016-0063>

GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. **Free Radical Research Communication**, v. 19, n. 3, p. 141–158, 1993. DOI: <https://doi.org/10.3109/10715769309111598>

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford: **Clarendon Press**, p.543, 1989.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. *In vitro* oxidative inactivation of glutathione S-transferase from a freeze tolerant reptile. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 124, n. 2, p. 149–158, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00929207>

HAYES J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 51-88, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>

IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos, 2020. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)**, 2020. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 5 maio 2022. <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxico>. Acesso em: 20 maio 2023.

JAKUBCZYK, K.; DEC, K.; KAŁDUŃSKA, J.; KAWCZUGA, D.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. **Polski Merkuriusz Lekarski**, v. 48, n. 284, p. 124-127, 2020.

JASPER, R.; LOCATELLI, G. O.; PILATI, C.; LOCATELLI, C. Evaluation of biochemical, haematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 5, n. 3, p.133–140, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10102-012-0022-5>

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBI, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)

KIM, J. H.; LEE, H. J.; DOO, S. H.; YANG, W. J.; CHOI, D.; KIM, J. H.; WON, J. H.; SONG, Y. S. Use of nanoparticles to monitor human mesenchymal stem cells transplanted into penile cavernosum of rats with erectile dysfunction. **Korean Journal of Urology**, v. 56, n. 4, p. 280–287, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4111/kju.2015.56.4.280>

LARSEN, K. E.; LIFSCHITZ, A. L.; LANUSSE, C. E.; VIRKEL, G. L. The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 41–44, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.012>

LARSEN, K.; NAJLE, R.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 811–818, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.005>

LASH, L. H. Role of glutathione transport processes in kidney function. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, n. 1, p. 329–342, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.004>

LEE, H-P.; ZHU, X.; LIU, G.; CHEN, S. G.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; LEE, H. Divalent metal transporter, iron, and Parkinson's disease: a pathological relationship. **Cell Research**, v. 20, p. 397–399, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/cr.2010.39>

LEONE, P.; GENNARI, M.; NÈGRE, M.; BOERO, V. Role of ferrihydrite in adsorption of three imidazolinone herbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1315–1320, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf000913c>

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; CALISI, A.; GIORDANO, M. E.; SCETTINO, T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **BioMed Research International**, v. 2013, article ID 321213, p. 1-8, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/321213>

LIU, Z. Effects of surfactants on foliar uptake of herbicides – a complex scenario. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 35, n. 3-4, p. 149–153, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.02.016>

LIU, W.; DU, Y.; LIU, J.; WANG, H.; SUN, D.; LIANG, D.; ZHAO, L.; SHANG, J. Effects of atrazine on the oxidative damage of kidney in Wister rats. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 10, p. 3235–3243, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4238554/pdf/ijcem0007-3235.pdf>>. Acesso em: 19 maio. 2023.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-1104201811714>

LOPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1–10, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2010/30295/1/doc-227.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2023

MARRS, T. C. Organophosphate poisoning. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, n. 1, p. 51-56, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(93\)90066-m](https://doi.org/10.1016/0163-7258(93)90066-m)

MAULIK, N.; McFADDEN, D.; OTANI, H.; THIRUNAVUKKARASU, M.; PARINANDI, N. L. Antioxidants in longevity and medicine. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, art. 820679, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/820679>

MILIĆ, M.; ŽUNEC, S.; MICEK, V.; KAŠUBA, V.; MIKOLIĆ, A.; LOVAKOVIĆ, B. T.; SEMREN, T. Ž.; PAVIČIĆ, I.; ČERMAK, A. M. M.; PIZENT, A.; VRDOLJAK, A. L.; VALENCIA-QUINTANA, R.; SÁNCHEZ-ALARCÓN, J.; ŽELJEŽIĆ, D. Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 69, n. 2, p. 154–168, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3114>

MODY, V. V.; COX A.; SHAH, S.; SINGH, A.; BEVINS, W.; PARIHAR, H. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. **Applied Nanoscience**, v. 4, p. 385–392, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0216-y>

NAVARRO, C. D. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 165, p. 83–90, 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.06.003>

NINKINMAA, M. **An introduction to aquatic toxicology**. 1a ed. Academic Press. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2012-0-07948-3>

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test No. 423: acute oral toxicity - acute toxic class method**, 2001. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en>. Acesso em: 20 maio 2023.

ORCELLI, T.; DI MAURO, E.; URBANO, A.; VALEZI, D. F.; DA COSTA, A. C. S.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Study of interaction between glyphosate and goethite using several methodologies: an environmental perspective. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 229, art. 150, p. 1–18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3806-1>

OWAGBORIAYE, F.; DEDEKE, G.; ADEMOLU, K.; OLUJIMI, O.; ALADESIDA, A.; ADELEKE, M. Comparative studies on endogenous stress hormones, antioxidant, biochemical and hematological status of metabolic disturbance in albino rat exposed to roundup herbicide and its active ingredient glyphosate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 14, p. 14502–14512, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04759-1>

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1115–1122, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.044>

PELAEZ, V. Mercado e Regulação de Agrotóxicos. UFPR, Agente da Anvisa. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012. Disponível em: <<http://www.consea.pr.gov.br/arquivos/File/ANEXO4AGROTOXICOSCONSEAPR.pdf>>. Acesso em: 5 maio 2022.

PEREIRA, R. C.; ANIZELLI, P. R.; DI MAURO, E.; VALEZI, D. F.; DA COSTA, A. C. S.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. The effect of pH and ionic strength on the adsorption of glyphosate onto ferrihydrite. **Geochemical Transactions**, v. 20, n. 3, p. 1–14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12932-019-0063-1>

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014, art. 427318, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/427318>

PICCIOTTO, M. R.; HIGLEY, M. J.; MINEUR, Y. S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. **Neuron**, v. 76, n.1, p. 116–129, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>

PODUSLO, J. F.; HULTMAN, K. L.; CURRAN, G. L.; PREBOSKE, G. M.; CHAMBERLAIN, R.; MARJACSKA, M.; GARWOOD, M.; JACK JR, C.; WENGENACK, T. M. Targeting vascular amyloid in arterioles of Alzheimer disease transgenic mice with amyloid beta protein antibody-coated nanoparticles. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 70, n. 8, p. 653–661, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318225038c>

PRABHU, K. S.; REDDY, P. V.; JONES, E. C.; LIKEN, A. D.; REDDY, C. C. Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, n. 1, p. 72-80. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.02.002>

PROCÓPIO, S. O.; PIRES, F. R.; WERLANG, R. C.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; MENDONÇA, E. S.; SANTOS, J. B.; EGREJA FILHO, F. B. Sorção do herbicida atrazine em complexos organominerais. **Planta Daninha**, v. 19, n. 3, p. 391–400, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582001000300012>

RAMOS, J. S. A.; PEDROSO, T. M. A.; GODOY, F. R.; BATISTA, R. E.; ALMEIDA, F. B.; FRANCELIN, C.; RIBEIRO, F. L.; PARISE, M. R.; MELO e SILVA, D. Multi-biomarker responses to pesticides in an agricultural population from Central Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 754, p. 1–10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141893>

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1–3, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/7ZdQTpMhCT5n6Gvv9ZHKnqK/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 18 maio 2023.

ROMAN, E. S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M. A.; HALL, L.; BECKIE, H.; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2007. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355291/12492345/Como+funcionam+os+herbicidas/954b0416-031d-4764-a703-14d9b28b178e?version=1.0>. Acesso em: 18 maio 2023.

RUAS, C. B. G.; CARVALHO, C. dos S.; DE ARAÚJO, H. S. S.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; FERNANDES, M. N. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminate driver. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 86–93, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.08.018>

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate, pathways to modern diseases III: manganese, neurological diseases, and associated pathologies. **Surgical Neurology International**, v. 6, p. 45, 2015. DOI: <https://doi.org/10.4103/2152-7806.153876>

SARTER, M.; BRUNO, J. P. Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. **Brain Research Reviews**, v. 23, p. 28-46, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(96\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(96)00009-4)

SCHMIDEL, A. J.; ASSMANN, K. L.; WERLANG, C. C.; BERTONCELLO, K. T.; FRANCESCON, F.; RAMBO, C. L.; BELTRAME, G. M.; CALEGARI, D.; BATISTA, C. B.; BLASER, R. E.; ROMAN JR., W. A.; CONTERATO, G. M.; PIATO, A. L.; ZANATTA, L.; MAGRO, J. D.; ROSEMBERG, D. B. Subchronic atrazine exposure changes defensive behaviour profile and disrupts brain acetylcholinesterase activity of zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 44, p. 62–69, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.05.006>

SCHWANDT, H.; KÖGEL-KNABNER, I.; STANJEK, H.; TOTSCHE, K. Sorption of an acidic herbicide on synthetic iron oxides and soils: sorption isotherms. **The Science of the Total Environment**, v. 123-124, p. 121–131, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(92\)90139-J](https://doi.org/10.1016/0048-9697(92)90139-J)

SERGUTINA, A. V., RAKHMANOVA, V. I. Brain acetylcholinesterase activity in Wistar and August rats with low and high motor activity (a cytochemical study). **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 157, p. 450-453, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2588-8>

SINGH, M.; KAUR, P.; SANDHIR, R.; KIRAN, R. Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 654, n. 2, p. 145–149, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.05.010>

SINGH, M.; SANDHIR, R.; KIRAN, R. Oxidative stress induced by atrazine in rat erythrocytes: mitigating effect of vitamin E. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 20, n. 3, p. 119–126, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3109/15376511003606253>

SLANINOVA, A.; SMUTNA, M.; MADRA, H.; SVOBODOVA, Z. A review: oxidative stress in fish induced by pesticides. **Neuroendocrinology Letters**, v. 30, suppl. 1, p. 2–12, 2009. Disponível em: <https://www.nel.edu/userfiles/articlesnew/NEL300709R01.pdf>. Acesso em: 19 maio 2023.

STEINRÜCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 94, n. 4, p. 1207–1212, 1980. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)90547-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)90547-1)

SVOBODOVA, H.; KOSNÁČ, D.; TANILA, H.; WAGNER, A.; TRNKA, M.; VITOVÍČ, P.; HLINKOVA, J.; VAVRINSKY, E.; EHRlich, H.; POLÁK; KOPANI, M. Iron-oxide minerals in the human tissues. **BioMetals**, v. 33, n. 1, p. 1–13, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10534-020-00232-6>

TAKASUMI, L. C. N. **Nanopartículas de óxido de ferro como proteção contra os efeitos dos herbicidas glifosato e Roundup®**: parâmetros comportamentais e metabólicos. (Monografia). Bacharelado em Biomedicina da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil, 2017.

TOWNSON, H. Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva: WHO-World Health Organization, 1990. 128 pp. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 350, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(92\)90345-D](https://doi.org/10.1016/0035-9203(92)90345-D)

TSUTSUI, F. T. K. **Estudo da nanopartícula de ferrihidrita como protetora da toxicidade de herbicidas em ratos: metabólitos plasmáticos e ferro no encéfalo**. (Dissertação). Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil, 2022.

TURKMEN, R.; BIRDANE, Y. O.; DEMIREL, H. H.; YAVUZ, H.; KABU, M.; INCE, S. Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 11, p. 11427–11437, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04585-5>

VAN BRUGGEN, A. H. C.; HE, M. M.; SHIN, K.; MAI, V.; JEONG, K. C.; FINCKH, M. R.; MORRIS, J. G. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of The Total Environment**, v. 616–617, p. 255–268, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>

VANDENBERG, L. N.; BLUMBERG, B.; ANTONIOU, M.N.; BENBROOK, C.M.; CARROL, L. L.; COLBORN, T.; EVERETT, L. G.; HANSEN, M.; LANDRIGAN P. J.; LANPHEAR, B. P.; MESNAGE, R.; VOM SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V.; MYERS, J. P. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? **Journal Epidemiology & Community Health**, v. 71, n. 6, p. 613–618, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jech-2016-208463>

VOLATRON, J.; CARN, F.; KOLOSNAJ-TABI, J.; JAVED, Y.; VUONG, Q. L.; GOSSUIN, Y.; MÉNAGER, C.; LUCIANI, N.; CHARRON, G.; HÉMADI, M.; ALLOYEAU, D.; GAZEAU, F. Ferritin protein regulates the degradation of iron oxide nanoparticles. **Nano Micro Small**, v. 13, n. 2, p. 1–13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/sml.201602030>

WEATHERILL, J. S.; MORRIS, K.; BOTS, P.; STAWSKI, T. M.; JANSSEN, A.; ABRAHAMSEN, L.; BLACKHAM, R.; SHAW, S. Ferrihydrite formation: the role of Fe₁₃ Keggin clusters. **Environmental Science Technology**, v. 50, n. 17, p. 9333–9342, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02481>

XING, H.; WANG, J.; LI, J.; FAN, Z.; WANG, M.; XU, S. Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and carboxylesterase in brain and muscle of

common carp. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 26–30, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.03.009>

XIONG, F.; WANG, H.; FENG, Y.; LI, Y.; HUA, X.; PANG, X.; ZHANG, S.; SONG, L.; ZHANG, Y.; GU, N. Cardioprotective activity of iron oxide nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 5, art. 8579, p. 1-8, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep08579>

YARJANLI, Z.; GHAEDI, K.; ESMAEILI, A.; RAHGOZAR, S.; ZARRABI, A. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. **BMC Neuroscience**, v. 18, n. 51, p. 1–12, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12868-017-0369-9>

ZHU, S.; LUO, F.; ZHU, B.; WANG, G-X. Mitochondrial impairment and oxidative stress mediated apoptosis induced by alpha-Fe₂O₃ nanoparticles in *Saccharomyces cerevisiae*, **Toxicology Research**, v. 6, n. 5, p. 719–728, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1039/c7tx00123a>

Anexo 1: Aprovação da CEUA



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 11/2022

Londrina, 22 de fevereiro de 2022.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: “**Proteção De Nanopartículas De Óxido De Ferro Contra Estresse Oxidativo Promovido por Herbicidas: Parâmetros Plasmáticos, Teciduais E Histológicos Em Ratos**” protocolo CEUA nº 057.2021 sob a responsabilidade de Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL) no dia 22/02/2022.

Este projeto tem por objetivo avaliar a eficácia da ferridrita, em proteger animais contra estresse oxidativo e danos no DNA provocados pelos herbicidas glifosato, Roundup® e atrazina. Com a administração dos herbicidas isolados ou em combinação com a ferridrita, pretende-se avaliar se essas substâncias: a) comprometem a ingestão alimentar e peso corpóreo, isto é, a saúde e o desenvolvimento do animal; b) interferem na atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos; c) promovem dano no DNA, pela análise do cometa; d) promovem dano oxidativo tecidual, pela avaliação histológica de órgãos. **Grau de invasividade: G13.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	22/02/2022 a 31/12/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico/Wistar
Nº de animais	162 (81 Fêmeas e 81 Machos)
Peso/ Idade	240-260
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue, encéfalo, fígado, rim e estômago

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UDEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Profª Drª Patrícia Chimim Perandini
Coordenadora da CEUA/UDEL

Hmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a) Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Fisiológicas

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/CCB

C/C para o Biotério Central/ CCB