



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RENATO MARCILIO ZILLI

**EFEITOS DE Roundup® E ATRAZINA, NA AUSÊNCIA E  
PRESENÇA DE GOETHITA, EM PARÂMETROS  
METABÓLICOS E HISTOLÓGICOS EM RATOS MACHOS E  
FÊMEAS**

---

Londrina  
2017



Sociedade Brasileira de Fisiologia  
SBFis



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

RENATO MARCILIO ZILLI

**Efeitos de Roundup® e atrazina, na ausência e presença de goethita,  
em parâmetros metabólicos e histológicos em ratos machos e fêmeas**

RENATO MARCILIO ZILLI

**EFEITOS DE Roundup® E ATRAZINA, NA AUSÊNCIA E  
PRESENÇA DE GOETHITA, EM PARÂMETROS  
METABÓLICOS E HISTOLÓGICOS EM RATOS MACHOS E  
FÊMEAS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cássia Thaïs  
Bussamra Vieira Zaia.

Londrina  
2017

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

Zilli, Renato Marcilio.

Efeitos de Roundup® e atrazina, na ausência e presença de goethita, em parâmetros metabólicos e histológicos em ratos machos e fêmeas / Renato Marcilio Zilli. - Londrina, 2017.  
86 f.

Orientador: Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Herbicidas - Tese. 2. Ingestão alimentar - Tese. 3. Alterações metabólicas - Tese. 4. Alterações histológicas - Tese. I. Zaia, Cássia Thaís Bussamra Vieira. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

RENATO MARCILIO ZILLI

**EFEITOS DE Roundup® E ATRAZINA, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA  
DE GOETHITA, EM PARÂMETROS METABÓLICOS E HISTOLÓGICOS  
EM RATOS MACHOS E FÊMEAS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Rui Curi  
Universidade de São Paulo - USP

---

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte  
Universidade de Estadual de Maringá - UEM

---

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa  
Universidade de Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 10 de março de 2017.

*“É necessário ter o caos cá dentro  
para gerar uma estrela.”*

*Friedrich Nietzsche*

À Deus e à Mãe de Deus, por me darem força nos momentos difíceis e a certeza de que tudo terminaria bem.

Aos meus admiráveis pais, Gilson Antônio Zilli e Sueli Antonietto Zilli; minha irmã, Letícia Gabriele Zilli; e a minha esposa, Mérci Fernandes da Costa pela confiança que depositaram em mim, pelo incentivo e pelo apoio em todas as situações.

## AGRADECIMENTOS

À minha professora e orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia, pela oportunidade, pelo apoio, conhecimentos a mim transferidos e pela contribuição na elaboração do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Dimas Augusto Morozin Zaia, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Farias e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristine Elizabeth Carneiro pela colaboração com este trabalho sempre que necessário, assim como pelo apoio intelectual.

De maneira especial a Amanda Luiza Gabriel Fernandes, Carolliny Isabely D'avila Boim, Ingridy Quitério Tini, João Guilherme Tassoni Bortoloci, Larissa Rugila dos Santos Stopa, Leônidas Gomes Angelin, Letícia Corrêa Nakatsukasa Takasumi, Letícia Antonietto Cigagna e Matheus Deroco Veloso da Silva, pela dedicação, empenho e perseverança, na qual, proporcionou o desenvolvimento e concretização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade, por oferecer toda a infraestrutura de seu laboratório proporcionando a possibilidade de efetuar as técnicas histológicas.

Aos professores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Cavatorta Ravelli, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Estefânia Gastaldello Moreira e Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa, pela colaboração.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas pelo apoio estrutural e aos amigos presentes, de maneira especial: Andressa Buseti Martins, Aryel Augusto Sartorelli Lyra, Karina Maturana Pinheiro, Marcela Cristina Garnica Siqueira, Pedro Henrique Trevizan Baú e Thamile Luciane Reus.

A todos os meus amigos e familiares simplesmente por existirem e me presentarem com o dom da amizade sincera e gratuita.

Ao PRONEX-CNPq-Fundação Araucária e CAPES pelo auxílio financeiro.

ZILLI, Renato Marcilio. **Efeitos de Roundup® e atrazina, na ausência e presença de goethita, em parâmetros metabólicos e histológicos em ratos machos e fêmeas.** 2017. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, 2017.

## RESUMO

Roundup® e atrazina são herbicidas usados mundialmente na agricultura no combate às plantas daninhas. Há vários estudos, em diferentes espécies de seres vivos, demonstrando efeitos tóxicos celulares e metabólicos desses herbicidas. O uso de nanopartículas é cada vez mais amplo visando a saúde e bem-estar animal. Goethitas, nanopartículas de óxido de ferro, têm a capacidade de adsorver tanto glifosato, produto ativo da formulação Roundup® quanto atrazina, sugerindo um possível papel protetor dos efeitos tóxicos desses herbicidas. O presente trabalho avaliou as alterações resultantes do Roundup®, atrazina, goethitas e associação de goethitas aos herbicidas sobre o ganho de peso corpóreo, ingestão alimentar, metabolismo periférico e parâmetros histológicos de ratos machos e fêmeas. Os animais foram tratados por gavagem diariamente com água de torneira (grupo controle) ou 1.000 e 2.000 mg/kg de peso corpóreo de Roundup® ou atrazina por 5 dias. As goethitas isoladas não desencadearam quaisquer alterações nos parâmetros plasmáticos ou histológicos avaliados. Não houve diferença estatística nas concentrações plasmáticas de glicose entre os grupos experimentais comparados com os grupos controles, exceto no grupo R1000fD2. A concentração de colesterol total se mostrou alterado apenas nos grupos de machos que receberam atrazina na maior dose em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ) e as goethitas não impediram essa resposta. Foi observado aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na concentração plasmática das enzimas ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase), em animais que receberam Roundup® e atrazina, sugerindo hepatotoxicidade, entretanto a concentração dessas enzimas não diferiu do controle com a associação às goethitas. A concentração plasmática de creatinina apresentou-se aumentada em grupos de ratos machos e fêmeas que receberam Roundup® e atrazina, em comparação aos grupos controles ( $p < 0,05$ ). A associação de goethita com atrazina, nas duas doses testadas, resultou em menor mortalidade dos animais. Pela análise dos parâmetros histológicos avaliados, observou-se que os herbicidas provocaram diminuição na espessura das camadas histológicas que compõem o estômago, refletindo em diminuição na espessura média total da parede do mesmo; no fígado observaram-se alterações nos diâmetros médios das veias centrolobulares e veias portas, além de alterações no número de hepatócitos ativos próximos a estes vasos; no rim foram evidenciadas alterações no espaço de Bowman e no diâmetro médio do corpúsculo, do glomérulo renal e dos túbulos contorcidos proximais e distais. A associação de goethitas à atrazina, mostrou-se eficaz em adsorver o herbicida e manter dentro da normalidade alguns dos parâmetros histológicos analisados. Conclui-se que a nanopartícula de goethita impediu, em alguns casos, que a administração do herbicida levasse o animal à morte ou promovesse alterações metabólicas ou histológicas nos protocolos estudados.

**Palavras-chave:** Ingestão alimentar. Peso corpóreo. AST. ALT. Estômago. Hepatócito. Creatinina.

ZILLI, Renato Marcilio. **Effects of Roundup® and atrazine, in the absence and presence of goethite, on metabolic and histological parameters in male and female rats.** 2017. 86 p. Thesis (Doctoral degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Roundup® and atrazine are herbicides used worldwide in agriculture to combat weeds. There are several studies, in different species of living beings, demonstrating the cellular and metabolic toxic effects of these herbicides. The use of nanoparticles is increasingly widespread for animal health and welfare. Goethites, nanoparticles of iron oxide, have the ability to absorb both glyphosate, the active product of the Roundup® formulation and atrazine, suggesting a possible protective role for the toxic effects of these herbicides. The present work evaluated the changes resulting from Roundup®, atrazine, goethites and the association of goethites to herbicides on body weight gain, food intake, peripheral metabolism and histological parameters of male and female rats. The animals were treated by gavage daily with tap water (control group) or 1,000 and 2,000 mg/kg body weight of Roundup® or atrazine for 5 days. The isolated goethites did not trigger any changes in the plasma or histological parameters evaluated. There was no statistical difference in plasma glucose concentrations between the experimental groups compared to the control groups, except in the R1000fD2 group. The total cholesterol concentration was altered only in the groups of males that received atrazine at the highest dose in comparison with the control ( $p < 0.05$ ) and the goethites did not prevent this response. A significant increase ( $p < 0.05$ ) in the plasma concentration of the ALT (alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase) enzymes was observed in animals that received Roundup® and atrazine, suggesting hepatotoxicity, however the concentration of these enzymes did not differ from the control with association to goethites. Plasma creatinine concentration was increased in groups of male and female rats receiving Roundup® and atrazine, compared to the control groups ( $p < 0.05$ ). The association of goethite with atrazine, in the two doses tested, resulted in lower mortality of the animals. By analyzing the histological parameters evaluated, it was observed that the herbicides caused a decrease in the thickness of the histological layers that compose the stomach, reflecting in a decrease in the average total wall thickness of the same; In the liver, changes were observed in the mean diameters of the centrilobular veins and portal veins, as well as changes in the number of active hepatocytes near these vessels; in the kidney, changes in Bowman's space and in the mean diameter of the corpuscle, the renal glomerulus, and the proximal and distal convoluted tubules were evidenced. The association of goethites to atrazine was effective in adsorbing the herbicide and maintaining within normality some of the analyzed histological parameters. It was concluded that the nanoparticle of goethite prevented, in some cases, that the administration of the herbicide would lead the animal to death or promote metabolic or histological changes in the protocols studied.

**Keywords:** Food intake. Body weight. AST. ALT. Stomach. Hepatocyte. Creatinine.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1. HERBICIDAS .....	12
1.2. NANOPARTÍCULAS E HERBICIDAS .....	15
<b>2. ESTRATÉGIAS</b> .....	<b>18</b>
2.1. ESTRATÉGIA GERAL .....	18
2.2. ESTRATÉGIAS ESPECÍFICAS .....	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
3.1. ANIMAIS .....	19
3.2. HERBICIDAS .....	19
3.3. NANOPARTÍCULAS DE FERRO .....	19
3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	20
3.4.1. Administração de herbicidas .....	20
3.4.2. Administração de goethitas e associação com herbicidas .....	21
3.5. EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAIS .....	21
3.6. DETERMINAÇÃO DO PESO CORPÓREO E INGESTÃO ALIMENTAR ....	21
3.7. DOSAGENS BIOQUÍMICAS PLASMÁTICAS .....	22
3.7.1. Dosagem de glicose plasmática .....	22
3.7.2. Dosagem de colesterol total .....	22
3.7.3. Dosagem de alanina aminotransferase (ALT) .....	23
3.7.4. Dosagem de aspartato aminotransferase (AST) .....	23
3.7.5. Dosagem da creatinina plasmática .....	24
3.8. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO .....	25
3.8.1. Análise histológica do fígado .....	25
3.8.2. Análise histológica do estômago .....	26
3.8.3. Análise histológica do rim .....	28
3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1. ESTUDO EM RATOS MACHOS .....	30
4.2. ESTUDO EM RATOS FÊMEAS .....	36
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>
<b>ANEXO 1 - TABELAS</b> .....	<b>60</b>
<b>ANEXO 2 - FIGURAS</b> .....	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HERBICIDAS

O herbicida Roundup® é registrado em mais de 100 países (WILLIAMS et al., 2000) para controle de plantas daninhas (REDDY, 2001) em culturas de soja, milho, canola e algodão, particularmente na Argentina, Brasil, Canadá e EUA (DUKE e POWLES, 2008). No Brasil, o Roundup® é responsável por 76% da comercialização de herbicidas (IBAMA, 2010), sendo que no período de 2000 a 2004 seu consumo apresentou aumento de 95% (LANGIANO e MARTINEZ, 2008).

O Roundup® é a formulação comercial do ingrediente ativo glifosato (n-fosfonometilglicina:  $C_3H_8NO_5P$ ) e de ingredientes denominados inertes (ACQUAVELLA et al., 2004), dentre eles o surfactante polioxietilenoamina (POEA), que é adicionado à formulação para aumentar a eficácia do herbicida (KNOCHE e BUKOVAC, 1992; TSUI e CHU, 2003; RICHARD et al., 2005; COX e SURGAN, 2006; BENACHOUR et al., 2007), favorecendo a difusão de glifosato pela cutícula da folha (HAEFS et al., 2002; LIU, 2004).

O grau de toxicidade de herbicidas é indicado nos frascos dos agroquímicos por meio de faixas de cores distintas indicando o grau de toxicidade, sendo que o glifosato recebe em sua embalagem a faixa azul, indicadora de toxicidade grau III, ou seja, mediamente tóxico (ALMEIDA, 2007; ANDEF, 2010), apresentando taxas de mortalidade de apenas 17% em casos de suicídio. Alguns estudos, no entanto, sugerem que o POEA tenha efeitos tóxicos, sendo inclusive considerado até três vezes mais tóxico que o próprio glifosato (GIESY et al., 2000).

A ampla utilização de Roundup® tem gerado preocupação sobre os potenciais efeitos adversos dos produtos químicos sobre o meio ambiente, podendo gerar toxicidade na condição de exposições intensas (WILLIAMS et al., 2000) com riscos à vida aquática (GIESY et al., 2000) e à saúde humana (FERON et al., 2002; LUSHCHAK et al., 2009). A concentração de glifosato usada em culturas de arroz e soja no sul do Brasil varia de 0,36 a 2,16 mg/L (GLUSCZAK et al., 2007), sendo estes os valores limites de tolerância e intervalos de segurança do glifosato em alimentos, conforme estabelecidos pela ANVISA em 2001 (ANVISA, 2001 *apud* AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

Os processos mais importantes de dissipação de glifosato e do seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) para ambientes terrestres e aquáticos pode ocorrer em solução e em suspensão (BORGGAARD e GIMSING, 2008). A meia-vida desses compostos, em

ambientes aquáticos, dependendo das condições do local, é relatada para variar de 7 a 14 dias e 21 a 42 dias, respectivamente (GIESY et al., 2000).

O glifosato é ligado aos constituintes do solo através do radical ácido fosfônico por um mecanismo semelhante ao do fosfato inorgânico e sua inatividade é principalmente devido à formação de complexos com metais (MORILLO et al., 2000), como óxidos de ferro e alumínio (TONI et al., 2006) e matéria orgânica (PICOLLO et al., 1996). A adsorção é atribuída à formação de complexos em solução entre glifosato e cátions (GLASS, 1987) na dependência do pH (BORGGAARD e GIMSING, 2008; CRUZ et al., 2007; JONGE e JONGE, 1999; McCONNELL e HOSSNER, 1985; MILES e MOYE, 1988) podendo persistir no solo adsorvido como resíduo ligado de forma irreversível (PRATA et al., 2005) resultando em muitos problemas ambientais (BENETOLI et al., 2010) ou lixiviar para águas subterrâneas (de SANTANA et al., 2006) comprometendo a vida aquática.

O ambiente aquático está sendo continuamente contaminado com produtos químicos tóxicos de atividades industriais, agrícolas e domésticos. A resposta biológica de um organismo aquático a xenobióticos após absorção e distribuição induz a alterações celulares e bioquímicas, em termos tanto estruturais, funcionais de células e tecidos como comportamentais do organismo (PARVEZ e RAISUDDIN, 2005).

A dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) oral de glifosato é maior que 5.000 mg/kg (WILLIAMS et al., 2000), no entanto, é possível notar vários estudos onde concentrações menores promovem diversas alterações no organismo. A severidade clínica e a taxa de mortalidade são correlacionadas com a quantidade de exposição (HSIAO et al., 2008). Vários estudos têm também avaliado a toxicidade de herbicidas na tentativa de associação com diferentes sintomas e patologias, tanto em humanos quanto em ratos.

Em caso de ingestão acidental de glifosato, ocorre inicialmente distribuição para o intestino delgado, cólon, rins e ossos, com grande parte do produto sendo degradado no local de absorção (ANADÓN et al., 2009) ou rapidamente excretado sem biotransformação na urina (BRADBERRY et al., 2004 *apud* CHANG e CHANG, 2009), corroborando estudos realizados em ratos Sprague-Dawley (BREWSTER et al., 1991). O herbicida, em seres humanos, é excretado na urina praticamente na forma inalterada, sendo detectada diminuta concentração do metabólito AMPA (HORI et al., 2003). A elevada ingestão de Roundup®, numa tentativa de suicídio, causa toxicidade significativa resultando em náuseas, vômitos, dor oral e abdominal, podendo ocorrer insuficiência renal e hepática e edema pulmonar (CHANG e CHANG, 2009), pancreatite aguda (HSIAO et al., 2008), acidose metabólica severa,

aumento do lactato sanguíneo e da osmolaridade plasmática com acetilcolinesterase inalterada (MALHOTRA et al., 2010).

Encontram-se vários estudos na literatura sobre roedores com exposição a agrotóxicos mostrando que tanto glifosato como Roundup® podem promover uma variedade de anormalidades funcionais na atividade específica das enzimas hepáticas, como alteração de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) com a presença de danos histológicos (BENEDETTI et al., 2004; HEYDENS et al., 2008) em ratos machos (VAINIO et al., 1983). Verifica-se ainda concentração diminuída de creatinina e glutatona reduzida; com aumento de ureia, ácido úrico, triglicérides e colesterol, quando administrados Roundup® ou glifosato intraperitonealmente por período de duas semanas (EL-SHENAWY, 2009), aumento do colesterol total e alterações de lipoproteínas (ÇAGLAR e KOLANKAYA, 2008), aumento significativo do colesterol plasmático em fêmeas submetidas a diferentes doses de Roundup®, por gavagem, sugerindo hepatotoxicidade (ROMANO et al., 2010), estresse oxidativo no fígado e cérebro de ratos (ASTIZ et al., 2009) e diminuição dos hormônios sexuais (DALLEGRAVE et al., 2007; ROMANO et al., 2010).

Outro herbicida amplamente utilizado na agricultura é a atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina), produto extensivamente usado para controle de ervas daninhas por inibir a fotossíntese em uma grande variedade de culturas (POGRMIC-MAJKIC et al., 2012), como milho, sorgo e cana-de-açúcar (BRZEZICKI et al., 2003) de maneira específica (fotossistema II) pela ação na cadeia transportadora de elétrons (PFISTER et al., 1979); sua persistência no solo é dependente do teor de matéria orgânica e pH (RAJKOVIC et al., 2011), sendo o pH 7 ótimo para o processo de biodegradação (DEHGHANI et al., 2013).

A atrazina é o segundo herbicida mais utilizado no Brasil, com aproximadamente 10 mil toneladas anuais (MINISTÉRIO do MEIO AMBIENTE, 2003), na qual sua ampla utilização pode proporcionar risco para os trabalhadores rurais e a população em geral devido aos resíduos na cultura e águas subterrâneas (McMULLIN et al., 2007). É um potencial contaminante devido as suas características químicas, tais como: lipofílico, hidrólise lenta, moderada a baixa solubilidade em água, e alta solubilidade em solventes orgânicos com alta absorção por matéria orgânica, argila, e tecido adiposo (ROSS et al., 2009).

Por via oral, a atrazina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal (CAMPOS-PEREIRA et al., 2012), é bioacumulável (ROSS et al., 2009) e seu metabolismo ocorre principalmente pelo citocromo P450, resultando em metabólitos plasmáticos (desetilatrizona, desisopropilatrizona e diaminoclorotriazina) que são excretados na urina (BRZEZICKI et al., 2003) permanecendo biologicamente ativos no ambiente (BARR et al., 2007).

A avaliação de toxicidade da atrazina associando diferentes sintomas e patologias, tanto em rato quanto em humanos, são muitos. A dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) oral deste herbicida é maior que 3.000 mg/kg de peso corpóreo em ratos (BRECKENRIDGE et al., 2010 *apud* SONG et al., 2015), no entanto, estudos com concentrações menores mostram diversas alterações no organismo.

Apesar da ampla literatura da ação da atrazina em diversos parâmetros avaliados, são poucos os estudos da ação deste herbicida sobre os parâmetros metabólicos. Estudos em ratos mostram que a atrazina promove inibição de hormônios do sistema reprodutor, além de alterações morfológicas e funcionais (COOPER et al., 2000; ELDRIDGE et al., 1994; ELDRIDGE et al., 1999; FORADORI et al., 2009; FORADORI et al., 2011; FORADORI et al., 2014; WETZEL et al., 1994). Valores elevados de AST, ALT e fosfatase alcalina (ALP) no fígado e aumento da creatinina e ureia nos rins (JESTADI et al., 2014); alterações nas enzimas antioxidantes de hepatócitos (CAMPOS-PEREIRA et al., 2012); estresse oxidativo no tecido renal (LIU et al., 2014) e ovariano (ZHAO et al., 2014); ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos fêmeas (FORADORI et al., 2011; FRAITES et al., 2009; GOLDMAN et al., 2013; LAWS et al., 2009); aumento da citocromo P450 em células intestinais (RAJKOVIC et al., 2011) são também encontrados; verifica-se também que esse herbicida pode se complexar a proteínas plasmáticas levando à hipóxia (DOOLEY et al., 2006); exposições crônicas promove obesidade abdominal e resistência insulínica por disfunção mitocondrial (LIM et al., 2009).

Deve ser ressaltado que poucos trabalhos na literatura descrevem os efeitos do glifosato, Roundup® e atrazina sobre o metabolismo energético de ratos e humanos. O número de pessoas com doenças associadas à distúrbios metabólicos é crescente no mundo (GHO, 2011; IBGE, 2010). No entanto, existem poucos estudos em humanos ou ratos, que relacionem diferentes distúrbios metabólicos à utilização indiscriminada de herbicidas.

## **1.2. NANOPARTÍCULAS E HERBICIDAS**

Poluentes geralmente são adsorvidos à superfície das nanopartículas de óxido de ferro, por meio de interações incluindo: adsorção física, troca iônica, ligação química (complexação e/ou quelação), ligações de hidrogênio e forças de Van Der Waals. A utilização de nanopartículas deve considerar as complexas condições ambientais, tais como: substâncias húmicas, temperatura e pH (XU et al., 2014). Apesar de alguns conhecimentos recentemente adquiridos sobre os efeitos das nanopartículas na toxicologia humana e, em menor escala, em

ecotoxicologia, pouco se sabe dos mecanismos de absorção biológica e ação de toxicidade, a respeito do transporte entre os compartimentos ambientais e biológicos e seu comportamento químico no meio ambiente (JU-NAM e LEAD, 2008).

A produção em escala industrial e ampla variedade de aplicações de nanopartículas fabricadas e sua possível liberação em quantidades consideráveis no ambiente aquático natural têm produzido uma crescente preocupação entre a nanotecnologia e a comunidade da ciência ambiental. Há muitas variáveis a considerar quando se trabalha com nanomaterial. Para se quantificar a concentração e alterações na forma físico-química destes materiais, um grande número de parâmetros deve ser avaliado, incluindo o tipo de material, tamanho, a área superficial específica, forma, superfície, carga, revestimento, dispersão, aglomeração, agregação, concentração e matriz (JU-NAM e LEAD, 2008).

Em geral, as nanopartículas podem ser metais (ouro, prata e ferro), nanopartículas inorgânicas (óxido de zinco, óxido de ferro, etc.), materiais a base de carbono, dentro outros. Estes nanomateriais apresentam diferentes morfologias, tais como esferas, tubos e prismas (todas as três dimensões entre 1 e 100 nm) e podem ligar-se a uma ampla variedade de substâncias, incluindo as proteínas, drogas e nucleotídeos (JU-NAM e LEAD, 2008; TESKE e DETWEILER, 2015). Há muitos trabalhos na literatura sobre nanomateriais baseados em carbono e óxido de titânio, porém, nanomateriais baseados em óxidos de ferro necessitam ser estudados com maiores detalhes.

Existem 16 tipos diferentes de óxidos de ferro, sendo alguns deles: goethita, wustita, lepidocrocita, ferridrita, feroxita, bernalita, hematita, magnetita e maghemita. Os óxidos de ferro consistem em arranjos de ânions (normalmente hexagonais ou cúbicos) nos quais os interstícios são parcialmente preenchidos com ferro bivalentes ou trivalentes.

Goethita é um mineral de óxido de ferro encontrado na natureza em diferentes cores (castanho, laranja, vermelho e amarelo) que recebeu este nome, em 1806, por Johann Georg Lenz, em homenagem ao poeta, filósofo e geocientista alemão Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832). Goethitas sintetizadas na presença de cisteína apresentam  $\text{pH}^{\text{PCZ}}$ <sup>1</sup> menor do que o de goethitas normais, isto é, goethitas com cisteína têm menos cargas positivas em sua superfície fazendo com que facilite a adsorção de moléculas carregadas positivamente (CARNEIRO et al., 2013).

Nanopartículas de óxido de ferro são quimicamente inertes sendo usados principalmente para distribuição de drogas (XIONG et al., 2015), ressonância magnética

---

<sup>1</sup>  $\text{pH}^{\text{PCZ}}$ : ponto de carga zero, onde o número de cargas positivas e negativas são iguais.

(ALVARIM et al., 2014; KIM et al., 2015; MESENTIER-LOURO et al., 2014; WACKER et al., 2014), imobilização de proteínas e bioseparação (XU et al., 2014), detecção e tratamento de câncer (NDONG et al., 2015) e quimioterápicos (SHENHAR e ROTELLO, 2003).

As nanopartículas de ferro possuem a capacidade de adsorver e transformar uma grande variedade de contaminantes do meio ambiente (BENETOLI et al., 2010). Estudos mostram que o glifosato e atrazina possuem alta afinidade por nanopartículas minerais e orgânicas, cujas reações entre estes compostos incluem desde simples adsorção física, química e até a formação de novas fases nano cristalinas (CRUZ et al., 2007). Esses herbicidas podem ser imobilizados por adsorção sobre nanopartículas, porém não há na literatura um consenso de qual é o fator preponderante (pH, força iônica da solução, óxidos de ferro, matéria orgânica, etc.) nesta imobilização (CARNEIRO et al., 2013).

Sabe-se que a maioria dos tecidos contém uma concentração substancial de ferro que pode ser maior do que a quantidade de nanopartículas de ferro injetados (BARGHEER et al., 2015). Nanopartículas podem representar riscos à saúde devido a sua capacidade de atingir qualquer parte dos órgãos e tecidos e sua interação com as funções celulares (BARATLI et al., 2014). No entanto, nenhuma alteração em termos de mortalidade, peso corpóreo, ingestão alimentar, observações clínicas, parâmetros hematológicos e bioquímicos, e lesões histológicas foram observados em ratos machos e fêmeas, que receberam nanopartículas de óxido de ferro na concentração de 2.000 mg/kg de peso corpóreo por 14 dias via oral (YUN et al., 2015).

Considerando que não existem muitos trabalhos na literatura caracterizando as modificações hormonais, metabólicas e teciduais causadas pela intoxicação por Roundup® ou atrazina, e a possibilidade de adsorção desses herbicidas à nanopartículas de óxido de ferro como uma forma de proteção para a saúde, torna-se relevante avaliar esta possibilidade em animais.

## **2. ESTRATÉGIAS**

### **2.1. ESTRATÉGIA GERAL**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da administração de Roundup®, atrazina e nanopartículas de óxido de ferro sobre o peso corpóreo, ingestão alimentar, parâmetros plasmáticos e histológicos em ratos machos e fêmeas.

### **2.2. ESTRATÉGIAS ESPECÍFICAS**

- a) Estudar, em ratos machos e fêmeas, os efeitos da administração de Roundup®, atrazina, goethitas isoladas ou goethitas seguida da administração de Roundup® ou atrazina, por gavagem, durante 5 e 4 dias, respectivamente, no índice de mortalidade, ganho de peso corpóreo e ingestão alimentar diários.
  
- b) Estudar, em ratos machos e fêmeas, os efeitos da administração de Roundup®, atrazina, goethitas isoladas ou goethitas seguida da administração de Roundup® ou atrazina, por gavagem, durante 5 e 4 dias, respectivamente, nas concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e creatinina, e de enzimas hepáticas (ALT e AST), e possíveis alterações histológicas (estômago, fígado e rim).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação, da Universidade Estadual de Londrina (protocolo n°. 30861.2014.66).

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos (peso = 220 - 250 g) e fêmeas (peso = 200 - 230 g), adultos, da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF), por pelo menos 4 dias de ambientação antes do início dos procedimentos experimentais, em gaiolas individuais, em ambiente controlado de luz (ciclo 12 h claro/escuro) e de temperatura ( $22 \pm 2$  °C), recebendo alimento e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo (LaFiNeM) do CIF/UEL sempre no mesmo período conforme o protocolo (8:00 às 9:00 h) para minimizar qualquer influência do ritmo circadiano e ingestão alimentar.

#### 3.2. HERBICIDAS

O herbicida Roundup® Original (R), cuja composição é de 480 g/L de sal de isopropilamina de glifosato, 360 g/L de equivalente ácido de n-fosfometil-glicina (glifosato) e 684 g/L de ingredientes inertes (Monsanto do Brasil LTDA) e o herbicida atrazina (ATR), cuja composição é de 500 g/L do princípio ativo (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) e 600 g/L de ingredientes inertes, foram adquiridos da Agrotterra Implementos e Defensivos Agrícolas, Ibiporã, PR.

#### 3.3. NANOPARTÍCULAS DE FERRO

As nanopartículas de óxido de ferro – goethitas (Go) – foram sintetizadas na forma pura (Go), ou com o aminoácido cisteína (proporção ferro: cisteína 1:1, em mol) em água ultrapura Milli-Q® (Goq) ou em água do mar sintética (Gom). Todas essas nanopartículas foram analisadas e caracterizadas pelas técnicas de fluorescência de raios-X, espectroscopia Mössbauer, espectroscopia vibracional, espectroscopia Raman, e termogravimetria, pelo Dr.

Dimas Augusto Morozin Zaia, no Laboratório de Química Prebiótica, do Departamento de Química da UEL, pelo Laboratório de Física Nuclear Aplicada, do Departamento de Física da UEL, pelo Laboratório de Espectroscopia da UEL e pelo Laboratório de Agronomia Experimental, da Universidade Estadual de Maringá (CARNEIRO et al., 2013).

### **3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

Os protocolos conduzidos nesse trabalho se basearam no *Guideline The Organization for Economic Co-operation and Development 423* (OECD 423), que determina que a dose de 2.000 mg/kg de peso corpóreo, é a máxima a ser utilizada para avaliação de toxicidade de herbicidas. Os seguintes protocolos foram realizados:

*Protocolo 1- Estudo, em ratos machos, dos efeitos da administração de herbicidas e goethitas sobre o peso corpóreo, ingestão alimentar, alguns parâmetros plasmáticos e histológicos*

*Protocolo 2- Estudo, em ratos fêmeas, dos efeitos da administração de herbicidas e goethitas sobre o peso corpóreo, ingestão alimentar, alguns parâmetros plasmáticos e histológicos*

Para tal, os ratos receberam, via gavagem, uma vez ao dia, sempre entre 8 e 9 h, dose diária do herbicida ou de goethita isolada ou sua associação com o herbicida, sendo nos machos (m) por 5 dias e nas fêmeas (f) somente por 4 dias, pois estudos prévios do laboratório mostraram mortalidade de 90 a 100% após administração dos herbicidas por 4 dias. O grupo controle (grupo C) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do herbicida. Tanto peso corpóreo como ingestão alimentar foram avaliados diariamente durante todo o período experimental. Todos os animais foram eutanasiados por decapitação ao término do protocolo experimental e foram coletados sangue para análises químicas (glicose, colesterol total, ALT, AST e creatinina) e tecidos para análise histológica.

#### **3.4.1. Administração de herbicidas**

Os animais receberam Roundup® nas doses de 1.000 mg/kg de peso corpóreo (grupos R1000m e R1000f; 0,208 mL/100 g de peso corpóreo) ou 2.000 mg/kg de peso corpóreo (grupos R2000m e R2000f; 0,416 mL/100 g de peso corpóreo). Essas doses utilizadas foram as que promoveram teratogenicidade, comprometimento do desenvolvimento de órgãos sexuais e mudanças em alguns parâmetros bioquímicos (DALLEGRAVE et al., 2003;

DALLEGRAVE et al., 2007; EL-SHENAWY, 2009). Nos ratos que receberam atrazina, administrou-se as doses de 1.000 mg/kg de peso corpóreo (grupos ATR1000m e ATR1000f; 0,2 mL/100 g de peso corpóreo) ou 2.000 mg/kg de peso corpóreo (grupos ATR2000m e ATR2000f; 0,4 mL/100 g de peso corpóreo), de acordo com estudos que mostraram alterações de enzimas antioxidantes (CAMPOS-PEREIRA et al., 2012).

### **3.4.2. Administração de goethitas e associação com herbicidas**

Os ratos foram tratados com dose de 0,4 mL/100 g de peso corpóreo de goethita pura (grupos Go: solução de 2,5 g de nanopartículas em 25 mL de água de torneira, na proporção 1:10), goethita em água ultrapura Milli-Q® mais cisteína (grupos Goq: solução de 2,5 g de nanopartículas em 25 mL de água de torneira, na proporção 1:10) ou goethita em água do mar mais cisteína (grupos Gom: solução de 2,5 g de nanopartículas em 25 mL de água de torneira, na proporção 1:10), ou a associação dessas goethitas com os herbicidas, sendo a goethita administrada 30 min antes da administração de Roundup® ou atrazina. A capacidade de adsorção de herbicidas na molécula de goethita definiu as proporções escolhidas (BENETOLI et al., 2010; CRUZ et al., 2007).

### **3.5. EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAIS**

A eutanásia foi feita por decapitação ocorrendo no 1º, 2º, 3º, 4º ou 5º dias após a gavagem (D1, D2, D3, D4 ou D5, respectivamente). Sangue foi coletado em tubo heparinizado, centrifugado a 14.000 x g por 20 min e o plasma obtido foi armazenado em freezer (-20 °C) para posteriores dosagens bioquímicas (glicose, colesterol total, ALT, AST e creatinina). Imediatamente após, foram também retirados o estômago, fígado e rim, e colocados em solução de Bouin 10% para posterior processamento histológico.

### **3.6. DETERMINAÇÃO DO PESO CORPÓREO E INGESTÃO ALIMENTAR**

O peso corpóreo de todos os ratos foi medido diariamente durante todo o período experimental e expresso em gramas. Para o cálculo da ingestão de alimentos, diariamente todos os animais recebiam ração para roedores (100 g/dia; Nuvilab CR1, Nuvital®), sendo as sobras retiradas após 24 h e a quantidade diária de alimento ingerido calculada pela diferença entre a oferta e sobra de alimentos e expressa em g/100 g de peso corpóreo.

### **3.7. DOSAGENS BIOQUÍMICAS PLASMÁTICAS**

#### **3.7.1. Dosagem de glicose plasmática**

A determinação da concentração plasmática de glicose foi feita com o KIT comercial enzimático Glicose BioLiquid (Laborclin – PR), baseado na reação de Trinder (1969), onde a glicose reage com a glicose oxidase produzindo ácido glicurônico e peróxido de hidrogênio; o peróxido de hidrogênio reage com o hidroxibenzoato de sódio e 4-aminofenazona com a peroxidase presente, produzindo quinoamina de coloração rósea. A intensidade da coloração rósea corresponde à concentração de glicose da amostra. Os tubos de padrão e amostras foram realizados em triplicata pipetando-se 10 µL de padrão de glicose (100 mg/dL) ou amostra de plasma e adicionando-se 1 mL de reagente; no tubo considerado como branco pipetou-se somente 1 mL de reagente. Os tubos foram homogeneizados por agitação e incubados em banho-maria a 37 °C, por 10 minutos; com subsequente leitura feita em espectrofotômetro (Shimadzu Mod. UV-1201) no comprimento de onda de 500 nm. Os resultados obtidos da concentração plasmática de glicose foram expressos em mg/dL.

#### **3.7.2. Dosagem de colesterol total**

A concentração plasmática de colesterol total foi determinada com o KIT comercial Colesterol BioLiquid (Laborclin – PR), baseado na reação enzimática de Allain et al (1974), onde a enzima colesterol esterase promove hidrólise dos ésteres de colesterol; o colesterol obtido nessa reação é oxidado pelo colesterol oxidase formando colest-4-en-3-ona e peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio produzido é avaliado por produto corado presente, originado pela reação com 4-aminofenazona e fenol na presença de peroxidase resultando em produto final de coloração rósea, cuja a intensidade da coloração rósea corresponde à concentração de colesterol total existente na amostra. As dosagens foram feitas sempre em triplicatas pipetando-se no tubo 10 µL de padrão de colesterol (200 mg/dL) ou amostra de plasma e 1 mL de reagente (no tubo branco pipetou-se apenas 1 mL de reagente). Após homogeneização, por agitação, e posterior incubação, dos tubos, em banho-maria a 37 °C por 5 minutos; fez-se leitura em espectrofotômetro (Shimadzu Mod. UV-1201) no comprimento de onda de 500 nm. Os resultados obtidos da concentração plasmática de colesterol total foram expressos em mg/dL.

### 3.7.3. Dosagem de alanina aminotransferase (ALT)

A determinação da concentração plasmática de ALT foi feita com o KIT comercial Transaminase Glutâmico-Pirúvica-TGP por colorimetria (Analisa), por método espectrofotométrico de Reitman-Frankel (1957). A enzima ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. O piruvato formado reage com a 2,4-dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio, sendo a intensidade de coloração proporcional à atividade enzimática da amostra. Todas as análises foram feitas em triplicata. Para a curva de calibração (0 U/mL; 28 U/mL; 57 U/mL; 97 U/mL e 150 U/mL), 0, 50, 100, 150 e 200 µL de padrão da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) foram pipetados; aos tubos foram acrescentados 100 µL de água destilada e 500 µL de reagente de cor, homogeneizados e deixados em repouso por 20 minutos e, após, 5 mL de NaOH foram adicionados a todos os tubos e após 5 minutos fez-se leitura em espectrofotômetro. Para as amostras de plasma, 250 µL de TGP-substrato foram colocados em tubos de ensaio e incubados em banho-maria a 37 °C por 2 minutos; após 50 µL de plasma foram adicionados, homogeneizados e incubados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos; em seguida 250 µL do reagente de cor foram adicionados, os tubos homogeneizados e deixados em repouso por 20 minutos; finalmente 2,5 mL do NaOH foram adicionados, os tubos homogeneizados e após 5 minutos fez-se leitura. Para as leituras, utilizou-se espectrofotômetro (Shimadzu Mod. UV-1201) no comprimento de onda de 505 nm, para o tubo (branco) utilizou-se água destilada. Os resultados obtidos da concentração plasmática de ALT foram expressos em U/L (U/mL x 0,482) e usou-se os pontos da curva de calibração como padrões.

### 3.7.4. Dosagem de aspartato aminotransferase (AST)

Para a determinação da concentração plasmática de AST foi utilizado o KIT comercial Transaminase Glutâmico-Oxalacética-TGO por colorimetria (Analisa), baseado no método espectrofotométrico de Reitman-Frankel (1957). A enzima AST catalisa a transferência do grupo amina da aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato. O oxaloacetato formado reage com a 2,4-dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio, sendo esta intensidade de coloração proporcional à atividade enzimática da amostra. Todas as análises foram feitas em triplicata. Para a curva de calibração (0 U/mL; 24 U/mL; 61 U/mL; 114 U/mL e 190 U/mL), 0, 50, 100, 150 e 200 µL de padrão da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) foram pipetados; aos tubos foram acrescentados 100 µL de água destilada e 500 µL de reagente de cor,

homogeneizados e deixados em repouso por 20 min à temperatura ambiente. Após, 5 mL de NaOH foram adicionados a todos os tubos e após 5 minutos fez-se leitura em espectrofotômetro. Para as amostras de plasma, 250 µL de TGO-substrato foram colocados em tubos de ensaio e incubados em banho-maria a 37 °C por 2 minutos; após 100 µL de plasma foram adicionados, homogeneizados e incubados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos; em seguida 250 µL do reagente de cor foram adicionados, os tubos homogeneizados e deixados em repouso por 20 minutos; finalmente 2,5 mL do NaOH foram adicionados, os tubos homogeneizados e após 5 minutos fez-se leitura. Para as leituras, utilizou-se espectrofotômetro (Shimadzu Mod. UV-1201) no comprimento de onda de 505 nm, para o tubo (branco) utilizou-se água destilada. A concentração plasmática de AST foi expressa em U/L ( $U/mL \times 0,482$ ) usando-se os pontos da curva de calibração como padrões.

### **3.7.5. Dosagem da creatinina plasmática**

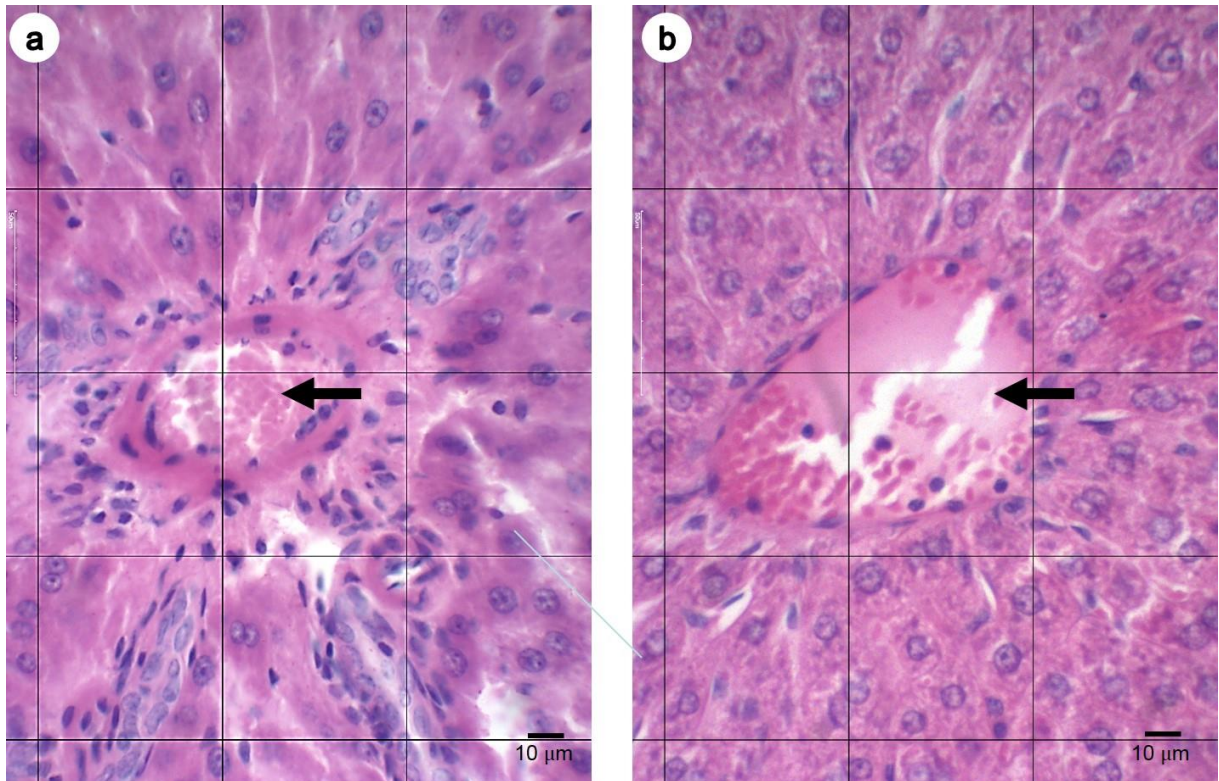
A concentração plasmática de creatinina foi determinada por KIT comercial pelo método de colorimetria (Analisa). O KIT utilizado baseia-se no método colorimétrico picrato alcalino. A creatinina e os interferentes presentes na amostra reagem com o picrato alcalino, formando um complexo colorido que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0 e decompõe o picrato de creatinina, deixando inalterada a cor derivada dos cromogênios que também é medida fotometricamente. Nesta metodologia, mede-se a absorção do complexo formado antes e após a acidificação do meio. O valor de creatinina da amostra é calculado pela diferença entre as duas leituras fotométricas ( $A_1$  e  $A_2$ ). As dosagens foram feitas em triplicatas pipetando-se no tubo 0,25 mL de padrão de creatinina (4,0 mg/dL) ou amostra de plasma, 2 mL de tampão alcalino e 0,5 mL de ácido pícrico; no tubo branco pipetou-se 0,25 mL de água destilada, 2 mL de tampão alcalino e 0,5 mL de ácido pícrico. Realizou-se homogeneização, por agitação, e posterior incubação dos tubos, em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. A primeira absorbância da amostra foi considerada  $A_1$ . Posteriormente, adicionou-se o acidificante, efetuou-se a homogeneização e esperou 5 minutos na temperatura ambiente; uma segunda leitura foi realizada das amostras sendo considerados os valores de absorbância de  $A_2$ . O valor das amostras foi calculado da seguinte forma:  $\Delta A (A_1 - A_2)$ . Fez-se leitura em espectrofotômetro (Shimadzu Mod. UV-1201) no comprimento de onda de 510 nm. A concentração plasmática de creatinina foi expressa em mg/dL e usando-se o fator de calibração como padrões.

### **3.8. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO**

Após a eutanásia, rapidamente foram retirados fígado (lobo lateral esquerdo), estômago (as porções de fundo e corpo foram separadas) e rim (esquerdo) e imediatamente colocados em solução fixadora de Bouin 10% por 48 horas. Após, os órgãos foram retirados da solução fixadora e permaneceram em álcool etílico 70% até ser realizado o protocolo de desidratação. Utilizou-se protocolo padrão de histologia em parafina para inclusão dos órgãos que foram cortados na espessura de 7  $\mu\text{m}$  em micrótomo de parafina, a coloração com a solução corante de hematoxilina-eosina e após foi feita a montagem das lâminas (MICHALANY, 1980). As observações e a captura de imagens foram realizadas em sistema de captura de imagens Moticam (Motic, Xiamen, China) acoplado ao fotomicroscópio (Axiophot, Zeiss, Alemanha) do Departamento de Histologia da UEL. A captura e análise das imagens foram feitas com auxílio do software Motic Image Plus 2.0 (Motic, Xiamen, China) com sistema de captura de imagens Moticam (Motic, Xiamen, China) acoplado a um fotomicroscópio (Axiophot, Zeiss, Alemanha). O processamento histológico e análise dos resultados foram feitos no Laboratório de Análise Histopatológica (LaHip) do Departamento de Histologia da UEL.

#### **3.8.1. Análise histológica do fígado**

A análise histológica do fígado foi realizada em imagens capturadas em aumento de 200 x, onde foram determinados: o diâmetro da veia centrolobular (média da medição em cruz de 5 veias centrolobulares por lâmina histológica, por animal); o número de hepatócitos mais ativos e menos ativos, em um quadrante de 1.000  $\mu\text{m}^2$  próximo à cada veia centrolobular anteriormente medida. Foram considerados os hepatócitos mais ativos aqueles cujo núcleo apresentou cromatina frouxa e os menos ativos, aqueles com cromatina condensada; a presença ou ausência de infiltrado de células inflamatórias nos mesmos quadrantes estabelecidos no critério anterior; o diâmetro da veia porta: média da medição em cruz de 5 veias porta por lâmina histológica por animal; o número de células aderidas às veias porta onde foi realizada a determinação do diâmetro (figura 1).

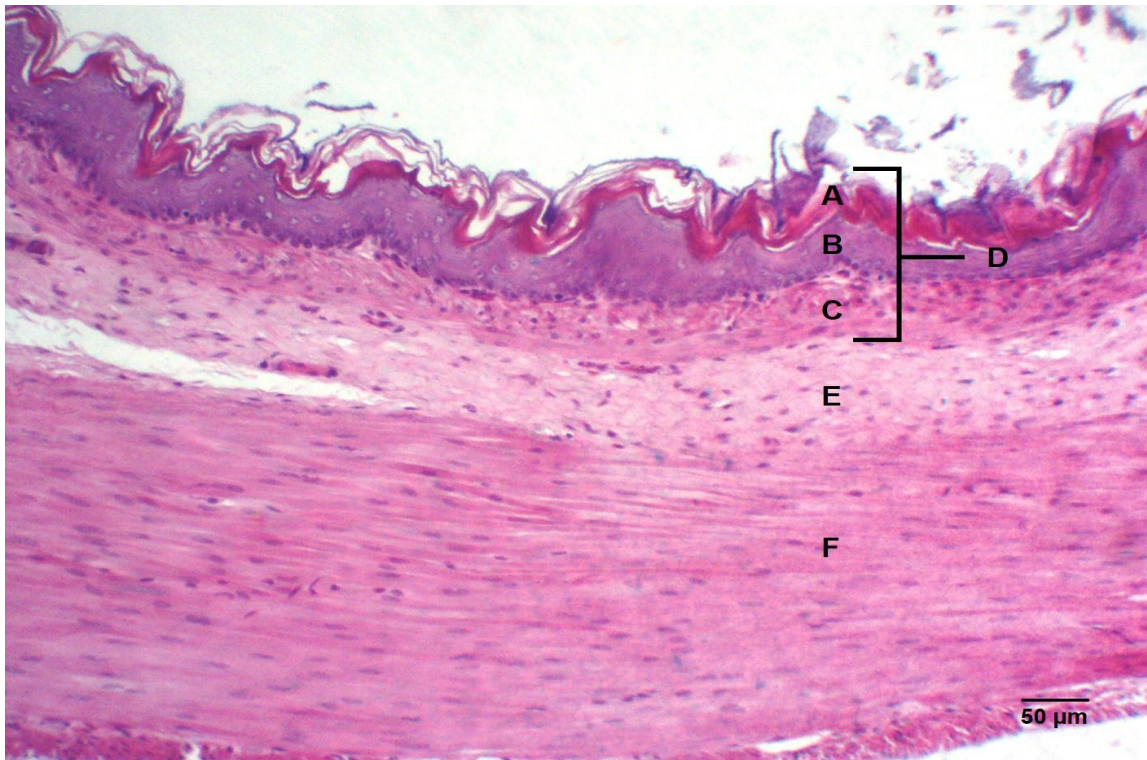


**Figura 1.** Fotomicrografia do fígado: a) região da veia porta (←); b) região da veia centrolobular (←). Foram delimitados campos com áreas de  $250 \mu\text{m}^2$  para quantificação de hepatócitos ativos. Coloração: hematoxilina e eosina; aumento de 400 x.

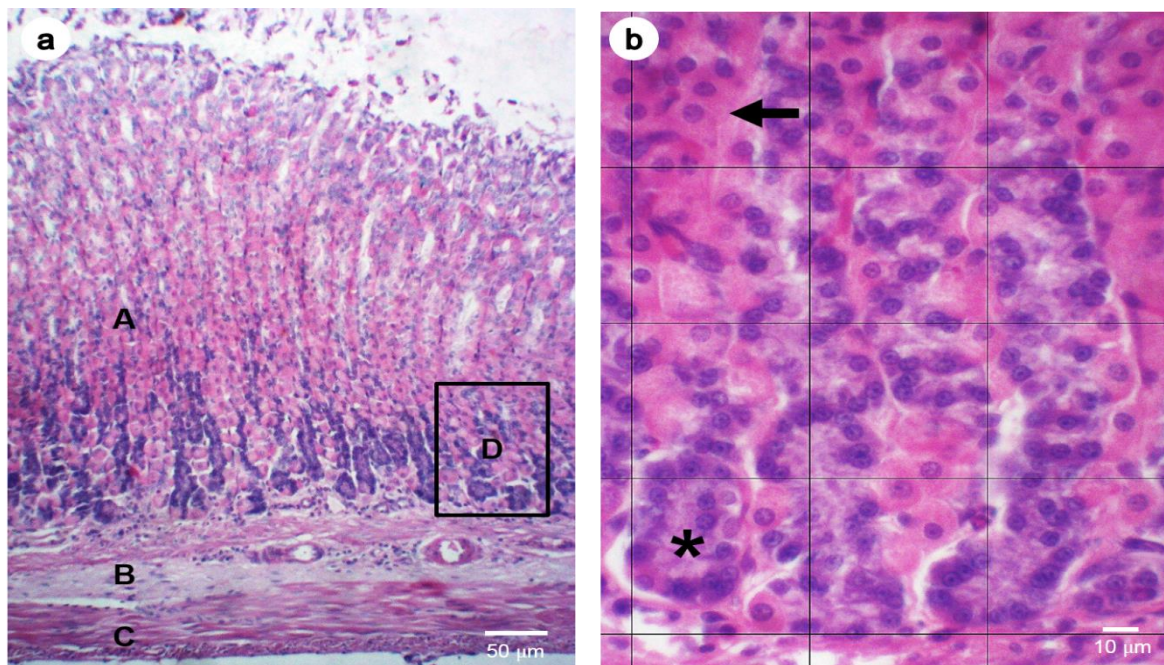
### 3.8.2. Análise histológica do estômago

As análises histológicas das porções do fundo no estômago foram realizadas em aumento de 100 x, com captura de 6 imagens por lâmina, em campos que apresentaram as camadas mucosa (queratina; epitélio de revestimento; lâmina própria), submucosa, muscular e serosa íntegras. Em cada uma destas imagens, em 3 regiões distintas, foram realizadas as medições de cada uma das camadas. Ao final, a somatória destas medidas resultou na espessura total da parede do órgão (figura 2).

As análises histológicas das porções do corpo no estômago em aumento de 400 x onde foram capturadas 6 imagens da camada mucosa, por lâmina. Na região da base das glândulas gástricas foram delimitados 4 campos por imagem, com áreas de  $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$  ( $250 \mu\text{m}^2$ ), onde foi realizada a contagem das células zimogênicas ou principais. Na região do colo das glândulas gástricas foram delimitados 4 campos por imagem, com áreas de  $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$  ( $250 \mu\text{m}^2$ ), onde foi realizada a contagem de células parietais ou oxínticas (figura 3).



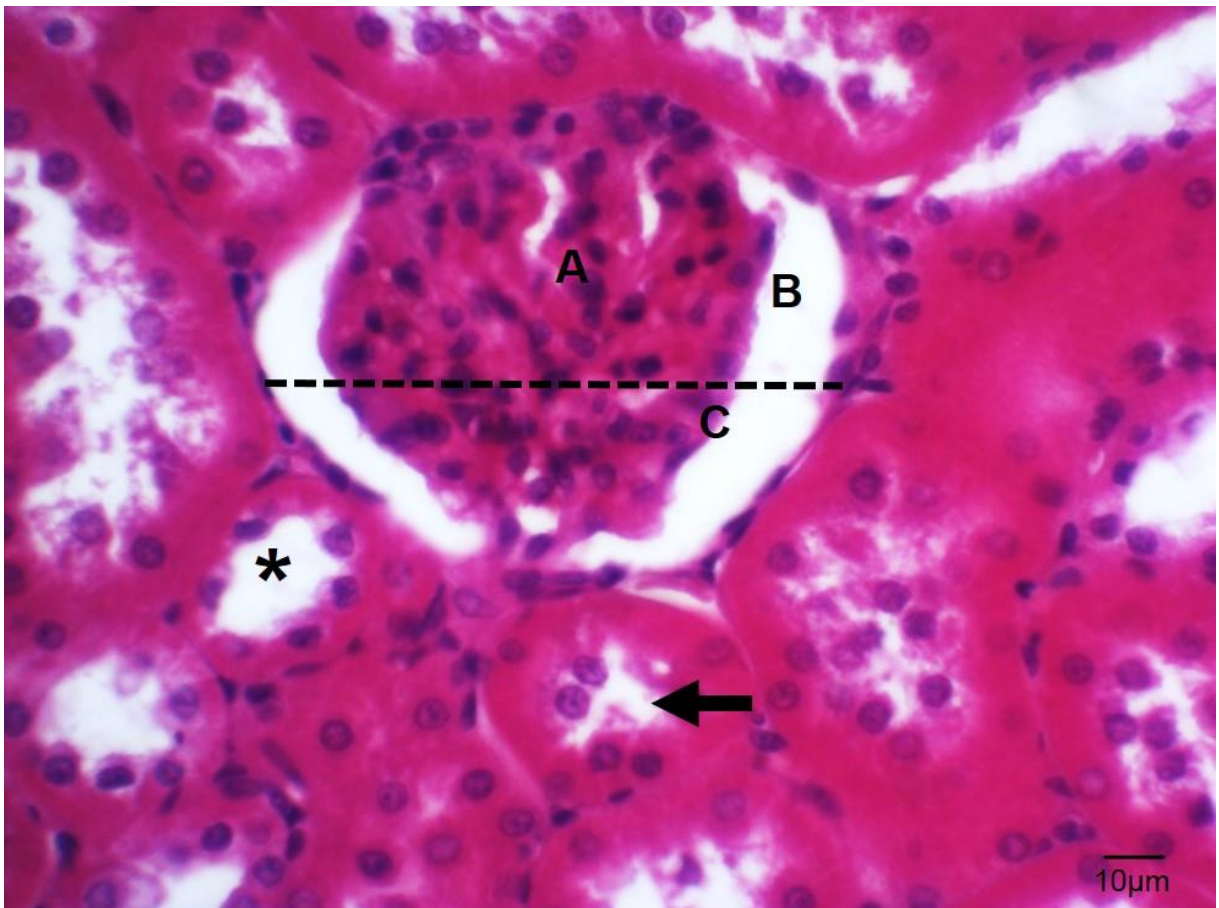
**Figura 2.** Fotomicrografia do fundo do estômago, onde são evidenciados os seguintes componentes: queratina (A); epitélio de revestimento (B); lâmina própria (C); camada mucosa (D); camada submucosa (E); camada muscular (F). Coloração: hematoxilina e eosina; aumento de 100 x.



**Figura 3.** Fotomicrografia da parede do corpo do estômago: a) aumento de 100 x, onde são evidenciados os seguintes componentes: camada mucosa (A), camada submucosa (D), camada muscular (C) e região de glândulas gástricas (D); b) aumento de 400 x de uma região de glândulas gástricas, onde foram delimitados campos com áreas de  $250 \mu\text{m}^2$  para quantificação de células oxínticas ( $\leftarrow$ ) e células zimogênicas (\*). Coloração: hematoxilina e eosina.

### 3.8.3. Análise histológica do rim

Para a análise histológica do rim foram capturadas 10 imagens por lâmina da região cortical, em aumento de 400 x, que continham corpúsculos renais e para determinação do polo vascular e urinário de cada um. O diâmetro dos corpúsculos foi determinado considerando o menor e o maior diâmetro dessa estrutura, tendo como ponto de partida o polo vascular. Nesses corpúsculos também foram realizadas medições do espaço de Bowman em 3 locais: à direita, à esquerda e no polo urinário. Em cada imagem foi determinado o diâmetro de 1 túbulo contorcido proximal e 1 túbulo contorcido distal, considerando o menor e o maior diâmetro dessas estruturas. A frequência de infiltrados inflamatórios nas imagens analisadas foi determinada pela verificação de presença/ausência em cada imagem capturada (figura 4).



**Figura 4.** Fotomicrografia da região cortical do rim, onde são evidenciados os seguintes componentes: glomérulo (A); espaço de Bowman (B); corpúsculo renal (C); túbulo contorcido proximal (←); túbulo contorcido distal (\*). Coloração: hematoxilina e eosina; aumento de 400 x.

### 3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados obtidos das determinações bioquímicas, foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). A distribuição normal e a homogeneidade dos dados foram testados. O teste "t" de Student (Student's *t* test) foi utilizado para comparações simples e para comparações múltiplas usando ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls (SNK). Para as análises estatísticas das peças histológicas utilizou-se análise de variância (paramétrica ou não paramétrica, dependendo da normalidade e homogeneidade de variância) para a comparação dos resultados obtidos nos diferentes tratamentos experimentais (ANOVA *one way*, teste de Tukey). Foi considerado como nível de significância  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ESTUDO EM RATOS MACHOS

Efeitos da administração de herbicidas e goethitas sobre o peso corpóreo, ingestão alimentar, alguns parâmetros metabólicos e histológicos.

Os valores médios diários do ganho de peso corpóreo (g), a porcentagem de mortalidade (%) e a quantidade de alimento ingerido diário (g/100 g de peso corpóreo) de ratos machos que receberam herbicidas podem ser encontrados na tabela 1 e 2, respectivamente (Anexo 1).

Os grupos que receberam somente as goethitas apresentaram os valores médios de ganho de peso corpóreo (tabela 1) e de ingestão alimentar (tabela 2) semelhantes ao do grupo controle. A porcentagem de mortalidade (tabela 1) desses animais tratados com as goethitas foi zero (0%).

Os grupos R1000m e R2000m apresentaram diminuição significativa, comparado com o controle (Cm), em relação ao ganho de peso corpóreo a partir do 4º e 3º dias de administração, respectivamente, sendo que a dose mais baixa promoveu morte dos animais no 5º dia e a mais elevada no 4º dia da administração. Com relação à ingestão de alimentos, diminuição significativa está presente desde o primeiro dia após a administração de Roundup®. A associação das duas goethitas com R2000m determinou significativa diminuição no ganho de peso corpóreo e ingestão de alimentos semelhante à administração do herbicida sozinho. Nos grupos Goq+R1000m e Gom+R1000m, no mesmo período após o herbicida, houve perda de peso de 17,7% e 7,9%, respectivamente, em comparação com o grupo R1000m. Apesar da porcentagem de diminuição de peso corpóreo do grupo Gom+R1000m ter sido menor, a mortalidade desses animais ocorreu no mesmo período que foi observado quando do herbicida sozinho.

Os grupos que receberam as goethitas associadas ao herbicida Roundup® (Goq+R1000m, Goq+R2000m, Gom+R1000m e Gom+R2000m) apresentaram índice de mortalidade idêntica aos grupos R1000m e R2000m (tabela 1).

As doses do herbicida atrazina promoveram significativa diminuição da quantidade de alimento ingerido após o 1º dia de administração e perda de peso a partir do 2º dia (ATR1000m) e 3º dia (ATR2000m), comparado com o controle.

Os grupos que receberam as goethitas antes da atrazina apresentaram diminuição significativa da quantidade de alimento ingerido, comparado ao grupo Cm, durante todo o

período estudado. Os grupos Goq+ATR1000m e Gom+ATR1000m apresentaram perda de peso de 8,2% e 17,3%, respectivamente, em comparação com o grupo ATR1000m e os grupos Goq+ATR2000m e Gom+ATR2000m, apresentaram perda de peso de 11,7% e 19,6%, respectivamente, em comparação com o grupo ATR2000m, mostrando que a Goq determinou uma menor perda de peso que a Gom na associação com ATR, em ambas as doses estudadas.

Os grupos que receberam as goethitas associadas ao herbicida atrazina (Goq+ATR2000m Gom+ATR1000m, e Gom+ATR2000m) apresentaram diminuição de mortalidade em 48%, 100% e 48%, respectivamente, em comparação com os grupos (ATR1000m e ATR2000m). O grupo Goq+ATR1000m mostrou mortalidade semelhante ao grupo ATR1000m (tabela 1). A nanopartícula Gom, mas não Goq foi capaz de reduzir a mortalidade dos animais que receberam atrazina.

Os valores médios dos parâmetros plasmáticos de glicose, colesterol total, ALT, AST e creatinina avaliados podem ser observados na tabela 3. Não houve diferença estatística na glicemia entre todos os grupos experimentais comparados ao grupo Cm. Com relação à concentração plasmática de colesterol, apenas os grupos que receberam ATR2000m em D4 e D5, Goq+ATR2000m e Gom+ATR2000m ( $p < 0,05$ ) apresentaram aumento significativo em relação ao grupo Cm.

As duas goethitas isoladas não alteraram a concentração das enzimas hepáticas estudadas. Em relação à concentração de ALT, observou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) para os grupos R1000mD1, D2 e D3, R2000mD1 e D2, ATR1000mD4 e D5 e ATR2000mD2, D3, D4 e D5, comparados ao grupo Cm. A associação com as goethitas não promoveu alteração dessas respostas. Com relação aos herbicidas isolados, a concentração da enzima AST se mostrou aumentada nos grupos ATR2000m em D4 e D5 ( $p < 0,05$ ). Na associação das goethitas, verificou-se que no grupo Goq+ATR2000mD5 ( $p < 0,05$ ) a concentração da enzima AST aumentou e no grupo Gom+ATR2000mD5 a concentração da enzima AST não apresentou concentração estatisticamente diferente do Cm.

Em relação à concentração da creatinina plasmática houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos grupos R1000mD2, D3 e D4, R2000mD1 e D2, ATR1000mD3, D4 e D5, ATR2000mD2, D3, D4 e D5, comparados ao grupo Cm. As duas goethitas isoladas não alteraram a concentração da creatinina plasmática. Com a associação das goethitas, verificou-se que nos grupos Goq+R1000mD4, Goq+ATR1000mD5, Goq+ATR2000mD5, Gom+R1000mD4, Gom+ATR1000mD5 e Gom+ATR2000mD5 a concentração da creatinina plasmática apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) comparados ao grupo controle (Cm).

Os resultados das análises histológicas de estômago, fígado e rim dos grupos de ratos machos tratados com Roundup® 1.000 mg/kg de peso corpóreo, goethitas isoladas ou associação de ambos encontram-se nas figuras 5 a 12 (Anexo 2).

Em decorrência das características anatômicas do estômago de ratos Wistar e conseqüentemente da variação no plano de corte utilizado, foi realizada a transformação dos dados obtidos em porcentagens, considerando 100% o maior valor em cada grupo, para cada critério. O fundo do estômago de ratos Wistar tratados com Roundup® apresentou alterações na espessura de todas as camadas histológicas. Houve aumento médio na camada de queratina somente em R1000mD4 (figura 5A), aumento da camada epitelial a partir de R1000mD1 (figura 5B) e aumento na lâmina própria, apenas em R1000mD1 e R1000mD2 (figura 5C). A soma destes dados resultou no aumento da camada mucosa em resposta à administração de Roundup® em todos os grupos (figura 5D). Na camada submucosa houve aumento de R1000mD1 a R1000mD3 (figura 5E). Foi observada atrofia da camada muscular em todos os grupos tratados com Roundup® (figura 5F). A técnica histológica empregada não permitiu evidenciar a camada serosa do fundo do estômago destes animais. Em decorrência das alterações citadas e considerando que a camada muscular constitui aproximadamente 50% da parede do órgão, houve diminuição na espessura total da parede do estômago em resposta ao Roundup® (figura 5G).

Com relação à espessura média da camada de queratina (figura 6) nos animais tratados somente com goethita isolada, houve aumento apenas em Gom1000mD4. Nos animais tratados com Roundup® houve aumento em todos os grupos (R1000mD4, Gom+R1000mD4 e Goq+R1000mD4) (figura 6A). Em todos os grupos foi verificado o aumento da espessura média da camada de células epiteliais (figura 6B). Nos grupos tratados apenas com goethita isolada (Gom1000mD4 e Goq1000mD4) foi verificado aumento na espessura média da lâmina própria (figura 6C). A soma destes dados permite inferir que houve aumento da camada mucosa em resposta à goethita isolada ou associada ao Roundup® (figura 6D). Houve aumento na espessura média da camada submucosa nos grupos tratados com goethita isolada (Gom1000mD4 e Goq1000mD4) e associada ao Roundup® (Gom+R1000mD4 e Goq+R1000mD4) (figura 6E). A camada muscular sofreu atrofia em resposta à administração de Roundup® (R1000mD4), com goethita isolada (Gom1000mD4 e Goq1000mD4) e à associação de ambos (Gom+R1000mD4 e Goq+R1000mD4) (figura 6F) e diminuição na espessura total da parede do estômago (figura 6G), exceto no grupo Goq+R1000mD4.

Na parede do corpo do estômago de ratos com administração de Roundup® 1.000 mg/kg de peso corpóreo (figura 7), foi observado aumento na espessura média da camada

mucosa a partir de R1000mD2 (figura 7A). Nas glândulas gástricas, foram observadas alterações no número de células oxínticas em R1000mD1 (figura 7B). O número de células zimogênicas apresentou discreta diminuição em R1000mD1 (figura 7C). Houve também diminuição da espessura média da submucosa a partir de R1000mD1 (figura 7D) e atrofia da camada muscular em R1000mD2 e R1000mD3 (figura 7E). A soma destes dados resultou na diminuição da espessura média da parede do corpo do estômago em resposta à administração de Roundup® (figura 7F).

A administração de goethita isolada ou sua associação com o herbicida pode ser analisada na figura 8. Observa-se que as goethitas isoladas e R1000m sozinhos causaram aumento da espessura média da camada mucosa. Resultado semelhante foi observado no grupo Goq+R1000mD4. Assim, apenas o grupo Gom+R1000mD4 apresentou resultados semelhantes ao Cm (figura 8A). Houve aumento no número de células oxínticas apenas no grupo Gom1000mD4 (figura 8B) e pequena diminuição no número de células zimogênicas (figura 8C). Os grupos tratados com R1000m ou goethita isolada apresentaram diminuição na espessura média da camada submucosa. Nos grupos tratados com associação de goethita ao Roundup® os resultados foram semelhantes ao controle (figura 8D). Apenas os grupos que foram tratados com Gom1000m e Goq+R1000m apresentaram atrofia da camada muscular (figura 8E). Houve diminuição da espessura total média da parede do corpo do estômago em todos os grupos tratados com goethita isolada e associada ao Roundup® (figura 8F).

Foram observadas alterações histológicas significativas no fígado de ratos com administração de Roundup® 1.000 mg/kg de peso corpóreo (figura 9). Houve diminuição do diâmetro médio da veia centrolobular no grupo R1000mD3 (figura 9A) e aumento do diâmetro médio da veia porta hepática nos grupos R1000mD1 e R1000mD4 (figura 9B). O número médio de hepatócitos ativos próximos à veia centrolobular foi maior nos grupos R1000mD1 a R1000mD3 comparados ao grupo controle, além disso, houve aumento pronunciado do número destas células no grupo R1000mD4 em relação ao grupo R1000mD3 (figura 9C). Na região da veia porta houve aumento no número médio de hepatócitos ativos apenas em R1000mD4 (figura 9D).

Os resultados das goethitas isoladas e sua associação ao herbicida estão na figura 10. Não se observaram alterações no diâmetro médio da veia centrolobular em todos os grupos (figura 10A). Os grupos R1000mD4, Gom1000mD4 e Goq1000mD4 apresentaram dilatação da veia porta. No entanto, os grupos Gom+R1000mD4 e Goq+R1000mD4 apresentaram resultados semelhantes ao Cm (figura 10B). Não houve alteração no número médio de hepatócitos ativos próximos à veia centrolobular nos grupos tratados apenas com goethitas

isoladas. Os grupos tratados com goethita associada ao Roundup® apresentaram resultados menores que o grupo R1000mD4 e semelhantes ao grupo controle (figura 10C). Com relação aos hepatócitos ativos próximos à veia porta, os grupos tratados apenas com goethita isolada apresentaram valores médios maiores que o grupo Cm, enquanto nos grupos Gom+R1000mD4 e Goq+R1000mD4, os resultados foram semelhantes ao Cm (figura 10D).

Na figura 11 encontram-se os dados da análise histológica do tecido renal. A administração com Roundup® causou alterações na maioria das características histológicas analisadas nos rins dos ratos. O grupo R1000mD1 e R1000mD4 apresentaram diminuição do espaço de Bowman (figura 11A) e aumento nos diâmetros médios dos glomérulos (figura 11B). Os corpúsculos renais tiveram aumento apenas em R1000mD1 (figura 11C). O diâmetro médio dos túbulos contorcidos proximais foi menor que o grupo controle apenas em R1000mD1 e R1000mD3 (figura 11D). Nos túbulos contorcidos distais houve alterações significativas no grupo R1000mD3 (figura 11E).

Na figura 12 encontram-se os resultados do tecido renal dos animais com goethitas isoladas ou sua associação com o herbicida. Houve aumento no espaço de Bowman em resposta ao grupo Gom1000m e também associada ao Roundup®. Nos grupos onde foi utilizada Goq1000m não houve alteração no espaço de Bowman (figura 12A); observou-se alteração no diâmetro médio dos glomérulos apenas em Gom+R1000mD4 (figura 12B); não se verificou alterações no corpúsculo renal dos animais quando comparados ao grupo controle (figura 12C). Não houve alterações nos túbulos contorcidos proximais e distais (figura 12D e 12E).

Para os dados histológicos, foi realizada a transformação dos dados obtidos em porcentagens, considerando 100% o maior valor em cada grupo, para cada critério. O fundo do estômago de ratos Wistar tratados com atrazina apresentou alterações na espessura de todas as camadas histológicas. Houve diminuição na camada de queratina somente em ATR1000mD4 (figura 13A), diminuição da camada epitelial e na lâmina própria em ATR1000mD4 e D5 (figura 13B e 13C). A soma destes dados resultou na diminuição da camada mucosa em resposta à administração de atrazina em todos os grupos (figura 13D). Na camada submucosa houve diminuição de ATR1000mD4 e D5 (figura 13E). Foi observada atrofia da camada muscular em todos os grupos tratados com atrazina (figura 13F). A técnica histológica empregada não permitiu evidenciar a camada serosa do fundo do estômago destes animais. Em decorrência das alterações citadas e considerando que a camada muscular constitui aproximadamente 50% da parede do órgão, houve diminuição na espessura total da parede do estômago em resposta à atrazina (figura 13G).

Na parede do corpo do estômago de ratos com administração de atrazina 1.000 mg/kg de peso corpóreo (figura 14), foi observado diminuição na espessura média da camada mucosa em ATR1000mD4 e D5 (figura 14A). Nas glândulas gástricas, foram observadas alterações no número de células oxínticas em ATR1000mD4 e D5 (figura 14B). O número de células zimogênicas apresentou aumento em ATR1000mD5 (figura 14C). Houve também diminuição da espessura média da submucosa em ATR1000mD4 e D5 (figura 14D) e atrofia da camada muscular em ATR1000mD4 e ATR1000mD5 (figura 14E). A soma destes dados resultou na diminuição da espessura média da parede do corpo do estômago em resposta à administração de atrazina (figura 14F).

A camada de queratina e o epitélio de revestimento apresentaram aumento significativo em ATR2000mD4 e ATR2000mD5 (figura 15A e 15B), diminuição na lâmina própria apenas em ATR2000mD5 (figura 15C). Em relação a camada mucosa, houve aumento em resposta à administração de atrazina em ATR2000mD4 e ATR2000mD5 (figura 15D). Na camada submucosa, os grupos experimentais foram semelhantes ao grupo Cm (figura 15E). Para os resultados da camada muscular, foi observada atrofia em todos os grupos tratados com atrazina (figura 15F). Em decorrência das alterações relatadas e considerando que a camada muscular constitui aproximadamente 50% da parede do órgão, houve diminuição na espessura total da parede do estômago em resposta à atrazina 2.000 mg/kg de peso corpóreo em D4 e D5 (figura 15G).

Na parede do corpo do estômago de ratos tratados com atrazina 2.000 mg/kg de peso corpóreo (figura 16), observou-se aumento na espessura média da camada mucosa em ATR2000mD4 e D5 (figura 16A). Nas glândulas gástricas, o número de células oxínticas apresentaram-se aumentadas em ATR2000mD4 e D5 (figura 16B). O número de células zimogênicas apresentou aumento apenas em ATR2000mD5 (figura 16C). Houve também diminuição da espessura média da submucosa somente em ATR2000mD4 (figura 16D) e atrofia da camada muscular em ATR2000mD4 e ATR2000mD5 (figura 16E). A soma destes dados, não resultou em anormalidades da espessura média da parede do corpo do estômago em resposta à administração de atrazina (figura 16F).

Foram observadas alterações histológicas significativas no fígado de ratos com administração de atrazina 2.000 mg/kg de peso corpóreo (figura 17). Houve aumento do diâmetro médio da veia centrolobular no grupo ATR2000mD2 e ATR2000mD5 (figura 17A) e nenhuma diferença estatística no diâmetro médio da veia porta hepática (figura 17B). O número médio de hepatócitos ativos próximos à veia centrolobular foi menor nos grupos ATR2000mD1, D3, D4 e D5 comparados ao grupo controle (figura 17C). Na região da veia

porta houve diminuição no número médio de hepatócitos ativos apenas em ATR2000mD3 e D5 (figura 17D).

Na figura 18 encontram-se os dados da análise histológica do tecido renal. A administração de atrazina causou alterações na maioria das características histológicas analisadas nos rins dos ratos. Os grupos ATR2000mD1, D2, D4 e D5 apresentaram diminuição do espaço de Bowman (figura 18A), nos diâmetros médios dos glomérulos (figura 18B) e nos corpúsculos renais (figura 18C). Não houve alterações nos túbulos contorcidos proximais e distais (figura 18D e 18E).

## 4.2. ESTUDO EM RATOS FÊMEAS

Efeitos da administração de herbicidas e goethitas sobre o peso corpóreo, ingestão alimentar, alguns parâmetros metabólicos e histológicos.

Os valores médios diários do ganho de peso corpóreo (g), a porcentagem de mortalidade (%) e a quantidade de alimento ingerido diário (g/100 g de peso corpóreo) de fêmeas que receberam herbicidas podem ser encontrados na tabela 4 e 5, respectivamente (Anexo 1).

As três goethitas administradas isoladamente não alteraram a ingestão alimentar e o ganho de peso corpóreo comparados com o grupo Cf.

Os grupos R1000f e R2000f apresentaram diferenças estatísticas no ganho de peso corpóreo a partir do 4º e 1º dias de administração, respectivamente, em relação ao controle (Cf). Na associação das goethitas com R1000f, a porcentagem de perda de peso dos animais foi semelhante (R1000f: 12,7%; Go+R1000f: 14,2%; Gom+R1000f: 10,9%), com a exceção de Goq+R1000f que apresentou uma porcentagem menor de perda de peso (6,4%).

Os grupos de ratos fêmeas que receberam as goethitas associadas ao herbicida Roundup® (Go+R2000f, Goq+R1000f, Goq+R2000f e Gom+R2000f) apresentaram índice de mortalidade idêntica aos grupos R1000m e R2000m; exceto os grupos (Go+R1000f e Gom+R1000f) apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de mortalidade em 60% e 40%, em comparação ao respectivo grupo (R1000f) (tabela 4). As nanopartículas Go e Gom diminuíram a mortalidade dos animais que receberam o herbicida Roundup® na concentração de 1.000 mg/kg de peso corpóreo.

Com relação à administração de atrazina, peso corpóreo foi significativamente menor para o grupo ATR1000f, comparado ao Cf em D4. No entanto, a associação das goethitas determinou significativa perda de peso, em relação à Cf, a partir de D1 para Go+ATR1000f e

Gom+ATR1000f, e para Goq+ATR1000f em D2. O grupo ATR2000f, não apresentou peso corpóreo diferente do grupo Cf no período estudado, porém as goethitas associadas determinaram perda de peso significativo em D2 (Goq+ATR2000f) e em D1 (Gom+ATR2000f), comparado com Cf.

A quantidade de alimento ingerido (tabela 5), em relação à Cf, foi significativamente menor a partir da primeira administração das duas doses dos herbicidas, sendo que a dose mais elevada de Roundup® promoveu mortalidade dos animais em D2. As goethitas não alteraram essa resposta diminuída de ingestão alimentar em todos os grupos experimentais.

Para os grupos que receberam as goethitas associadas ao herbicida atrazina (Go+ATR1000f, Go+ATR2000f, Goq+ATR1000f, Goq+ATR2000f, Gom+ATR1000f e Gom+ATR2000f), apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de mortalidade em 100%, 60%, 100%, 55%, 100% e 60%, em comparação aos respectivos grupos (ATR1000f e ATR2000f) (tabela 4). Pelos valores citados acima, verifica-se que as nanopartículas Go, Goq e Gom diminuíram a mortalidade nos animais que receberam o herbicida atrazina.

Os valores médios dos parâmetros plasmáticos avaliados nesses grupos de fêmeas podem ser observados na tabela 6.

A glicemia e a colesterolemia de todos os grupos experimentais não diferiram do controle Cf, exceto no grupo R1000f em D2 ( $p < 0,039$ ).

Aumento significativo na concentração plasmática das enzimas ALT e AST, comparado com o grupo Cf, foi observado para as doses 1.000 mg/kg e 2.000 mg/kg do herbicida Roundup® somente no 1º dia após a gavagem (D1;  $p < 0,001$ ), nos outros dias da administração das doses do herbicida, os valores dessas enzimas não diferiram estatisticamente do controle. Resposta oposta foi, entretanto, observado para o herbicida atrazina, pois aumento significativo, em relação ao grupo Cf, foi observado a partir do 2º dia para ATR2000f e 3º dia para ATR1000f, para ambas as enzimas.

Nenhuma das goethitas isoladas utilizadas promoveu qualquer alteração significativa nas concentrações plasmáticas das enzimas ALT e AST comparado com o grupo controle. As concentrações de ALT e AST nos grupos em associação das goethitas com o herbicida (R1000f) em D4, não diferiram significativamente de Cf. Ao contrário, com relação ao herbicida atrazina, as concentrações das enzimas ALT e AST apresentaram-se aumentadas em todos os grupos de associação do herbicida com goethita em D4.

Em relação à concentração da creatinina plasmática nos grupos de ratos fêmeas houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos grupos R1000fD2, D3 e D4, R2000fD1 e D2,

ATR1000fD2, D3 e D4, ATR2000fD1, D2, D3 e D4, comparados ao grupo Cf. As duas goethitas isoladas não alteraram a concentração da creatinina plasmática nos ratos fêmeas. Com a associação das goethitas, verificou-se que nos grupos Go+R1000f D4, Go+ATR1000f D4, Go+ATR2000f D4, Goq+R1000f D4, Goq+ATR1000f D4, Goq+ATR2000f D4, Gom+R1000f D4, Gom+ATR1000f D4 e Gom+ATR2000f D4 a concentração da creatinina plasmática apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) comparados ao grupo Cf.

Os resultados da análise histológica de estômago, fígado e rim dos grupos de ratos fêmeas tratadas com atrazina 1.000 e 2.000 mg/kg de peso corpóreo, goethitas isoladas ou associação de ambos encontram-se nas figuras 19 a 23 (Anexo 2).

Foram observadas alterações histológicas significativas no fígado de ratos com administração de atrazina 1.000 mg/kg de peso corpóreo (figura 19). Houve aumento do diâmetro médio da veia centrolobular e da veia porta nos grupos ATR1000fD1, D2 e D4 (figura 19A e 19B). O número médio de hepatócitos ativos próximos à veia centrolobular foi maior no grupo ATR1000fD1 e menor no grupo ATR1000fD4, comparados ao grupo controle (figura 19C). Na região da veia porta houve aumento no número médio de hepatócitos ativos nos grupos ATR1000fD1, D2 e D3 (figura 19D).

Na figura 20 encontram-se os dados da análise histológica do tecido renal. A administração de atrazina causou alterações na maioria das características histológicas analisadas nos rins dos ratos. Os grupos ATR1000fD1, D2, D3 e D4 apresentaram aumento do espaço de Bowman (figura 20A), nos diâmetros médios dos glomérulos não foi encontrado diferença estatística comparados ao controle (figura 20B). Em relação ao diâmetro dos corpúsculos renais, foi encontrado diferença estatística apenas no grupo ATR1000fD3 (figura 20C). Houve alteração nos túbulos contorcidos proximais no grupo ATR1000fD4 (figura 20D); enquanto, nos túbulos contorcidos distais os resultados foram semelhantes ao controle (figura 20E).

O fundo do estômago de ratos Wistar tratados com atrazina apresentou alterações na espessura de todas as camadas histológicas. Houve diminuição na camada de queratina nos grupos ATR2000fD1, D2, D3 e D4 (figura 21A), aumento da camada epitelial em ATR2000fD1, D2, D3 e D4 (figura 21B). A lâmina própria apresentou-se com diminuição significativa em todos os grupos experimentais (figura 21C). A soma destes dados resultou na diminuição da camada mucosa em resposta à administração de atrazina em todos os grupos (figura 21D). Na camada submucosa houve diminuição apenas em ATR2000fD4 (figura 21E). Foi observado aumento da camada muscular em todos os grupos tratados com atrazina (figura

21F). A técnica histológica empregada não permitiu evidenciar a camada serosa do fundo do estômago destes animais. Em decorrência das alterações citadas, houve diminuição na espessura total da parede do estômago em resposta à atrazina para todos os grupos experimentais (figura 21G).

Na parede do corpo do estômago de ratos com administração de atrazina 2.000 mg/kg de peso corpóreo (figura 22), foi observado aumento na espessura média da camada mucosa em ATR2000fD1, D2, D3 e D4 (figura 22A). Nas glândulas gástricas, foram observadas alterações no número de células oxínticas em ATR2000fD2, D3e D4 (figura 22B). O número de células zimogênicas apresentou diminuição em ATR2000fD2, D3e D4 (figura 22C). Houve também diminuição da espessura média da submucosa em todos os grupos experimentais (figura 22D) e atrofia da camada muscular apenas em ATR2000fD4 (figura 22E). A soma destes dados resultou na diminuição da espessura média da parede do corpo do estômago em resposta à administração de atrazina somente em ATR2000fD4 (figura 22F).

Para os resultados hepáticos dos grupos que receberam atrazina 2.000 mg/kg de peso corpóreo, houve aumento do diâmetro médio da veia centrolobular nos grupos ATR2000fD1, D2, D3 e D4 (figura 23A); na veia porta, os grupos ATR2000fD1, D3 e D4, apresentaram aumento significativo em relação ao Cf (figura 23B). O número médio de hepatócitos ativos próximos à veia centrolobular foi menor nos grupos ATR2000fD3 e D4, comparados ao grupo controle (figura 23C). Na região da veia porta houve diminuição no número médio de hepatócitos ativos apenas no grupo ATR2000fD3 (figura 23D).

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos do Roundup®, atrazina, goethitas isoladas e a associação de goethitas com ambos os herbicidas, por gavagem, em ratos machos e fêmeas, nas concentrações de 1.000 e 2.000 mg/kg de peso corpóreo, por 5 dias.

A toxicidade pode ser avaliada quando se observam alterações no ganho diário de peso corpóreo e na quantidade de alimento ingerido, além de outros aspectos clínicos como aumento de salivação, lacrimejamento, miose ou tremor (MOSER et al., 2006 *apud* ASTIZ et al., 2009). Sabe-se que a dose letal de glifosato é de 12.000 mg/kg e DL<sub>50</sub> de 5.000 mg/kg de peso corpóreo de acordo com Williams et al. (2000); para o herbicida atrazina a DL<sub>50</sub> é maior que 3.000 mg/kg de peso corpóreo (BRECKENRIDGE et al., 2010 *apud* SONG et al., 2015). As doses usadas no nosso trabalho, apesar de elevadas, são 6x menores que a dose letal de glifosato e 3x menores que a DL<sub>50</sub> de atrazina, no entanto, foram observados efeitos de toxicidade, desordens metabólicas e danos histológicos nos animais pelos dois herbicidas.

Os animais submetidos aos herbicidas isoladamente e sua associação às goethitas apresentaram, durante todo o período experimental, sinais de toxicidade e diminuição no ganho de peso corpóreo e ingestão alimentar comparado aos seus respectivos controles, na qual o índice de mortalidade para os ratos machos apresentou-se entre 40 e 100%, exceto para o grupo Gom+ATR1000m, onde não obteve mortalidade. Nos grupos de fêmeas, a mortalidade foi de 20 e 100% e apenas os grupos Go+ATR1000f, Goq+ATR1000f, Gom+ATR1000f não apresentaram mortalidade no período experimental, sendo semelhantes ao grupo Cf; isso demonstra a prevenção de mortalidade efetuada pelas goethitas utilizadas em alguns momentos do protocolo experimental. No entanto, as goethitas administradas isoladamente não promoveram sinais de toxicidade, perda de peso corpóreo e ingestão alimentar comparado aos controles (Cm e Cf). Para os animais que receberam as goethitas isoladas (Goq e Gom), esses dados corroboram estudos de outros autores que sugerem desenvolvimento normal dos animais, sem comprometimento do controle neural de ingestão alimentar, peso corpóreo, ausência de mortalidade, observações clínicas, parâmetros hematológicos e bioquímicos, e lesões histológicas de ratos machos e fêmeas após administração com goethitas, na concentração de 2.000 mg/kg de peso corpóreo por 14 dias, via gavagem (YUN et al., 2015).

Alguns trabalhos utilizando ratos com administração de Roundup®, mostraram menor ingestão acompanhada de perda de peso corpóreo atribuindo ao alto poder corrosivo e possibilidade de propiciar danos à mucosa oral (WILLIAMS et al., 2000), impedindo a

deglutição e consequente processo de digestão do alimento. Inclusive, alguns autores verificaram perda de peso e ingestão alimentar quando administrado, por gavagem, o herbicida atrazina 400 mg/kg de peso corpóreo em 14 dias (CAMPOS-PEREIRA et al., 2012) e, da mesma forma, em doses menores (ELDRIDGE et al., 1999; ENOCH et al., 2007; LAWS et al., 2003; STOKER et al., 2002; TRENTACOSTE et al., 2001), como por exemplo, dose de 300 mg/kg de peso corpóreo por 21 dias (COOPER et al., 2000), e 100 mg/kg de peso corpóreo no período gestacional (FRAITES et al., 2011). Por outro lado, outros autores observaram aumento do peso corpóreo (LIM et al., 2009) ou normalidade do peso corpóreo e ingestão alimentar quando atrazina foi administrada em baixas concentrações (10 a 200 mg/kg de peso corpóreo) (BARDULLAS et al., 2011; FRAITES et al., 2009; FRIEDMANN et al., 2002; JESTADI et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2005; UEDA et al., 2005).

No presente trabalho, a concentração utilizada foi próxima aos valores destacados como subletais e/ou irritativos do sistema digestório e corroboram protocolos de outros autores com Roundup® (WILLIAMS et al., 2000) ou atrazina (CAMPOS-PEREIRA et al., 2012), tanto em machos como em fêmeas. No entanto, são diferentes aos estudos onde após 1 ou 2 semanas (EL-SHENAWY, 2009) ou 5 e 13 semanas de administração (ÇAGLAR e KOLANKAYA, 2008), não observaram alterações significativas no ganho de peso corpóreo e quantidade de alimento ingerido. Em testes realizados no LaFiNeM (dados não mostrados), a administração do princípio ativo de Roundup®, o glifosato, por gavagem, na dose DL<sub>50</sub> para ratos machos (4.200 mg/kg de peso corpóreo) e fêmeas (6.000 mg/kg de peso corpóreo) promoveu intensa diarreia e utilizando dose de 12.000 mg/kg de peso corpóreo de glifosato, considerada letal pela World Health Organization (WHO, 1994), determinou morte dos animais em 5 dias, como resultado da intensa diarreia e perda de peso corpóreo com ausência de ingestão de alimentos. Resultados similares foram encontrados no grupo R2000m e R2000f, com dose 2 a 3 vezes menor que a DL<sub>50</sub> e com mortalidade após o 2º dia (D2) de administração em ratos machos e fêmeas.

Portanto, a administração da formulação Roundup® se mostrou mais tóxica que o princípio ativo glifosato, sugerindo que outros componentes da formulação sejam responsáveis por esses resultados. Alguns estudos, sugerem que seja o POEA, que é adicionado à formulação de Roundup® para aumentar a eficácia do herbicida (KNOCH e BUKOVAC, 1992), o responsável pelos efeitos tóxicos, sendo inclusive considerado até três vezes mais tóxico que o próprio glifosato (GIESY et al., 2000).

Os resultados da administração das nanopartículas de óxido ferro associadas aos herbicidas não evitaram a significativa perda de peso corpóreo e diminuição na ingestão

alimentar, não sendo, portanto, capaz de prevenir essas alterações. Verifica-se que goethitas têm alta afinidade tanto ao Roundup® quanto à atrazina, mas que uma série de fatores podem interferir nessa imobilização dos herbicidas pelas goethitas, como pH e força iônica (CARNEIRO et al., 2013). Assim, essa ausência de efeito protetor pode estar relacionado ao pH do estômago interferindo no efeito de adsorção entre a goethita e o herbicida.

Avaliação de parâmetros plasmáticos metabólicos ou hormonais é relevante para se avaliar os efeitos de toxicidade do Roundup®, atrazina e goethitas. Aumento de glicemia e AGL são sinais metabólicos de estresse (GUEZENNEC et al., 1988; OLLER do NASCIMENTO CURI et al., 1990; ZAIA et al., 1997). Vários são os trabalhos na literatura mostrando hiperglicemia em peixes devido à contaminação da água, tanto por glifosato quanto Roundup®, sendo este aumento relacionado ao período de exposição ou concentração do herbicida (GLUSCZAK et al., 2007; LANGIANO e MARTINEZ, 2008). Até onde sabemos, não existem trabalhos avaliando esses parâmetros em roedores com administração de herbicidas.

Os resultados aqui apresentados demonstram que as concentrações plasmáticas de glicose de todos os ratos machos e fêmeas, com a exceção do grupo R1000fD2, apresentaram normoglicemia semelhante aos seus respectivos grupos controles. São vastos os dados na literatura sobre toxicidade do glifosato e Roundup® em invertebrados e vertebrados (WILLIAMS et al. 2000), porém em nenhum estudo foi mostrado efeito sobre o metabolismo de glicose, exceto hiperglicemia em peixes (GLUSCZAK et al., 2007; LANGIANO e MARTINEZ, 2008). Estudo com administração de atrazina também mostrou aumento da concentração de glicose e resistência à insulina (LIM et al., 2009). Assim, os resultados apresentados neste trabalho, vêm acrescentar informações desses herbicidas nesse parâmetro sinalizador de estresse.

O aumento de colesterol total é relatado após administração de glifosato por via intraperitoneal em ratos machos (EL-SHENAWY, 2009) e de Roundup® por gavagem (ÇAGLAR e KOLANKAYA, 2008), porém nenhuma alteração neste parâmetro foi observada nos ratos machos (tabela 3) e fêmeas (tabela 6) que receberam Roundup®, atrazina, goethitas isoladas e associação de goethitas aos herbicidas, corroborando outros resultados (VAINIO et al., 1983). Entretanto, os grupos ATR2000mD4, ATR2000mD5, Goq+ATR2000mD5 e Gom+ATR2000mD5, que receberam as maiores doses de atrazina, apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração de colesterol, comparado com os controles (Cm), corroborando resultados obtidos por Lim et al. (2009) que observaram tendência no aumento dos valores de colesterol e triglicerídeos nos animais tratados com dose de 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso

corpóreo de atrazina diluída em água, durante 5 meses. Resultados semelhantes são relatados por outros autores que observaram alterações séricas de colesterol total, lipoproteínas e enzimas hepáticas, sugerindo hepatotoxicidade do Roundup® (ÇAGLAR e KOLANKAYA, 2008; EL-SHENAWY, 2009) e da atrazina (JESTADI et al., 2014), com a diminuição da atividade da proteína reguladora aguda da esteroidogênese - a StAR (ROMANO et al., 2010; WALSH et al., 2000) para Roundup® e atrazina (ABARIKWU et al., 2011), resultando em menor metabolismo de colesterol e seu consequente aumento sérico (NING et al., 2009). Assim, essa resposta de aumento de colesterol total nos animais que receberam por mais tempo a atrazina podem estar sinalizando alteração na via de metabolismo de esteroides.

As duas goethitas isoladas não alteraram a concentração plasmática das enzimas hepáticas ALT e AST nos grupos avaliados. Alteração significativa tanto de ALT quanto de AST, em ratos machos e fêmeas, foi verificada tanto para administração de Roundup® como atrazina. Porém, atrazina determinou alteração inversa ao Roundup®, isto é, a concentração das enzimas estava aumentada após a primeira administração de Roundup® retornando a valores semelhantes ao controle após a última administração (D5); ao contrário, nos grupos que receberam atrazina, a concentração das enzimas foi aumentando com o número de administrações. Respostas semelhantes foram verificadas também para os animais com a associação entre goethitas e herbicidas. Alguns autores também encontraram aumento da concentração dessas enzimas após administração de atrazina por 15 dias em ratos machos (JESTADI et al., 2014), porém outros autores não verificaram qualquer alteração após administração de glifosato (BENEDETTI et al., 2004; HEYDENS et al., 2008) ou atrazina (CAMPOS-PEREIRA et al., 2012). McMullin et al. (2007) sugerem que quanto maior a concentração de atrazina, inversamente será a capacidade de absorção de nutrientes pelo trato digestório. Assim, altas doses de atrazina, explicariam a alteração de ALT e AST apenas nos últimos dias do protocolo experimental.

Valores aumentados da creatinina plasmática é observado nos grupos que receberam Roundup® e atrazina, e associação das goethitas aos herbicidas, para ratos machos e fêmeas. Nossos resultados são discrepantes à outros autores (ÇAGLAR e KOLANKAYA, 2008), onde encontraram valores normais da creatinina plasmática nas concentrações de 56 e 560 mg/kg de peso corpóreo de Roundup® por 5 e 13 semanas, respectivamente; nossos resultados também diferem de El-Shenawy (2009), encontrando valores menores comparados aos controles em estudo com glifosato e Roundup®, nas concentrações de 134,95 e 269,9 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente. Na utilização de atrazina, nossos resultados corroboram outros autores (JESTADI et al., 2014), que utilizaram 300  $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$  de peso

corpóreo de atrazina, por período de 15 dias, culminando com aumento plasmático de creatinina e ureia. Da mesma maneira, Liu et al. (2014), encontrou valores aumentados da creatinina plasmática na concentração de 125 mg/kg de peso corpóreo de atrazina, por período de 28 dias. Assim, as goethitas não foram capazes de prevenir o aumento da creatinina plasmática em nossos estudos.

Doses de Roundup® consideradas letais promovem severa diarreia, logo no período inicial de administração, apresentando morte subsequente por desidratação (ÇAGLAR e KOLANKAYA, 2008), no entanto, alguns autores relataram baixa absorção de Roundup® pelo trato digestório (ANADÓN et al., 2009) e baixa toxicidade devida à excreção do mesmo nas fezes (WILLIAMS et al., 2000). Os resultados deste trabalho corroboram os vários efeitos tóxicos do Roundup® relatados na literatura e a baixa absorção poderia explicar as respostas das enzimas ALT e AST aumentadas apenas no início da administração do herbicida.

As alterações das enzimas hepáticas e de colesterol sugerem a existência de uma dose limiar para dar início aos vários efeitos hepáticos e plasmáticos como sugerem outros autores que também encontraram alterações, dose dependentes, das enzimas hepáticas e de colesterol após administração de Roundup® ou atrazina (ÇAGLAR e KOLANKAYA, 2008; EL-SHENAWY, 2009; ROMANO et al., 2010; WALSH et al., 2000). Deste modo, outros estudos se tornam relevantes para esclarecer os possíveis mecanismos para os efeitos tóxicos desses herbicidas sobre parâmetros plasmáticos.

Este trabalho é pioneiro em verificar as alterações histológicas em órgãos de ratos machos decorrentes da administração com 1.000 mg/kg de peso corpóreo de Roundup®, goethitas isoladas e associação de ambos. Em cada órgão estudado foram analisadas características histológicas distintas que permitiram a identificação de diversas alterações. Considerando as modificações na espessura média da mucosa gástrica, não foram encontrados trabalhos na literatura que relacionassem protocolos semelhantes com variações histológicas no estômago.

Como o tecido epitelial é um importante constituinte da mucosa do estômago (GEHIN et al., 2006), estudos com Roundup® em pele de ratos, demonstraram que o glifosato causa estresse oxidativo, levando a desordens estruturais, podendo culminar em morte dos queratinócitos. Williams et al. (2000) relataram que o glifosato pode levar à hiperplasia epitelial em bexiga de ratos. Apesar dos resultados histológicos evidenciados nos animais que receberam Roundup®, observou-se que, em alguns casos, quando a goethita era associada ao herbicida, o agrotóxico não causava alterações na mucosa tanto do fundo como do corpo do estômago. Cruz et al. (2007) mostraram que a capacidade de adsorção da goethita é

inversamente proporcional ao pH. Relacionando isto à produção de  $H^+$  pelo estômago, pode-se sugerir que o ambiente ácido aumente a adsorção do herbicida pela goethita. Assim, acredita-se que a associação de goethita ao Roundup® em meio ácido tenha evitado transformações histológicas severas na mucosa gástrica.

As modificações histológicas causadas pela administração do herbicida Roundup® e goethita, na camada submucosa do estômago dos ratos, são de grande importância do ponto de vista funcional. Sendo uma região constituída de tecido conjuntivo denso e com grande vascularização, com finalidade de nutrição tanto da camada mucosa quanto de parte da camada muscular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013), degradação na mesma podem levar a deficiências no funcionamento do órgão. Hong et al. (2014), demonstraram que ratos recebendo nanopartículas por via oral, desenvolveram edema na submucosa e inflamação no corpo do estômago. Julgando que as goethitas usadas no presente trabalho tinham dimensões nanométricas, pode ter ocorrido quadro inflamatório na submucosa dos animais tratados com goethita isolada.

Foram observadas também alterações histológicas na camada muscular dos segmentos do fundo e do corpo do estômago, sendo a região do fundo mais afetada por Roundup® e/ou goethita isolada. Como as camadas histológicas do fundo do estômago são mais delgadas, pode ter ocorrido difusão maior das soluções utilizadas, ocasionando alterações mais relevantes no fundo do que no corpo do estômago. No corpo do estômago as deformações no tecido muscular foram mais discretas, tanto nos animais com administração de Roundup® isolado quanto em associação com as goethitas. Como a camada muscular é responsável pelo peristaltismo (GENESER, 2003), alteração nessa camada sugere comprometimento da movimentação do bolo alimentar no estômago, durante a digestão. Além disso, considerando que a camada muscular representa aproximadamente 50% da parede do órgão, a diminuição da espessura dessa camada resultou na diminuição da espessura total da parede do estômago, observada em todos os grupos experimentais.

Contudo, as goethitas utilizadas não foram capazes de proteger as camadas estomacais na associação ao herbicida Roundup®; e até mesmo, sua administração isolada resultou em comprometimento de algumas camadas avaliadas deste órgão. Alguns parâmetros, onde observou-se resposta protetora das goethitas, pode ser devido à adsorção destas nanopartículas ao herbicida, pelo baixo pH encontrado no estômago, como citado anteriormente.

Em relação ao fígado, as principais alterações foram observadas nos diâmetros médios das veias centrolobulares e veias portas nos animais com administração de Roundup® e goethitas isoladas. Embora não tenham sido encontrados relatos na literatura sobre alterações

hepáticas causadas por administração de goethitas, Benedetti et al. (2004) verificaram que exposições de elevadas concentrações de Roundup® podem resultar em aumento na quantidade de células de Kupffer, deposição de fibras reticulares no fígado de ratos Wistar e aumento nos valores plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) nestes animais. Outros estudos também mostram alterações hepáticas quando administrado glifosato (ASTIZ et al., 2009; BEURET et al., 2005; DARUICH et al., 2001).

A administração de Roundup® 10 mg/kg de peso corpóreo na espécie de peixes *Prochilodus lineatus* promoveu alterações hepáticas (LANGIANO e MARTINEZ, 2008; MODESTO e MARTINEZ, 2010). Lueken et al. (2004), verificaram que fibroblastos *in vitro* tratados com glifosato, apresentaram aumento de proliferação. Danos na fosforilação oxidativa das mitocôndrias hepáticas de ratos (PEIXOTO, 2005) e células hepáticas de humanos (GASNIER et al., 2009) em estudos *in vitro*. Não foram encontrados trabalhos que relacionassem o Roundup® às alterações vasculares no fígado de mamíferos. No entanto, Albinati et al. (2009) descreveram que peixes expostos ao Roundup® apresentaram alterações hepáticas, com focos de necrose e respostas vasculares como congestão venosa no fígado de piaçu (*Leporinus macrocephalus*).

Em relação às alterações no número de hepatócitos ativos, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram este parâmetro em resposta a administração de herbicidas ou goethitas. Como a atividade dos hepatócitos está diretamente relacionada ao funcionamento normal do fígado, a diminuição na atividade dos mesmos pode ser indicativa de lesões hepáticas. Roman et al. (2009) demonstraram que ratos tratados com glifosato apresentaram hipercromatismo no núcleo de hepatócitos. Benedetti et al. (2004) relataram que ratos tratados com glifosato apresentaram alterações irreversíveis em hepatócitos. Similarmente como visualizado no estômago, em alguns parâmetros avaliados no tecido hepático, as nanopartículas resultaram em aumentos significativos no diâmetro da veia porta, no entanto, na veia centrolobular mostrou-se eficaz em relação aos danos proporcionados pelo herbicida Roundup® isolado.

Nas análises dos componentes renais dos animais que receberam o herbicida Roundup®, foi evidenciado alterações dos rins e que as goethitas podem impedir este quadro. Heydens et al. (2008) evidenciaram variações renais apenas em ratos tratados por injeção intraperitoneal de glifosato e afirmaram que por via oral, a administração não produz toxicidade. El-Shenawy (2009) descreveu que ratos tratados com glifosato e Roundup® por 2 semanas, apresentaram baixos teores de creatinina e altos de ureia e ácido úrico no sangue,

sugerindo a ocorrência de danos renais. No entanto, Dalton (2011), relatou que a creatinina não é um bom parâmetro de avaliação de lesão renal. Também foi observado aumento da catalase renal na espécie de peixes *Carassius auratus* na concentração de Roundup® 2,5 e 20 mg/L por 96 horas de exposição (LUSHCHAK et al., 2009).

Portanto, é possível confrontar os resultados metabólicos aos parâmetros histológicos analisados. Os valores aumentados das enzimas hepáticas ALT e AST em ambos os sexos e herbicidas utilizados neste protocolo experimental, denota as alterações histológicas no fígado pela possível hepatotoxicidade. Da mesma forma, os resultados encontrados para a creatinina plasmática em nosso trabalho, complementa as modificações histológicas ocorridas nos rins. Porém, outros estudos são necessários a fim de complementar os nossos resultados, promovendo uma melhor compreensão destes herbicidas em relação à saúde humana.

Para os animais que receberam atrazina, foram observadas também alterações histológicas quando administrado o herbicida, no fundo e corpo do estômago, nas doses de 1.000 e 2.000 mg/kg de peso corpóreo em ratos machos e fêmeas. No corpo do estômago as deformações no tecido muscular foram relevantes, obtendo da mesma forma que para os animais tratados com Roundup®, comprometimento da movimentação do bolo alimentar no estômago, durante a digestão; e diminuição da espessura total da parede do estômago, observada nos grupos experimentais. Apesar da ampla literatura da ação da atrazina em diversos parâmetros avaliados, não foi encontrado estudos da ação deste herbicida sobre os parâmetros histológicos no estômago.

Já nos dados histológicos do fígado, as principais alterações foram observadas nos diâmetros médios das veias centrolobulares e veias portas nos animais com administração de atrazina. Valores elevados de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) no fígado foram observados por outros autores (JESTADI et al., 2014) e alterações nas enzimas antioxidantes de hepatócitos (CAMPOS-PEREIRA et al., 2012), corroborando nossos estudos.

Nossos resultados da histologia renal dos animais que receberam o herbicida atrazina, foi evidenciado diversas alterações, e são de acordo aos autores que encontraram aumento da creatinina e ureia (JESTADI et al., 2014) e estresse oxidativo no tecido renal (LIU et al., 2014) de ratos; da mesma maneira, alterações em peixes (*Cyprinus carpio* L.) (XING et al., 2012). Esses resultados histológicos encontrados denotam que a atrazina, rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, por via oral (CAMPOS-PEREIRA et al., 2012), tornando-se bioacumuláveis (ROSS et al., 2009), promovem danos irreversíveis nos órgãos estudados.

## 6. CONCLUSÃO

As goethitas administradas isoladamente não desencadearam alterações no ganho de peso corpóreo, ingestão de alimentos ou em parâmetros metabólicos avaliados; e em alguns grupos de ratos fêmeas, sua associação ao herbicida atrazina, mostrou-se eficaz e diminuiu o índice de mortalidade, quando comparado ao herbicida isolado.

Administração de Roundup® e atrazina alterou o peso corpóreo e a ingestão alimentar, indicando comprometimento no desenvolvimento de ratos machos e fêmeas durante o período experimental.

As concentrações plasmáticas normais de glicose para ambos os herbicidas, indicam que a glicemia não é um sinalizador adequado para avaliar toxicidade desses herbicidas.

O herbicida Roundup® não promoveu alteração na concentração de colesterol em ambos os sexos. Atrazina levou a um aumento significativo na concentração de colesterol total em alguns grupos de machos, mas não nas fêmeas.

Os valores de ALT e AST apresentaram-se elevados para Roundup® e atrazina, em ratos machos e fêmeas.

A creatinina plasmática mostrou-se aumentada em alguns grupos de ratos machos e fêmeas.

As goethitas isoladas não desencadearam alterações plasmáticas em relação a nenhum parâmetro metabólico avaliado; e a associação com os herbicidas não promoveu alteração dessas respostas em ambos os animais. Estes resultados sugerem hepatotoxicidade para ambos os herbicidas e para melhor compreender este fato, estudos adicionais devem ser realizados para determinar os mecanismos do metabolismo hepático.

A análise das características histológicas do estômago, do fígado e dos rins, permitiu inferir que o Roundup® quando administrado por via oral causou modificações histológicas importantes nestes órgãos. Também foram observados danos histológicas nos órgãos estudados em resposta a administração de goethita isolada. No entanto, quando associada ao Roundup®, a goethita mostrou-se eficaz em adsorver o herbicida e manter dentro da normalidade alguns dos parâmetros histológicos analisados.

Conclui-se que a administração de goethita foi parcialmente eficaz na proteção de tecidos animais contra os efeitos do Roundup® e atrazina.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABARIKWU, S. O.; FAROMBI, E. O.; KASHYAP, M. P.; PANT, A. B. Atrazine induces transcriptional changes in marker genes associated with steroidogenesis in primary cultures of rat Leydig cells. Toxicology in Vitro, v. 25, p. 1588-1595, 2011.
- ACQUAVELLA, J. F.; ALEXANDER, B. H.; MANDEL, J. S.; GUSTIN, C.; BAKER, B.; CHAPMAN, P.; BLEEKE, M. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the farm family exposure study. Environmental Health Perspectives, v. 112, n. 3, p. 321-326, 2004.
- ALBINATI, A. C. L.; MOREIRA, E. L. T.; ALBINATI, R. C. B.; CARVALHO, J. V.; DE LIRA, A. D.; SANTOS, G. B.; VIDAL, L. V. O. Biomarcadores histológicos-toxicidade crônica pelo Roundup® em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, n. 3, p. 621-627, 2009.
- ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clinical Chemistry, v. 20, n. 4, p. 470-475, 1974.
- ALMEIDA, A. Glifosato. Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal, 2007. Disponível em: <<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0607/glifosato/frame2.html>>. Acesso em: 02 nov. 2016.
- ALVARIM, L. T.; NUCCI, L. P.; MAMANI, J. B.; MARTI, L. C.; AGUIAR, M. F.; SILVA, H. R.; SILVA, G. S.; NUCCI DA SILVA, M. P.; DELBEL, E. A.; GAMARRA, L. F. Therapeutics with SPION-labeled stem cells for the main diseases related to brain aging: a systematic review. International Journal of Nanomedicine, v. 9, p. 3749-3770, 2014.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. de; SANTOS, T. C. R. dos.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. Química Nova, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A.; CASTELLANO, V. J.; MARTÍNEZ, M.; MARTIN, M. T.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. Toxicology Letters, v. 190, p. 91-95, 2009.
- ANDEF. Boas práticas agrícolas no campo. Associação Nacional de Defesa Vegetal, 2010. Disponível em: <[http://www.andef.com.br/manuais/arquivos/Manual\\_de\\_seguranca.pdf](http://www.andef.com.br/manuais/arquivos/Manual_de_seguranca.pdf)>. Acesso em: 10 jul. 2016.
- ASTIZ, M.; ALANIZ, M. J. T.; MARRA, C. A. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 72, p. 2025-2032, 2009.
- BARATLI, Y.; CHARLES, ANNE-LAURE; WOLFF, V.; TAHAR, L. B.; SMIRI, L.; BOUITBIR, J.; ZOLL, J.; SAKLY, M.; AUGER, C.; VOGEL, T.; ABDELMELEK, H.; TEBOURBI, O.; GENY, B. Age modulates Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles liver toxicity: dose-

dependent decrease in mitochondrial respiratory chain complexes activities and coupling in middle-aged as compared to young rats. Biomed Research International, p. 1-10, 2014.

BARDULLAS, U.; GIORDANO, M.; RODRÍGUEZ, V. M. Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. Neurotoxicology and Teratology, v. 33, p. 263-272, 2011.

BARGHEER, D.; GIEMSA, A.; FREUND, B.; HEINE, M.; WAURISCH, C.; STACHOWSKI, G. M.; HICKEY, S. G.; EYCHMÜLLER, A.; HEEREN, J.; NIELSEN, P. The distribution and degradation of radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles and quantum dots in mice. Beilstein Journal of Nanotechnology, v. 6, p. 111-123, 2015.

BARR, D. B.; PANUWET, P.; NGUYEN, J. V.; UDUNKA, S.; NEEDHAM, L. L. Assessing exposure to atrazine and its metabolites using biomonitoring. Environmental Health Perspectives, v. 115, n. 10, p. 1474-1478, 2007.

BENACHOUR, N.; SIPAHUTAR, H.; MOSLEMI, S.; GASNIER, C.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, G. E. Time and dose-dependent effects of Roundup on human embryonic and placental cells. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 53, p. 126-133, 2007.

BENEDETTI, A. L.; VITURI, C. D.; TRENTIN, A. G.; DOMINGUES, M. A. C.; ALVAREZ-SILVA, M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. Toxicology Letters, v. 153, n. 2, p. 227-232, 2004.

BENETOLI, L. O. de B.; SANTANA, H. de.; CARNEIRO, C. E. A.; ZAIA, D. A. M.; FERREIRA, A. S.; PAESANO JUNIOR, A.; ZAIA, C. T. B. V. Adsorption of glyphosate in a forest soil: a study using Mössbauer and FT-IR spectroscopy. Química Nova, v. 33, n. 4, p. 855-859, 2010.

BEURET, C. J.; ZIRULNIK, F.; GIMÉNEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. Reproductive Toxicology, v. 19, n. 4, p. 501-504, 2005.

BORGGGAARD, O. K.; GIMSING, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. Pest Management Science, v. 64, p. 441-456, 2008.

BREWSTER, D. W.; WARREN, J.; HOPKINS, W. E. Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification and quantification of glyphosate derived materials following a single oral dose. Fundamental and Applied Toxicology, v. 17, n. 1, p. 43-51, 1991.

BRZEZICKI, J. M.; ANDERSEN, M. E.; CRANMER, B. K.; TESSARI, J. D. Quantitative identification of atrazine and its chlorinated metabolites in plasma. Journal of Analytical Toxicology, v. 27, p. 569-573, 2003.

ÇAGLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 25, p. 57-62, 2008.

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.

CARNEIRO, C. E. A.; IVASHITA, F. F.; SOUZA JUNIOR, I. G.; SOUZA, C. M. D.; PAESANO JUNIOR, A.; COSTA, A. C.; DI MAURO, E.; SANTANA, H. de; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Synthesis of goethite in solutions of artificial seawater and amino acids: a prebiotic chemistry study. International Journal of Astrobiology, v. 12, n. 2, p. 149-160, 2013.

CHANG, CHIRN-BIN; CHANG, CHIA-CHU. Refractory cardiopulmonary failure after glyphosate surfactant intoxication: a case report. Journal of Occupational Medicine and Toxicology, v. 4, n. 2, p. 1-4, 2009.

COOPER, R. L.; STOKER, T. E.; TYREY, L.; GOLDMAN, J. M.; MCELROY, W. K. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. Toxicological Sciences, v. 53, p. 297-307, 2000.

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.

CRUZ, L. H.; SANTANA, H. de; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Adsorption of glyphosate on clays and soils from Paraná State: effect of pH and competitive adsorption of phosphate. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 50, n. 3, p. 385-394, 2007.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats. Toxicology Letters, v. 142, p. 45-52, 2003.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; OLIVEIRA, R. T.; ANDRADE, A. J. M.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. Pre and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. Archives of Toxicology, v. 81, p. 665-673, 2007.

DALTON, R. N. Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular: percepção e realidade. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 47, n. 1, p. 8-11, 2011.

DARUICH, J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats on their fetuses. Environmental Research Section, v. 85, p. 226-231, 2001.

De SANTANA, H.; TONI, L. R. M.; BENETOLI, L. O. de B.; ZAIA, C. T. B. V.; ROSA JUNIOR, M.; ZAIA, D. A. M. Effect in glyphosate adsorption on clays and soils heated and characterization by FT-IR spectroscopy. Geoderma, v. 136, p. 738-750, 2006.

DEGHANI, M.; NASSERI, S.; HASHEMI, H. Study of the bioremediation of atrazine under variable carbon and nitrogen sources by mixed bacterial consortium isolated from corn field soil in fars province of Iran. Journal of Environmental and Public Health, p. 1-7, 2013.

DOOLEY, G. P.; PRENNI, J. E.; PRENTISS, P. L.; CRANMER, B. K.; ANDERSEN, M. E.; TESSARI, J. D. Identification of a novel hemoglobin adduct in Sprague Dawley rats exposed to atrazine. Chemical Research in Toxicology, v. 19, p. 692-700, 2006.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science, v. 64, p. 319-325, 2008.

ELDRIDGE, J. C.; TENNANT, M. K.; WETZEL, L. T.; BRECKENRIDGE, C. B.; STEVENS, J. T. Factors affecting mammary tumor incidence in chlorotriazine-treated female rats: hormonal properties, dosage, and animal strain. Environmental Health Perspectives, v. 102, p. 29-36, 1994.

ELDRIDGE, J. C.; WETZEL, L. T.; TYREY, L. Estrous cycle patterns of Sprague-Dawley rats during acute and chronic atrazine administration. Reproductive Toxicology, v. 13, p. 491-499, 1999.

EL-SHENAWY, N. S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 28, p. 379-385, 2009.

ENOCH, R. R.; STANKO, J. P.; GREINER, S. N.; YOUNGBLOOD, G. L.; RAYNER, J. L.; FENTON, S. E. Mammary gland development as a sensitive end point after acute prenatal exposure to an atrazine metabolite mixture in female Long-Evans rats. Environmental Health Perspectives, v. 115, n. 4, p. 541-547, 2007.

FERON, V. J.; CASSEE, F. R.; GROTEN, J. P.; VAN VLIET, P. W.; VAN ZORGE, J. A. International issues on human health effects of exposure to chemical mixtures. Environmental Health Perspectives, v. 110, n. 6, p. 893-899, 2002.

FORADORI, C. D.; CODER, P. S.; TISDEL, M.; YI, K. D.; SIMPKINS, J. W.; HANDA, R. J.; BRECKENRIDGE, C. B. The effect of atrazine administered by gavage or in diet on the LH Surge and reproductive performance in intact female Sprague-Dawley and Long Evans rats. Birth Defects Research (Part B), v. 101, p. 262-275, 2014.

FORADORI, C. D.; HINDS, L. R.; HANNEMAN, W. H.; HANDA, R. J. Effects of atrazine and its withdrawal on gonadotropin-releasing hormone neuroendocrine function in the adult female Wistar rat. Biology of Reproduction, v. 81, p. 1099-1105, 2009.

FORADORI, C. D.; HINDS, L. R.; HANNEMAN, W. H.; LEGARE, M. E.; CLAY, C. M.; HANDA, R. J. Atrazine inhibits pulsatile luteinizing hormone release without altering pituitary sensitivity to a GnRH receptor agonist in female Wistar Rats. Biology of Reproduction, v. 81, p. 40-45, 2009.

FORADORI, C. D.; HINDS, L. R.; QUIHUIS, A. M.; LACAGNINA, A. F.; BRECKENRIDGE, C. B.; HANDA, R. J. The differential effect of atrazine on luteinizing hormone release in adrenalectomized adult female Wistar rats. Biology of Reproduction, v. 85, p. 684-689, 2011.

FRAITES, M. J. P.; NAROTSKY, M. G.; BEST, D. S.; STOKER, T. E.; DAVIS, L. K.; GOLDMAN, J. M.; HOTCHKISS, M. G.; KLINEFELTER, G. R.; KAMEL, A.; QIAN, Y.; PODHORNIAK, L.; COOPER, R. L. Gestational atrazine exposure: effects on male

reproductive development and metabolite distribution in the dam, fetus, and neonate. Reproductive Toxicology, v. 32, p. 52-63, 2011.

FRAITES, M. J.; COOPER, R. L.; BUCKALEW, A.; JAYARAMAN, S.; MILLS, L.; LAWS, S. C. Characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to atrazine and metabolites in the female rat. Toxicological Sciences, v. 112, p. 88-99, 2009.

FRIEDMANN, A. S. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. Reproductive Toxicology, v. 16, p. 275-279, 2002.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNONB, M. C.; SÉRALINI, G. E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. Toxicology, v. 262, p. 184-191, 2009.

GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of vitamins C and E. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 22, n. 1, p. 27-34, 2006.

GENESER, F. Histologia, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GHO. Overweight and obesity. Global Health Observatory. World Health Organization, 2011. Disponível em: <[http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/)>. Acesso em: 11 nov. 2016.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, v. 167, p. 35-120, 2000.

GLASS, R. L. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 35, p. 497-500, 1987.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. dos S.; MORAES, B. S.; SIMÕES, R. R.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comparative Biochemistry and Physiology, part C, v. 146, p. 519-524, 2007.

GOLDMAN, J. M.; DAVIS, L. K.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. Atrazine-induced elevation or attenuation of the LH surge in the ovariectomized, estrogen-primed female rat: role of adrenal progesterone. Reproduction, v. 146, p. 305-314, 2013.

GUEZENNEC, C. Y.; NONGLATON, J.; SERRURIER, B.; MERINO, D.; DEFER, G. Hormonal and metabolic response to physical exercise, fasting and cold exposure in the rat. Effects on ketogenesis in isolated hepatocytes. European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology, v. 57, n. 1, p. 114-119, 1988.

HAEFS, R.; SCHMITZ-EIBERGER, M.; MAINX, H. G.; MITTELSTAEDT, W.; NOGA, G. Studies on a new group of biodegradable surfactants for glyphosate. Pest Management Science, v. 58, p. 825-833, 2002.

HEYDENS, W. F.; HEALY, C. E.; HOTZ, K. J.; KIER, L. D.; MARTENS, M. A.; WILSON, A. G. E.; FARMER, D. R. Genotoxic potential of glyphosate formulations: mode-of-action investigations. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 1517-1523, 2008.

HONG, JEONG-SUP; PARK, MYEONG-KYU; KIM, MIN-SEOK; LIM, JEONG-HYEON; PARK, GIL-JONG; MAENG, EUN-HO; SHIN, JAE-HO; KIM, MEYOUNG-KON; JEONG, J.; PARK, JIN-A; KIM, JONG-CHOON; SHIN, HO-CHUL. Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats. International Journal of Nanomedicine, v. 9, p. 159-171, 2014.

HORI, Y.; FUJISAWA, M.; SHIMADA, K.; HIROSE, Y. Determination of the herbicide glyphosate and its metabolite in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry: a case of poisoning by Roundup® herbicide. Journal of Analytical Toxicology, v. 27, p. 162-166, 2003.

HSIAO, CHENG-TING; LIN, LENG-JYE; HSIAO, KUANG-YU; CHOU, MENG-HUA. Acute pancreatitis caused by severe glyphosate-surfactant oral intoxication. American Journal of Emergency Medicine, v. 26, p. 384.e3-384.e5, 2008.

IBAMA. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009: uma abordagem ambiental. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2010. Disponível em:

<[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade\\_Ambiental/produtos\\_agrotoxicos\\_comercializados\\_brasil\\_2009.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf)>. Acesso em: 11 nov. 2016.

IBGE. Índice de homens com sobrepeso quase triplica em 35 anos. 27 de agosto de 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011. Disponível em <<http://noticias.terra.com.br/brasil/noticias/0,,OI4644910-EI306,00IBGE+indice+de+homens+com+sobrepeso+quase+triplica+em+anos.html>>. Acesso em: 11 nov. 2016.

JESTADI, D. B.; PHANIENDRA, A.; BABJI, U.; SRINU, T.; SHANMUGANATHAN, B.; PERIYASAMY, L. Effects of short term exposure of atrazine on the liver and kidney of normal and diabetic rats. Journal of Toxicology, p. 1-7, 2014.

JONGE, de H.; JONGE, de L. W. Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. Chemosphere, v. 39, n. 5, p. 753-763, 1999.

JU-NAM, Y.; LEAD, J. R. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. Science of the Total Environment, v. 400, p. 396-414, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica: texto e atlas. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

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, n. 56, p. 280-287, 2015.

KNOCHE, M.; BUKOVAC, M. J. Surfactants influence foliar absorption of gibberellic acid by sour cherry leaves. Journal of the American Society for Horticultural Science, v. 117, n. 1, p. 80-84, 1992.

LANGIANO, V. do C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comparative Biochemistry and Physiology, part C 147, p. 222-231, 2008.

LAWS, S. C.; FERRELL, J. M.; STOKER, T. E.; COOPER, R. L. Pubertal development in female Wistar rats following exposure to propazine and atrazine biotransformation by-products, diamino-S-chlorotriazine and hydroxyatrazine. Toxicological Sciences, v. 76, p. 190-200, 2003.

LAWS, S. C.; HOTCHKISS, M.; FERRELL, J.; JAYARAMAN, S.; MILLS, L.; MODIC, W.; TINFO, N.; FRAITES, M.; STOKER, T.; COOPER, R. Chlorotriazine herbicides and metabolites activate an ACTH-dependent release of corticosterone in male Wistar rats. Toxicological Sciences, v. 112, n. 1, p. 78-87, 2009.

LIM, S.; AHN, S. Y.; SONG, I. C.; CHUNG, M. H.; JANG, H. C.; PARK, K. S.; LEE, KI-UP.; PAK, Y. K.; LEE, H. K. Chronic exposure to the herbicide, atrazine, causes mitochondrial dysfunction and insulin resistance. PLoS ONE, v. 4, n. 4, e5186, p. 1-11, 2009.

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 Wistar rats. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, v. 7, n. 10, p. 3235-3243, 2014.

LIU, Z. Effects of surfactants on foliar uptake of herbicides – a complex scenario. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 35, p. 149-153, 2004.

LUEKEN, A.; JUHL-STRAUSS, U.; KRIEGER, G.; WITTE, I. Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. Toxicology Letters, v. 147, n. 1, p. 35-43, 2004.

LUSHCHAK, O. V.; KUBRAK, O. I.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. Chemosphere, v. 76, p. 932-937, 2009.

MALHOTRA, R. C.; GHIA, D. K.; CORDATO, D. J.; BERAN, R. G. Glyphosate-surfactant herbicide-induced reversible encephalopathy. Journal of Clinical Neuroscience, v. 17, p. 1472-1473, 2010.

McCONNEL, J. S.; HOSSNER, L. R. pH-dependent adsorption isotherms of glyphosate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 33, p. 1075-1078, 1985.

McMULLIN, T. S.; HANNEMAN, W. H.; CRANMER, B. K.; TESSARI, J. D.; ANDERSEN, M. E. Oral absorption and oxidative metabolism of atrazine in rats evaluated by physiological modeling approaches. Toxicology, v. 240, p. 1-14, 2007.

MESENTIER-LOURO, L. A.; ZAVERUCHA DO VALLE, C.; SILVA-JUNIOR, A. J. da; NASCIMENTO DOS SANTOS, G.; GUBERT, F.; FIGUEIRÊDO, A. B. P. de; TORRES, A.

L.; PAREDES, B. D.; TEIXEIRA, C.; TOVAR-MOLL, F.; MENDEZ- OTERO, R.; SANTIAGO, M. F. Distribution of mesenchymal stem cells and effects on neuronal survival and axon regeneration after optic nerve crush and cell therapy. PLoS ONE, v. 9, n. 10, p. 1-16, 2014.

MICHALANY, J. Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. São Paulo: E.P.U., 1980.

MILES, C. J.; MOYE, H. A. Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 36, p. 488-491, 1988.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Perfil nacional da gestão de substâncias químicas. Brasília, 2003. Disponível em <[http://www.mma.gov.br/estruturas/smcq\\_seguranca/publicacao/143\\_publicacao30092009113153.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/smcq_seguranca/publicacao/143_publicacao30092009113153.pdf)>. Acesso em: 11 nov 2016.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere, v. 81, p. 781-787, 2010a.

MORILLO, E.; UNDABEYTIA, T.; MAQUEDA, C.; RAMOS, A. Glyphosate adsorption on soils of different characteristics: Influence of copper addition. Chemosphere, v. 40, p. 103-107, 2000.

NDONG, C.; TATE, J. A.; KETT, W. C.; BATRA, J.; DEMIDENKO, E.; LEWIS, L. D.; HOOPES, P. J.; GERNGROSS, T. U.; GRISWOLD, K. E. Tumor cell targeting by iron oxide nanoparticles is dominated by different factors *in vitro* versus *in vivo*. PLoS ONE, v. 10, n. 2, p. 1-18, 2015.

NING, Y.; XU, L.; REN, S.; PANDAK, W. M.; CHEN, S.; YIN, L. StAR overexpression decreases serum and tissue lipids in apolipoprotein E-deficient mice. Lipids, v. 44, n. 6, p. 511-519, 2009.

OECD. OCDE-423-Guideline for testing of chemicals Acute Oral Toxicity: acute Toxic Class Method. The Organization for Economic Co-operation and Development, 2001. Disponível em <[https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd\\_gl423.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf)>. Acesso em: 02 nov. 2016.

OLLER do NASCIMENTO CURI, C. M.; RIBEIRO, E. B.; ZAIA, C. T. B. V.; DOLNIKOFF, M. S. Glycemic response to stress stimulation by ether exposure in adrenalectomized rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 37, p. 399-403, 1990.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 20, p. 112-117, 2005.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. Chemosphere, v. 61, p. 1115-1122, 2005.

PFISTER, K.; RADOSEVICH, S. R.; ARNTZEN, C. J. Modification of herbicide binding to photosystem II in two biotypes of *Senecio vulgaris* L. Plant Physiology, v. 64, p. 995-999, 1979.

PICCOLO, A.; CELANO, G.; CONTE, P. Adsorption of glyphosate by humic substances. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 44, p. 2442-2446, 1996.

POGRMIC-MAJKIC, K.; KAISAREVIC, S.; FA, S.; DAKIC, V.; GLISIC, B.; HRUBIK, J.; KOVACEVIC, R. Atrazine effects on antioxidant status and xenobiotic metabolizing enzymes after oral administration in peripubertal male rat. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 34, p. 495-501, 2012.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; VEREECKEN, H.; TORNISIELO, V. L.; PELISSARI, A. Glyphosate behavior in a rhodic oxisol under no-till and conventional agricultural systems. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 29, p. 61-69, 2005.

RAJKOVIC, V.; DJOLAI, M.; MATAVULJ, M. Alterations in jejunal morphology and serotonin-containing enteroendocrine cells in peripubertal male rats associated with subchronic atrazine exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 74, p. 2304-2309, 2011.

REDDY, K. N. Glyphosate-resistant soybean as a weed management tool: opportunities and challenges. Weed Biology and Management, v. 1, p. 193-202, 2001.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. American Journal of Clinical Pathology, v. 28, p. 56-63, 1957.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. Environmental Health Perspectives, v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.

RODRIGUEZ, V. M.; THIRUCHELVAM, M.; CORY-SLECHTA, D. A. Sustained exposure to the widely used herbicide atrazine: altered function and loss of neurons in brain monoamine systems. Environmental Health Perspectives, v. 113, n. 6, p. 708-715, 2005.

ROMAN, S. S.; SCOLARI, S.; BERGAMIN, A. N.; SACHETTI, G. C. Toxicidade renal e hepática em camundongos prenhes expostos à associação de ácido 2,4 diclorofenoxiacético e do glifosato. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 6, p. 152-171, 2009.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; FURTADO, P. V.; OLIVEIRA, C. A. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. Archives of Toxicology, v. 84, p. 309-317, 2010.

ROSS, M. K.; JONES, T. L.; FILIPOV, N. M. Disposition of the herbicide 2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine (atrazine) and its major metabolites in mice: a liquid chromatography/mass spectrometry analysis of urine, plasma, and tissue levels. Drug Metabolism and Disposition, v. 37, p. 776-786, 2009.

SHENHAR, R.; ROTELLO, V. M. Nanoparticles: scaffolds and building blocks. Accounts of Chemical Research, v. 36, n. 7, p. 549-561, 2003.

SONG, XIAO-YAO; LI, JIA-NAN; WU, YAN-PING; ZHANG, B.; LI, BAI-XIANG. Atrazine causes autophagy- and apoptosis-related neurodegenerative effects in dopaminergic neurons in the rat nigrostriatal dopaminergic system. International Journal of Molecular Sciences, v. 16, p. 13490-13506, 2015.

SONG, Y.; JIA, Z. C.; CHEN, J. Y.; HU, J. X.; ZHANG, L. S. Toxic effects of atrazine on reproductive system of male rats. Biomedical and Environmental Sciences, v. 27, n. 4, p. 281-288, 2014.

STOKER, T. E.; GUIDICI, D. L.; LAWS, S. C.; COOPER, R. L. The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. Toxicological Sciences, v. 67, p. 198-206, 2002.

TESKE, S. S.; DETWEILER, C. S. The biomechanisms of metal and metal-oxide nanoparticles' interactions with cells. International Journal Environmental Research and Public Health, v. 12, p. 1112-1134, 2015.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. Química Nova, v. 29, n. 4, p. 829-833, 2006.

TRENTACOSTE, S. V.; FRIEDMANN, A. S.; YOUKER, R. T.; BRECKENRIDGE, C. B.; ZIRKIN, B. R. Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. Journal of Andrology, v. 22, p. 142-148, 2001.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. Journal of Clinical Pathology, v. 22, n. 2, p. 158-161, 1969.

TSUI, M. T.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere, v. 52, p. 1189-1197, 2003.

UEDA, M.; IMAI, T.; TAKIZAWA, T.; ONODERA, H.; MITSUMORI, K.; MATSUI, T.; HIROSE, M. Possible enhancing effects of atrazine on growth of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in ovariectomized Sprague-Dawley rats. Cancer Science, v. 96, p. 19-25, 2005.

VAINIO, H.; LINNAINMAA, K.; KÄHÖNEN, M.; NICKELS, J.; HIETANEN, E.; MARNIEMI, J.; PELTONEN, P. Hypolipidemia and peroxisome proliferation induced by phenoxyacetic acid herbicides in rats. Biochemical Pharmacology, v. 32, n. 18, p. 2775-2779, 1983.

WACKER, M. G.; ALTINOK, M.; URFELS, S.; BAUER, J. Nanoencapsulation of ultra-small superparamagnetic particles of iron oxide into human serum albumin nanoparticles. Beilstein Journal of Nanotechnology, v. 5, p. 2259-2266, 2014.

WALSH, L. P.; McCORMICK, C.; MARTIN, C.; STOCCO, D. M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. Environmental Health Perspectives, v. 108, n. 8, p. 769-776, 2000.

WETZEL, L. T.; LUEMPFT, L. G. III.; BRECKENRIDGE, C. B.; TISDEL, M. O.; STEVENS, J. T.; THAKUR, A. K.; EXTROM, P. J.; ELDRIDGE, J. C. Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. Journal of Toxicology and Environmental Health, v. 43, p. 169-182, 1994.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WHO. Glyphosate: environmental health criteria 159. International Programme on Chemical Safety-IPCS - INCHEM. World Health Organization, 1994. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm#Part>>. Acesso em: 30 set. 2016.

XING, H.; LI, S.; WANG, Z.; GAO, X.; XU, S.; WANG, X. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. Chemosphere, v. 88, p. 377-383, 2012.

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, p. 1-8, 2015.

XU, JIA-KUN; ZHANG, FANG-FANG; SUN, JING-JING; SHENG, J.; WANG, F.; SUN, M. Bio and nanomaterials based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Molecules, v. 19, p. 21506-21528, 2014.

YUN, JUN-WON; KIM, SEUNG-HYUN; YOU, JI-RAN; KIM, W. H.; JANG, JA-JUNE; MIN, SEUNG-KEE; KIM, H. C.; CHUNG, D. H.; JEONG, J.; KANG, BYEONG-CHEOL; CHE, JEONG-HWAN. Comparative toxicity of silicon dioxide, silver and iron oxide nanoparticles after repeated oral administration to rats. Journal of Applied Toxicology, v. 35, p. 681-693, 2015.

ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M.; DELATTRE, E.; DOLNIKOFF, M. S.; TIMO-IARIA, C. Effect of chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamic nucleus on blood plasma glucose, triglycerides and free fatty acids in rats. Brain Research Bulletin, v. 42, p. 195-198, 1997.

ZHAO, F.; LI, K.; ZHAO, L.; LIU, J.; SUO, Q.; ZHAO, J.; WANG, H.; ZHAO, S. Effect of Nrf2 on rat ovarian tissues against atrazine-induced anti-oxidative response. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, v. 7, n. 6, p. 2780-2789, 2014.

**ANEXO 1 - TABELAS**

**(de 1 a 6)**

**Tabela 1.** Valores médios de peso corpóreo (em g) de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, por 5 dias, via gavagem, de herbicida, nanopartícula ou herbicida após 30 min da administração de nanopartícula, e eutanasiados no 1º, 2º, 3º, 4º ou 5º dia (D1, D2, D3, D4 e D5, respectivamente) após a gavagem. D0: 1º dia de gavagem. Herbicidas: Roundup® (R) e atrazina (ATR), nas doses de 1.000 ou 2.000 mg/kg de peso corpóreo. Nanopartículas: goethita em água Milli-Q (Goq) e goethita em água do mar (Gom), nas doses correspondentes a dos grupos com herbicidas. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. † (%): porcentagem de mortalidade.

Grupos	D0	D1	D2	D3	D4	D5	† (%)
<b>Cm</b>	250,0±7,8 (13)	250,3±7,0 (13)	252,6±6,9 (13)	258,4±8,5 (13)	259,4±9,1 (13)	262,3±7,9 (13)	0
<b>R1000m</b>	266,5±5,4 (20)	259,5±6,2 (20)	250,5±8,6 (15)	234,9±7,0 (10)	220,5±4,4 (4) *	—	100
<b>R2000m</b>	261,4±5,6 (20)	250,2±6,9 (20)	232,8±5,5 (10)	—	—	—	100
<b>ATR1000m</b>	246,1±4,8 (40)	231,6±5,1 (40)	225,5±4,8 (32)*	213,2±4,9 (23) *	207,0±4,6 (14)*	202,2±4,4 (6) *	75
<b>ATR2000m</b>	253,0±7,0 (25)	248,5±7,1 (25)	230,8±3,2 (20)	225,0±9,9 (12) *	224,0±8,1 (7) *	211,3±6,2 (3) *	88
<b>Goq2000m</b>	247,4±5,9 (5)	249,6±6,4 (5)	249,6±5,5 (5)	252,8±4,1 (5)	255,4±4,7 (5)	255,8±6,6 (5)	0
<b>Gom2000m</b>	221,4±3,4 (5)	222,0±2,9 (5)	228,8±1,5 (5)	228,4±2,7 (5)	233,6±2,3 (5)	240,2±2,4 (5)	0
<b>Goq+R1000m</b>	262,8±4,9 (5)	262,0±4,5 (5)	256,6±5,7 (5)	233,8±6,8 (5)	216,3±8,4 (3) *	—	100
<b>Goq+R2000m</b>	256,2±6,0 (10)	234,4±7,5 (10)	226,0±2,1 (4) *	—	—	—	100
<b>Goq+ATR1000m</b>	228,8±8,3 (5)	209,0±9,9 (5)	193,0±10,7 (5)	189,0±15,4 (4)	199,0±21,0 (2)	210,0 (1)	80
<b>Goq+ATR2000m</b>	232,6±6,1 (5)	215,4±5,1 (5)	208,8±5,7 (5)	203,2±7,0 (5)	201,0±10,3 (4)	205,3±10,2 (3)	40
<b>Gom+R1000m</b>	219,4±1,9 (5) <sup>δ</sup>	214,2±4,1 (5) <sup>δ</sup>	208,0±6,5 (5) <sup>δ</sup>	203,8±10,8 (5) <sup>δ</sup>	202,0±9,1 (5) <sup>δ</sup>	—	100
<b>Gom+R2000m</b>	242,7±3,8 (10)	221,8±5,0 (10)	203,3±5,0 (7) *	—	—	—	100
<b>Gom+ATR1000m</b>	252,4±7,0 (5)	242,6±7,5 (5)	231,4±6,8 (5)	224,8±4,9 (5) *	216,2±5,2 (5) *	208,8±3,2 (5) *	0
<b>Gom+ATR2000m</b>	257,0±2,6 (5)	241,8±7,3 (5)	231,8±8,0 (4)	225,0±6,6 (4) *	212,3±0,7 (3) *	206,5±5,5 (3) *	40

Valores expressos como média ± E.P.M. ( ): número de animais. \*Diferente do grupo Cm no tempo respectivo ( $p < 0,05$ ; “Student’s *t* test”). <sup>δ</sup>Diferente do grupo R1000m e Goq+R1000m ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de SNK).

**Tabela 2.** Valores médios da ingestão de alimentos (g/100 g de peso corpóreo) de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, por 5 dias, via gavagem, de herbicida, nanopartícula ou herbicida após 30 min da administração de nanopartícula, e eutanasiados no 1º, 2º, 3º, 4º ou 5º dia (D1, D2, D3, D4 e D5, respectivamente) após a gavagem. Herbicidas: Roundup® (R) e atrazina (ATR), na dose de 1.000 ou 2.000 mg/kg de peso corpóreo. Nanopartículas: goethita em água Milli-Q (Goq) e goethita em água do mar (Gom), nas doses correspondentes a dos grupos com herbicidas. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida.

Grupos	D1	D2	D3	D4	D5
<b>Cm</b>	6,8±0,5 (13)	8,6±0,7 (13)	8,3±0,6 (13)	7,6±0,4 (13)	7,4±0,6 (13)
<b>R1000m</b>	4,1±0,5 (20) *	2,1±0,8 (15) *	1,3±0,2 (10) *	0,0±0,0 (4)	---
<b>R2000m</b>	3,2±0,5 (20) *	0,3±0,2 (15) *	0,2±0,3 (5) *	---	---
<b>ATR1000m</b>	2,6±0,4 (40) *	0,9±0,3 (32) *	1,2±0,2 (24) *	1,7±0,5 (15) *	1,9±1,0 (6) *
<b>ATR2000m</b>	3,8±0,5 (25) *	2,2±0,4 (20) *	1,7±0,7 (14) *	2,7±1,3 (10) *	2,3±1,2 (4) *
<b>Goq2000m</b>	6,9±0,5 (5)	7,7±0,4 (5)	7,5±0,3 (5)	7,2±0,4 (5)	7,2±0,2 (5)
<b>Gom2000m</b>	7,3±0,5 (5)	8,2±0,1 (5)	7,9±0,5 (5)	8,6±0,4 (5)	7,8±0,4 (5)
<b>Goq+R1000m</b>	5,9±0,5 (5)	3,7±0,3 (5) *	4,4±0,6 (5) *	5,5±1,4 (5) *	---
<b>Goq+R2000m</b>	2,4±0,6 (10) *	0,2±0,1 (10) *	---	---	---
<b>Goq+ATR1000m</b>	4,0±0,5 (5) *	1,8±0,9 (5) *	2,3±1,2 (5) *	1,9±1,2 (4) *	2,2±1,2 (2) *
<b>Goq+ATR2000m</b>	4,6±0,5 (5) *	4,3±0,8 (5) *	3,5±1,1 (5) *	3,0 ±1,2 (5) *	3,2±1,4 (4) *
<b>Gom+R1000m</b>	4,9±0,4 (5)	4,2±0,7 (5) *	3,7±1,4 (5) *	4,2±1,3 (5) *	---
<b>Gom+R2000m</b>	2,3±0,7 (10) *	0,2±0,1 (10) *	---	---	---
<b>Gom+ATR1000m</b>	4,8±0,4 (5) *	2,8±0,2 (5) *	2,6±0,4 (5) *	1,5±0,4 (5) *	1,2±0,8 (5) *
<b>Gom+ATR2000m</b>	3,6±0,6 (5) *	2,3±0,7 (5) *	3,4±0,9 (4) *	2,2±1,2 (4) *	2,1±1,6 (3) *

Valores expressos como média ± E.P.M. ( ): número de animais. \*Diferente do grupo Cm no tempo respectivo (p<0,05).

**Tabela 3.** Valores médios plasmáticos de glicose (mg/dL), colesterol total (mg/dL), alanina aminotransferase (ALT; U/L), aspartato aminotransferase (AST; U/L) e creatinina (mg/dL) de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, por 5 dias, via gavagem, de herbicida, nanopartícula ou herbicida após 30 min da administração de nanopartícula, e eutanasiados no 1º, 2º, 3º, 4º ou 5º dia (D1, D2, D3, D4 e D5, respectivamente) após a gavagem. Herbicidas: Roundup® (R) e atrazina (ATR), na dose de 1.000 ou 2.000 mg/kg de peso corpóreo. Nanopartículas: goethita em água Milli-Q (Goq) e goethita em água do mar (Gom), nas doses correspondentes a dos grupos com herbicidas. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida.

Grupos	Glicose (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Creatinina (mg/dL)
<b>Cm</b>	128,9±2,6 (13)	76,3±3,7 (13)	9,6±0,5 (13)	55,9±3,9 (13)	0,7±0,2 (13)
<b>R1000mD1</b>	128,5±3,4 (5)	79,4±2,6 (5)	19,6±1,1 (5) *	69,6±3,1 (5) *	0,8±0,2 (5)
<b>R1000mD2</b>	122,4±1,7 (5)	76,1±5,7 (5)	14,7±1,0 (5) *	56,5±3,9 (5)	0,9±0,1 (5) *
<b>R1000mD3</b>	121,9±7,9 (5)	70,3±2,4 (5)	13,0±1,6 (5) *	56,3±4,7 (5)	1,2±0,2 (5) *
<b>R1000mD4</b>	123,7±9,4 (3)	70,2±3,1 (3)	9,6±1,1 (3)	52,3±6,0 (3)	1,1±0,1 (3) *
<b>R2000mD1</b>	123,6±1,8 (5)	79,1±1,1 (5)	19,4±1,8 (5) *	70,5±5,8 (5)	1,4±0,2 (5) *
<b>R2000mD2</b>	125,4±1,7 (5)	78,9±1,0 (5)	18,1±1,2 (5) *	68,4±6,7 (5)	1,5±0,3 (5) *
<b>ATR1000mD1</b>	120,2±1,7 (8)	71,2±4,0 (8)	9,9±0,8 (8)	56,8±5,5 (8)	0,8±0,2 (8)
<b>ATR1000mD2</b>	123,4±2,5 (8)	78,1±2,7 (8)	9,1±0,4 (8)	58,1±2,5 (8)	0,8±0,2 (8)
<b>ATR1000mD3</b>	125,3±0,1 (6)	78,7±3,0 (6)	11,1±0,5 (6)	62,7±5,5 (6)	1,0±0,2 (6) *
<b>ATR1000mD4</b>	124,3±0,8 (8)	77,1±5,5 (8)	14,5±1,1 (8) *	67,5±4,6 (8)	1,3±0,1 (8) *
<b>ATR1000mD5</b>	127,1±0,8 (6)	76,9±4,6 (6)	15,3±2,0 (6) *	67,6±7,7 (6)	1,2±0,2 (6) *
<b>ATR2000mD1</b>	125,1±1,7 (5)	75,5±4,3 (5)	10,2±0,6 (5)	54,2±3,8 (5)	0,9±0,2 (5)
<b>ATR2000mD2</b>	126,9±3,5 (5)	81,9±2,1 (5)	12,4±1,3 (5) *	65,4±4,6 (5)	1,1±0,1 (5) *
<b>ATR2000mD3</b>	126,6±3,3 (3)	86,9±5,2 (3)	17,9±0,4 (3) *	70,8±5,3 (3)	1,2±0,2 (3) *
<b>ATR2000mD4</b>	126,2±3,2 (3)	95,4±6,0 (3) *	19,4±2,1 (3) *	75,0±1,5 (3) *	1,5±0,3 (3) *
<b>ATR2000mD5</b>	124,1±3,8 (3)	97,0±7,9 (3) *	19,6±3,5 (3) *	75,9±7,0 (3) *	1,4±0,2 (3) *
<b>Goq2000mD5</b>	123,9±2,9 (5)	71,2±3,5 (5)	10,3±0,2 (5)	54,7±1,3 (5)	0,7±0,1 (5)
<b>Gom2000mD5</b>	128,4±3,4 (5)	78,5±1,8 (5)	10,1±0,7 (5)	55,0±2,4 (5)	0,7±0,2 (5)
<b>Goq+R1000mD4</b>	121,7±2,7 (3)	71,2±1,2 (3)	10,0±0,6 (3)	54,6±1,6 (3)	1,3±0,2 (3) *
<b>Goq+ATR1000mD5</b>	129,6 (1)	79,6 (1)	15,4 (1)	68,7 (1)	1,3 (1) *
<b>Goq+ATR2000mD5</b>	128,9±3,0 (3)	93,6±1,8 (3) *	20,0±1,6 (3) *	77,9±2,0 (3) *	1,4±0,2 (3) *
<b>Gom+R1000mD4</b>	126,8±4,8 (5)	72,1±4,1 (5)	10,2±1,0 (5)	55,0±3,4 (5)	1,4±0,3 (5) *
<b>Gom+ATR1000mD5</b>	121,6±1,2 (5)	78,0±2,0 (5)	16,7±0,3 (5) *	69,4±2,3 (5)	1,3±0,2 (5) *
<b>Gom+ATR2000mD5</b>	127,2±7,5 (3)	94,7±3,0 (3) *	19,9±2,8 (3) *	73,8±0,9 (3) *	1,5±0,3 (3) *

Valores expressos como média ± E.P.M. ( ): número de animais. \*Diferente do grupo Cm (p<0,05).

**Tabela 4.** Valores médios de peso corpóreo (em g) de ratos fêmeas (f) submetidas a uma administração diária, por 5 dias, via gavagem, de herbicida, nanopartícula ou herbicida após 30 min de administração de nanopartícula, e eutanasiadas no 1º, 2º, 3º ou 4º dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. D0: 1º dia de gavagem. Herbicidas: Roundup® (R) e atrazina (ATR), na dose de 1.000 ou 2.000 mg/kg de peso corpóreo. Nanopartículas: goethita pura (Go), goethita em água Milli-Q (Goq) e goethita em água do mar (Gom), nas doses correspondentes a dos grupos com herbicidas. O controle (Cf) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. † (%): porcentagem de mortalidade.

Grupos	D0	D1	D2	D3	D4	† (%)
Cf	224,3±5,9 (8)	228,5±4,4 (8)	230,8±4,7 (8)	231,5±4,3 (8)	232,5±4,5 (8)	0
R1000f	240,7±3,7 (20)	238,2±3,0 (20)	227,8±4,2 (15)	219,9±4,4 (10)	210,2±2,9 (4) *	80
R2000f	221,0±5,3 (20)	202,8±5,3 (20) *	192,0±5,4 (6) *	—	—	100
ATR1000f	262,0±6,4 (20)	253,5±6,0 (20)	240,1±6,0 (15)	232,3±4,2 (10)	219,2±4,6 (5) *	75
ATR2000f	239,7±4,3 (20)	231,5±4,6 (20)	227,4±3,8 (19)	226,0±3,5 (8)	225,3±2,5 (4)	80
Go2000f	224,0±3,9 (5)	224,6±2,2 (5)	221,2±1,7 (5)	223,2±3,3 (5)	225,2±2,7 (5)	0
Goq2000f	232,4±5,9 (5)	237,2±5,1 (5)	233,0±5,5 (5)	231,4±4,0 (5)	232,8±5,5 (5)	0
Gom2000f	224,2±3,2 (5)	226,4±3,9 (5)	225,2±4,9 (5)	224,8±5,4 (5)	226,4±4,2 (5)	0
Go+R1000f	227,8±3,4 (5)	220,6±6,7 (5)	206,4±4,9 (5) *	203,0±4,1 (4) *	195,5±7,2 (4) *	20
Go+R2000f	232,6±4,7 (10)	223,3±5,8 (10)	200,3±5,9 (10) *	—	—	100
Go+ATR1000f	223,0±4,7 (5)	217,2±2,3 (5) *	211,2±4,0 (5) *	209,0±2,5 (5) *	209,0±5,4 (5) *	0
Go+ATR2000f	232,0±1,9 (5)	222,2±4,1 (5)	218,0±5,7 (5)	224,0±4,2 (4)	222,8±2,1 (4)	20
Goq+R1000f	256,4±3,6 (5)	243,8±3,6 (5)	229,2±5,1 (5)	230,5±2,5 (2)	240,0 (1)	80
Goq+R2000f	242,2±5,4 (10)	227,6±5,2 (10)	210,7±7,1 (5) *	—	—	100
Goq+ATR1000f	224,3±5,8 (4)	221,8±5,9 (4)	213,0±4,1 (4) *	207,0±6,5 (4) *	199,8±6,6 (4) *	0
Goq+ATR2000f	225,5±4,9 (4)	220,0±5,8 (4)	214,0±5,5 (4) *	210,5±5,4 (4) *	211,7±2,9 (3) *	25
Gom+R1000f	223,4±3,0 (5)	217,5±2,6 (5)	207,6±4,7 (5) *	191,4±9,5 (5) *	199,0±1,0 (3) *	40
Gom+R2000f	244,4±4,3 (10)	226,7±5,0 (10)	216,3±3,5 (3) *	—	—	100
Gom+ATR1000f	223,6±2,7 (5)	214,0±1,7 (5) *	207,0±2,1 (5) *	203,8±2,4 (5) *	199,0±2,9 (5) *	0
Gom+ATR2000f	231,4±3,3 (5)	217,6±4,5 (5) *	210,4±5,6 (5) *	208,4±7,1 (5) *	202,0±8,4 (4) *	20

Valores expressos como média ± E.P.M. ( ): número de animais. \*Diferente do grupo Cf no tempo respectivo (p<0,05).

**Tabela 5.** Valores médios da ingestão de alimentos (g/100 g de peso corpóreo) de ratos fêmeas (f) submetidas a uma administração diária, por 4 dias, via gavagem, de herbicida, nanopartícula ou herbicida após 30 min de administração de nanopartícula, e eutanasiadas no 1º, 2º, 3º ou 4º dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. Herbicidas: Roundup® (R) ou atrazina (ATR), na dose de 1.000 ou 2.000 mg/kg de peso corpóreo. Nanopartículas: goethita pura (Go), goethita em água Milli-Q (Goq) e goethita em água do mar (Gom), nas doses correspondentes a dos grupos com herbicidas. O controle (Cf) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida.

<b>Grupos</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D4</b>
<b>Cf</b>	8,4±0,5 (8)	7,8±0,5 (8)	7,4±0,6 (8)	7,9±0,5 (8)
<b>R1000f</b>	4,5±0,3 (20) *	1,6±0,6 (15) *	0,7±0,5 (10) *	0,5±0,5 (5) *
<b>R2000f</b>	2,0±0,6 (20) *	0,0±0,0 (6)	---	---
<b>ATR1000f</b>	2,2±0,4 (20) *	1,2±0,4 (15) *	1,1±0,4 (10) *	1,0±0,5 (5) *
<b>ATR2000f</b>	2,8±0,5 (20) *	2,2±0,7 (15) *	2,1±0,5 (10) *	2,5±0,6 (4) *
<b>Go2000f</b>	9,0±0,6 (5)	6,8±0,4 (5)	6,9±0,5 (5)	7,5±0,4 (5)
<b>Goq2000f</b>	7,0±0,2 (5)	7,0±0,5 (5)	6,2±0,3 (5)	6,8±0,4 (5)
<b>Gom2000f</b>	8,9±0,3 (5)	6,9±0,2 (5)	7,1±0,4 (5)	7,3±0,3 (5)
<b>Go+R1000f</b>	2,0±0,7 (5) *	0,0±0,0 (5)	0,4±0,4 (5) *	1,2±1,2 (4) *
<b>Go+R2000f</b>	3,0±0,7 (10) *	0,0±0,0 (5)	---	---
<b>Go+ATR1000f</b>	4,2±0,3 (5) *	3,0±0,4 (5) *	2,1±0,6 (5) *	1,9±0,8 (5) *
<b>Go+ATR2000f</b>	3,8±0,3 (5) *	2,7±0,7 (5) *	1,7±0,6 (5) *	3,0±0,4 (4) *
<b>Goq+R1000f</b>	4,1±0,7 (5) *	0,9±0,7 (5) *	1,0±0,9 (5) *	1,4±2,0 (2) *
<b>Goq+R2000f</b>	2,0±0,5 (10) *	0,3±0,1 (5) *	---	---
<b>Goq+ATR1000f</b>	4,4±0,2 (4) *	3,1±0,6 (4) *	2,1±0,7 (4) *	1,3±0,7 (4) *
<b>Goq+ATR2000f</b>	3,1±0,6 (4) *	2,8±0,8 (4) *	2,6±0,8 (4) *	1,9±0,9 (4) *
<b>Gom+R1000f</b>	4,6±0,6 (5) *	2,0±1,3 (5) *	1,1±0,7 (5) *	0,0±0,0 (5)
<b>Gom+R2000f</b>	1,7±0,4 (10)*	0,2±0,1 (5) *	---	---
<b>Gom+ATR1000</b>	4,2±0,2 (5) *	2,6±0,6 (5) *	2,0±0,6 (5) *	0,8±0,6 (5) *
<b>Gom+ATR2000</b>	3,1±0,4 (5) *	2,2±0,7 (5) *	1,5±0,4 (5) *	1,0±0,7 (5) *

Valores expressos como média ± E.P.M. ( ): número de animais. \*Diferente do grupo Cf no tempo respectivo ( $p < 0,05$ ).

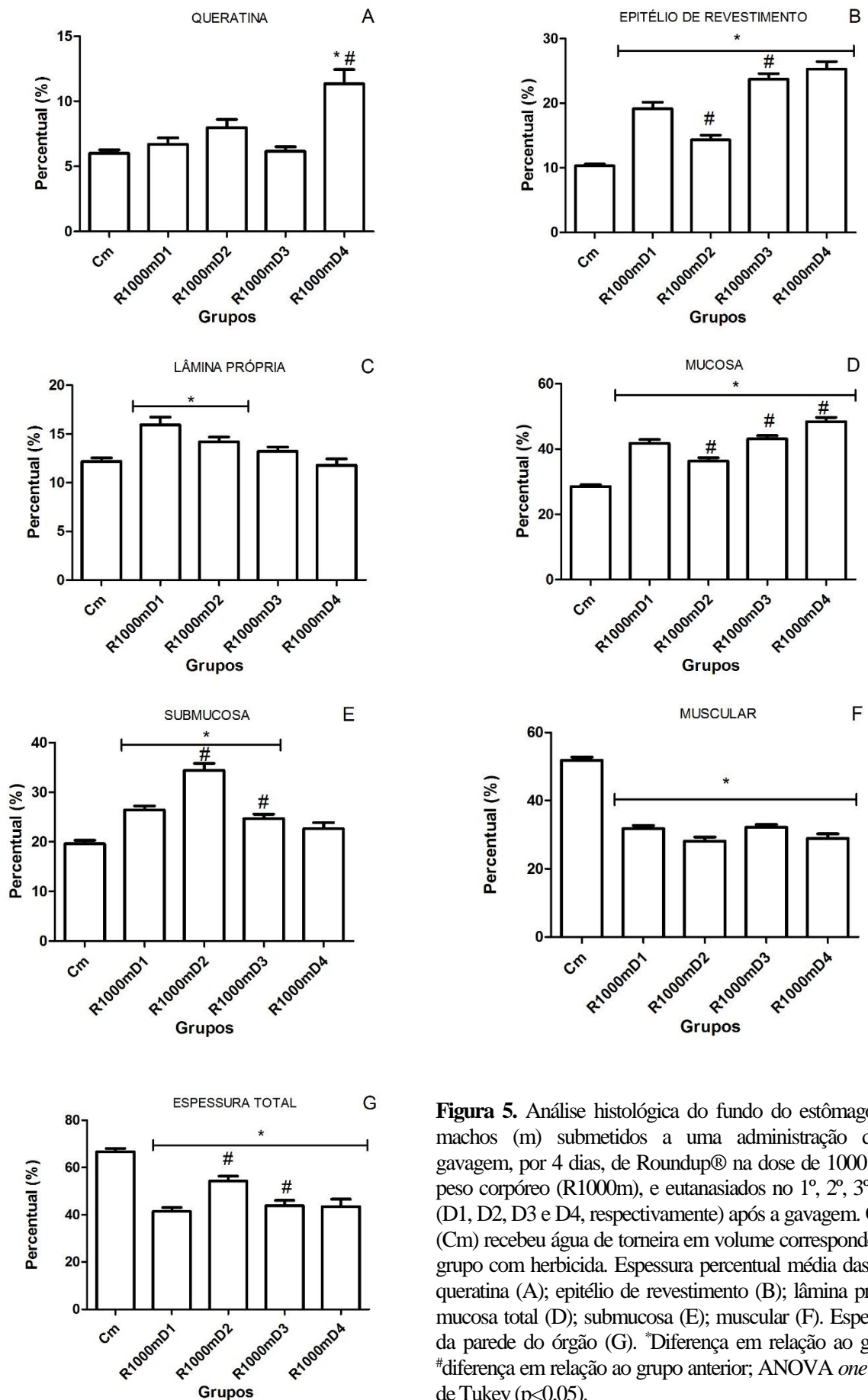
**Tabela 6.** Valores médios plasmáticos de glicose (mg/dL), colesterol total (mg/dL), alanina aminotransferase (ALT; U/L), aspartato aminotransferase (AST; U/L) e creatinina (mg/dL) de ratos fêmeas (f) submetidas a uma administração diária, por 5 dias, via gavagem, de herbicida, nanopartícula ou herbicida após 30 min da administração de nanopartícula, e eutanasiadas no 1º, 2º, 3º ou 4º dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. Herbicidas: Roundup® (R) e atrazina (ATR), na dose de 1.000 ou 2.000 mg/kg de peso corpóreo. Nanopartículas: goethita pura (Go), goethita em água Milli-Q (Goq) e goethita em água do mar (Gom), nas doses correspondentes a dos grupos com herbicidas. O controle (Cf) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida.

<b>Grupos</b>	<b>Glicose (mg/dL)</b>	<b>Colesterol Total (mg/dL)</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>AST (U/L)</b>	<b>Creatinina (mg/dL)</b>
<b>Cf</b>	124,0±2,5 (8)	71,0±3,3 (8)	10,3±0,8 (8)	53,1±2,2 (8)	0,6±0,3 (8)
<b>R1000fD1</b>	129,8±1,7 (5)	78,3±3,1 (5)	16,0±0,8 (5) *	65,2±1,8 (5) *	0,8±0,2 (5)
<b>R1000fD2</b>	132,2±1,8 (5) *	77,3±7,4 (5)	11,7±1,0 (5)	54,5±3,3 (5)	0,9±0,2 (5) *
<b>R1000fD3</b>	128,3±3,9 (5)	70,3±4,5 (5)	10,2±1,0 (5)	54,2±2,3 (5)	1,3±0,3 (5) *
<b>R1000fD4</b>	125,8±4,7 (4)	68,1±3,0 (4)	11,0±1,1 (4)	54,3±3,3 (4)	1,2±0,2 (4) *
<b>R2000fD1</b>	125,2±5,9 (5)	73,5±1,8 (5)	18,4±1,9 (5) *	69,6±7,8 (5) *	1,4±0,2 (5) *
<b>R2000fD2</b>	128,0±9,3 (3)	74,5±1,3 (3)	13,2±3,1 (3)	65,8±7,8 (3)	1,5±0,2 (3) *
<b>ATR1000fD1</b>	126,2±2,1 (5)	66,9±5,3 (5)	10,0±0,7 (5)	54,5±4,5 (5)	0,8±0,2 (5)
<b>ATR1000fD2</b>	124,7±1,9 (5)	78,2±4,8 (5)	12,4±0,8 (5)	60,2±5,4 (5)	0,9±0,1 (5) *
<b>ATR1000fD3</b>	122,1±1,0 (5)	79,1±7,6 (5)	15,2±1,5 (5) *	70,5±5,6 (5) *	1,2±0,2 (5) *
<b>ATR1000fD4</b>	128,0±2,7 (5)	70,7±6,9 (5)	17,1±0,9 (5) *	70,4±4,1 (5) *	1,4±0,1 (5) *
<b>ATR2000fD1</b>	127,3±3,1 (5)	70,7±5,6 (5)	10,0±0,6 (5)	53,6±5,0 (5)	1,0±0,1 (5) *
<b>ATR2000fD2</b>	123,9±4,6 (4)	79,1±9,7 (4)	14,7±1,4 (4) *	66,7±6,5 (4) *	1,2±0,2 (4) *
<b>ATR2000fD3</b>	127,0±4,1 (4)	74,5±3,1 (4)	15,0±0,6 (4) *	71,7±6,6 (4) *	1,5±0,2 (4) *
<b>ATR2000fD4</b>	126,7±4,2 (4)	72,5±4,6 (4)	16,4±2,2 (4) *	71,9±4,8 (4) *	1,3±0,1 (4) *
<b>Go2000fD4</b>	120,8±1,0 (5)	67,0±3,1 (5)	9,9±0,3 (5)	52,2±3,0 (5)	0,7±0,1 (5)
<b>Goq2000fD4</b>	122,7±1,8 (5)	71,5±2,2 (5)	10,0±1,2 (5)	54,8±3,7 (5)	0,6±0,2 (5)
<b>Gom2000fD4</b>	125,3±4,6 (5)	74,8±5,1 (5)	10,8±0,6 (5)	52,4±3,7 (5)	0,7±0,2 (5)
<b>Go+R1000fD4</b>	121,3±1,2 (4)	70,2±1,0 (4)	10,1±0,3 (4)	54,0±4,6 (4)	1,3±0,1 (4) *
<b>Go+ATR1000fD4</b>	123,1±1,4 (5)	77,6±1,2 (5)	17,0±0,4 (5) *	69,9±2,5 (5) *	1,3±0,2 (5) *
<b>Go+ATR2000fD4</b>	123,2±1,6 (4)	75,5±3,3 (4)	18,7±0,6 (4) *	70,0±1,6 (4) *	1,4±0,1 (4) *
<b>Goq+R1000fD4</b>	123,3 (1)	78,2 (1)	10,6 (1)	55,9 (1)	1,4 (1) *
<b>Goq+ATR1000fD4</b>	125,7±1,2 (4)	70,8±1,8 (4)	18,1±1,4 (4) *	71,0±5,0 (4) *	1,3±0,1 (4) *
<b>Goq+ATR2000fD4</b>	124,0±2,3 (3)	69,9±2,1 (3)	17,8±1,7 (3) *	72,9±4,8 (3) *	1,5±0,2 (3) *
<b>Gom+R1000fD4</b>	127,6±3,4 (3)	76,0±1,3 (3)	10,1±0,1 (3)	56,9±2,9 (3)	1,2±0,1 (3) *
<b>Gom+ATR1000fD4</b>	121,3±1,8 (5)	76,7±2,6 (5)	16,7±0,5 (5) *	69,6±3,1 (5) *	1,3±0,1 (5) *
<b>Gom+ATR2000fD4</b>	122,3±2,1 (4)	73,6±3,6 (4)	18,4±1,4 (4) *	69,8±2,2 (4) *	1,4±0,1 (4) *

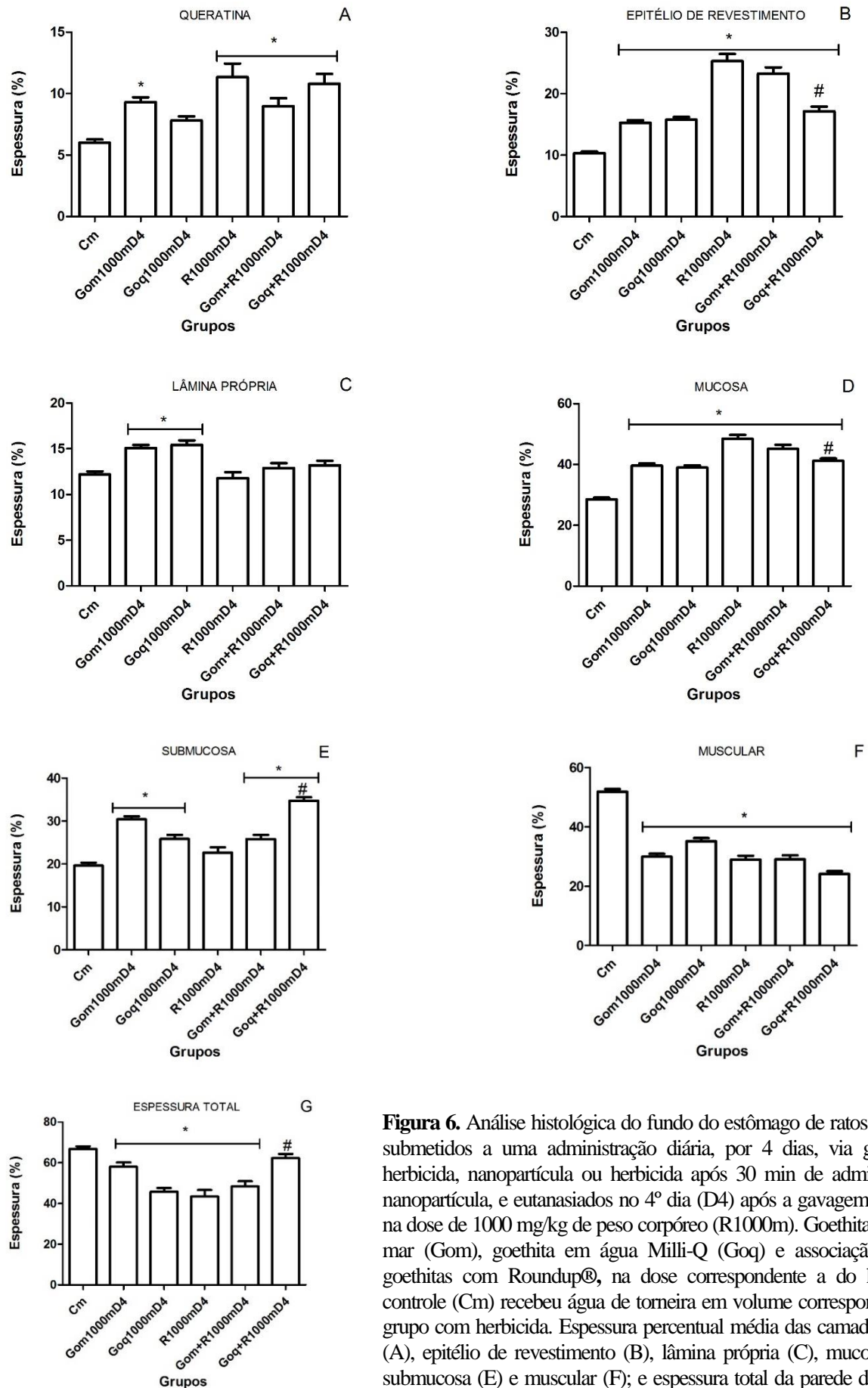
Valores expressos como média ± E.P.M. ( ): número de animais. \*Diferente do grupo Cf (p<0,05).

**ANEXO 2 - FIGURAS**

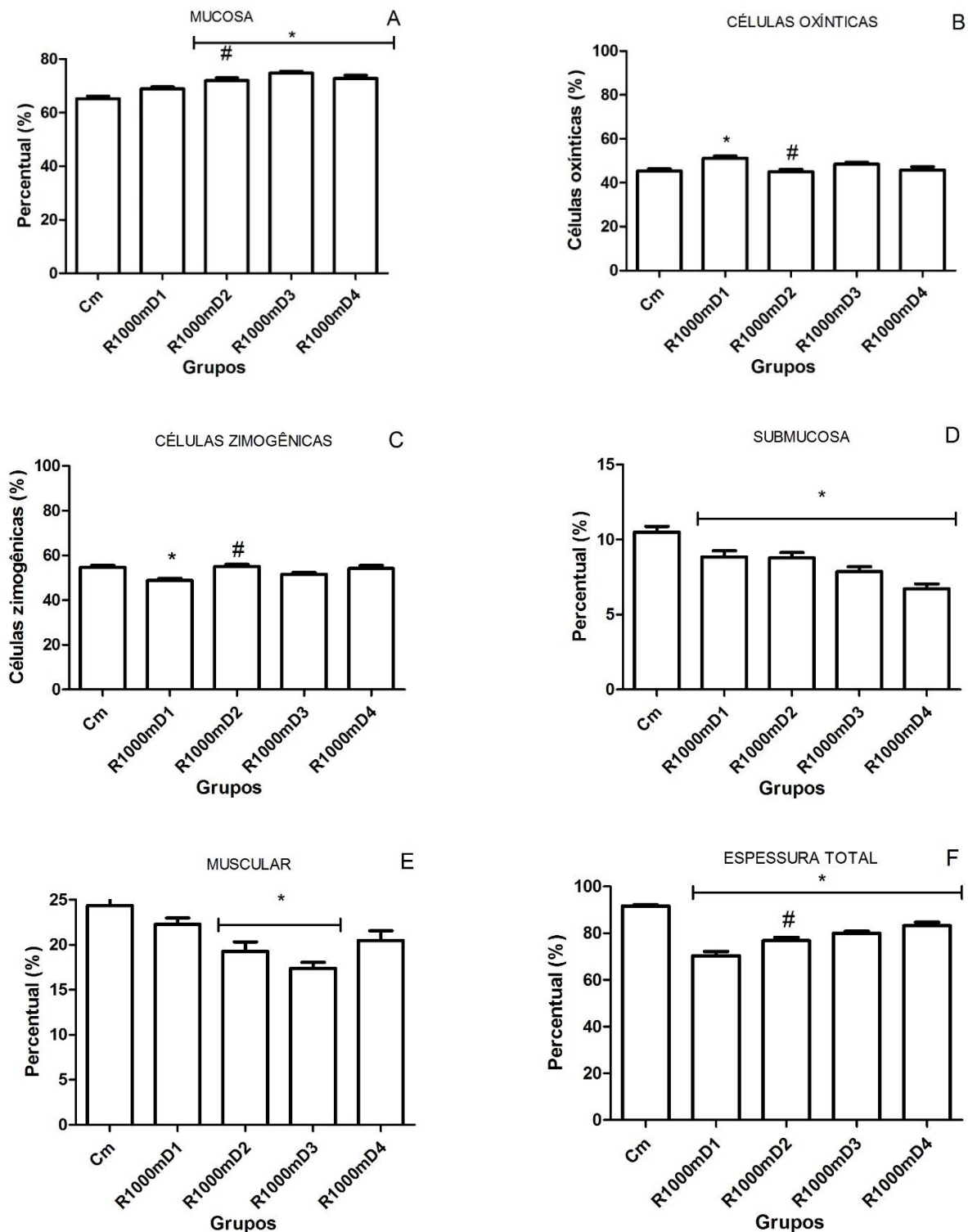
**(de 05 a 23)**



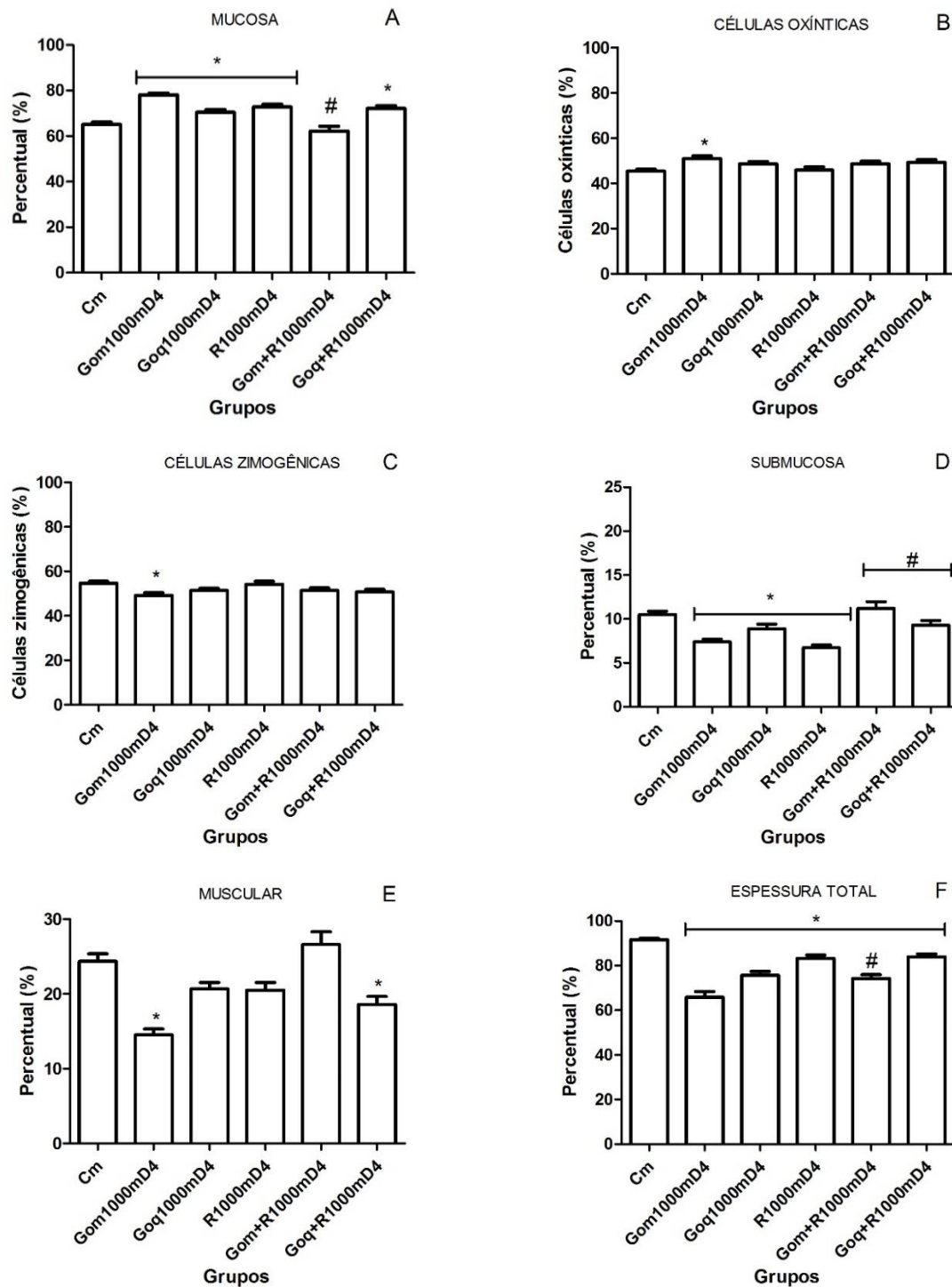
**Figura 5.** Análise histológica do fundo do estômago de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, via gavagem, por 4 dias, de Roundup® na dose de 1000 mg/kg de peso corpóreo (R1000m), e eutanasiados no 1º, 2º, 3º ou 4º dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. Espessura percentual média das camadas: queratina (A); epitélio de revestimento (B); lâmina própria (C); mucosa total (D); submucosa (E); muscular (F). Espessura total da parede do órgão (G). \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

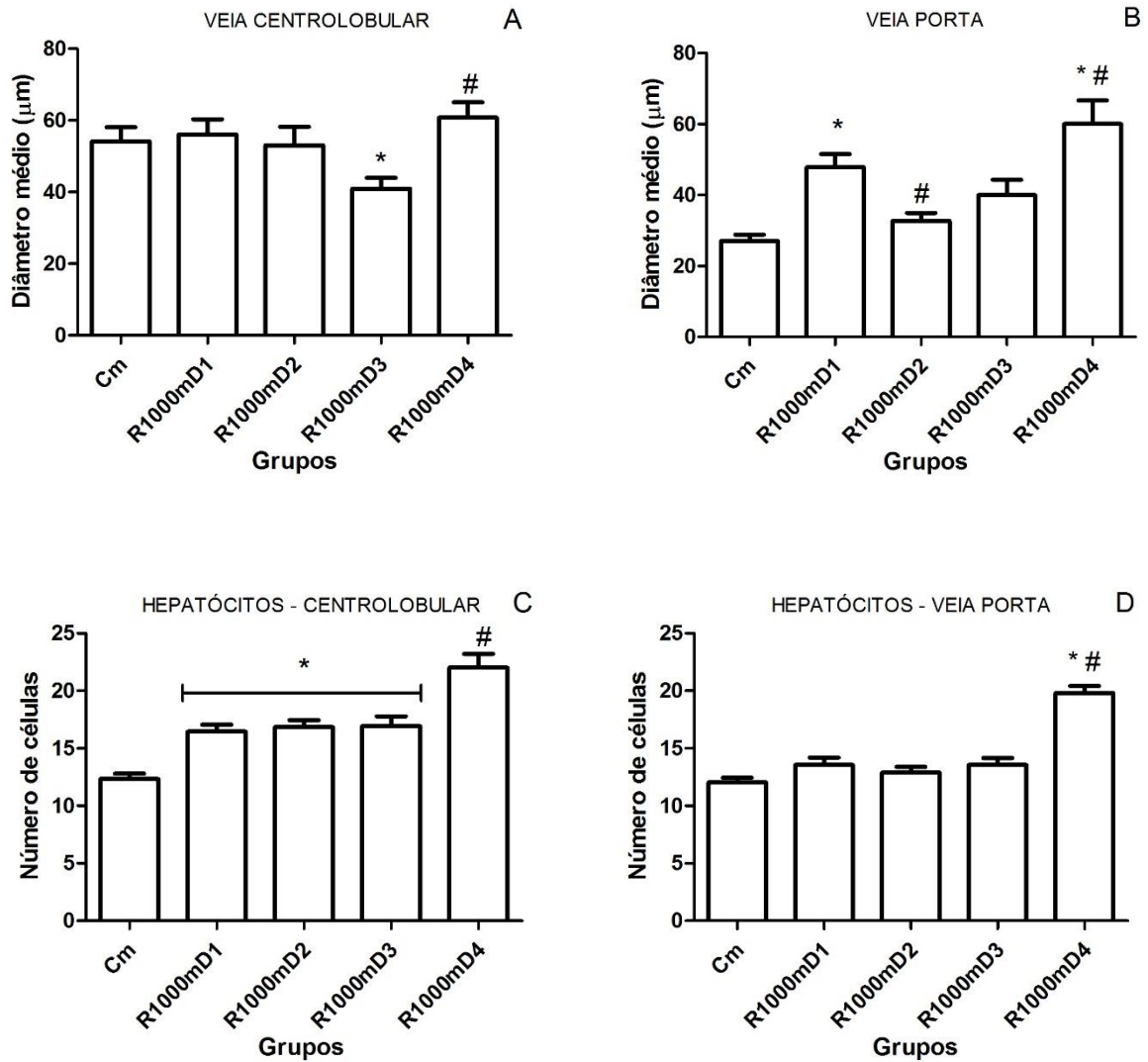


**Figura 6.** Análise histológica do fundo do estômago de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, por 4 dias, via gavagem, de herbicida, nanopartícula ou herbicida após 30 min de administração de nanopartícula, e eutanasiados no 4º dia (D4) após a gavagem. Roundup® na dose de 1000 mg/kg de peso corpóreo (R1000m). Goethita em água do mar (Gom), goethita em água Milli-Q (Goq) e associação de ambas goethitas com Roundup®, na dose correspondente a do herbicida. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. Espessura percentual média das camadas: queratina (A), epitélio de revestimento (B), lâmina própria (C), mucosa total (D), submucosa (E) e muscular (F); e espessura total da parede do órgão (G). \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo R1000mD4; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

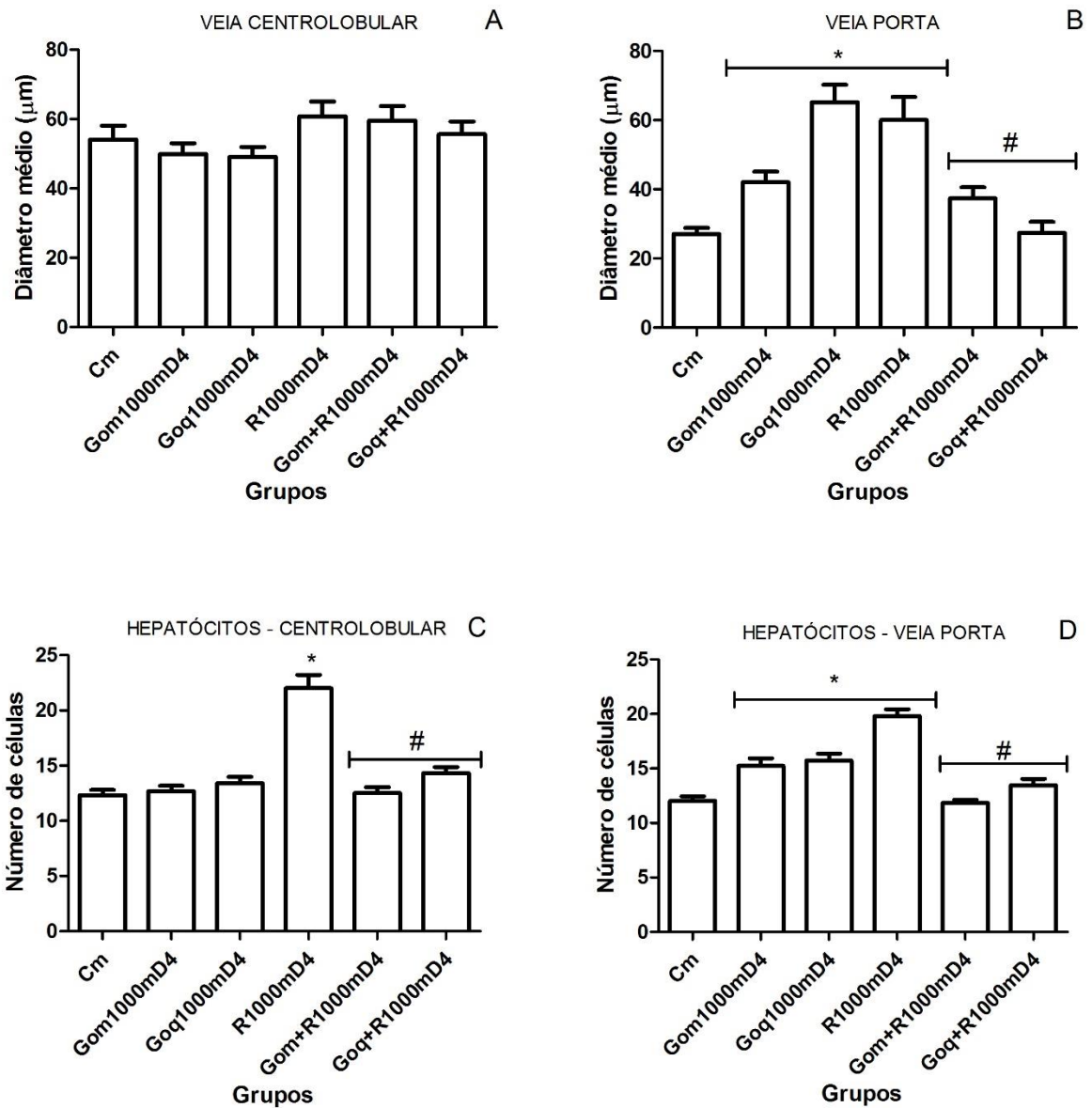


**Figura 7.** Análise histológica do corpo do estômago de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, via gavagem, por 4 dias, de Roundup® na dose de 1000 mg/kg de peso corpóreo (R1000m), e eutanasiados no 1°, 2°, 3° ou 4° dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. Espessura percentual média das camadas mucosa (A), número médio de células oxínticas em área de 2000  $\mu\text{m}^2$  das glândulas gástricas (B), número médio de células zimogênicas em área de 2000  $\mu\text{m}^2$  das glândulas gástricas (C), submucosa (D), muscular (E) e espessura total média da parede (F). \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

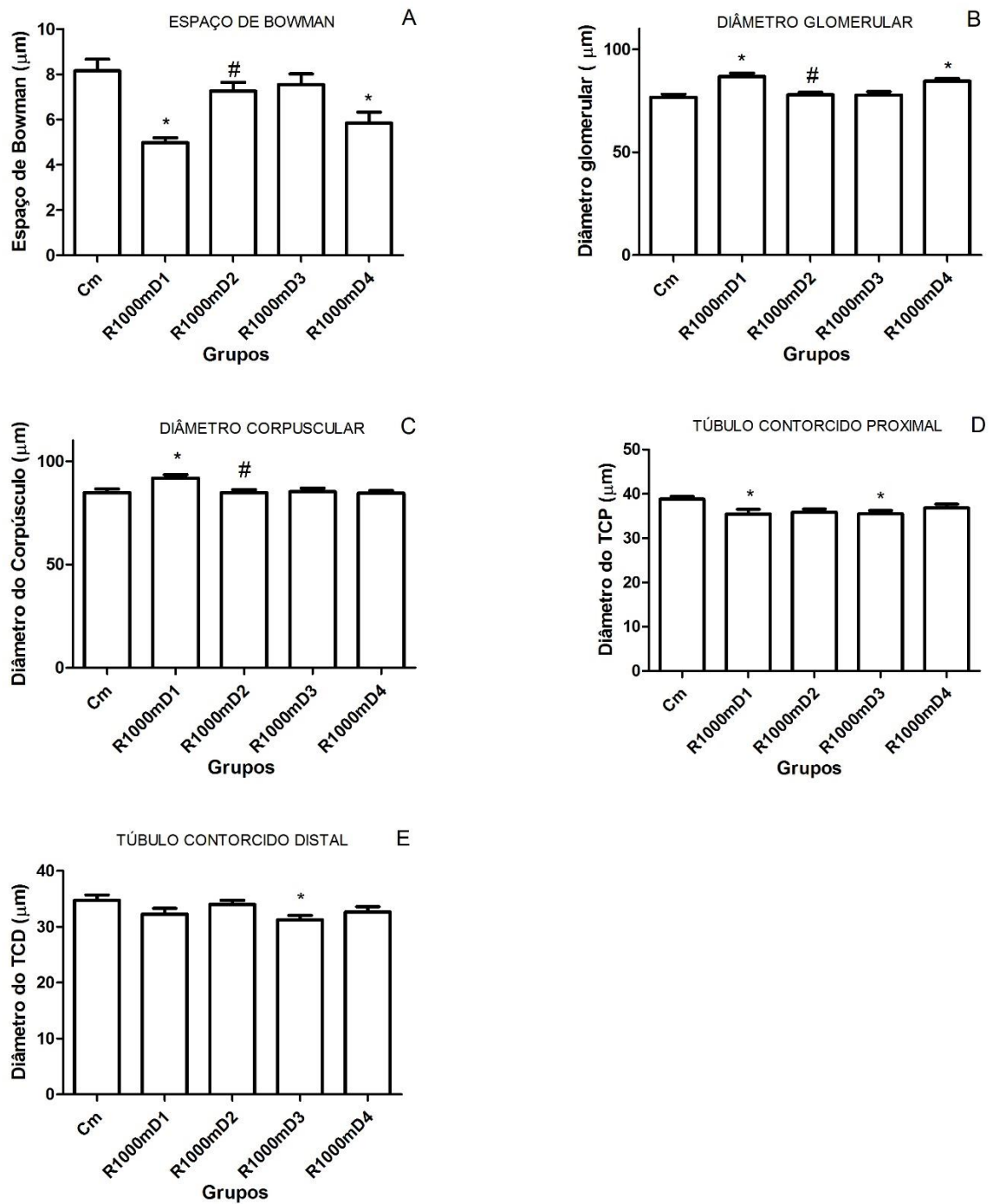




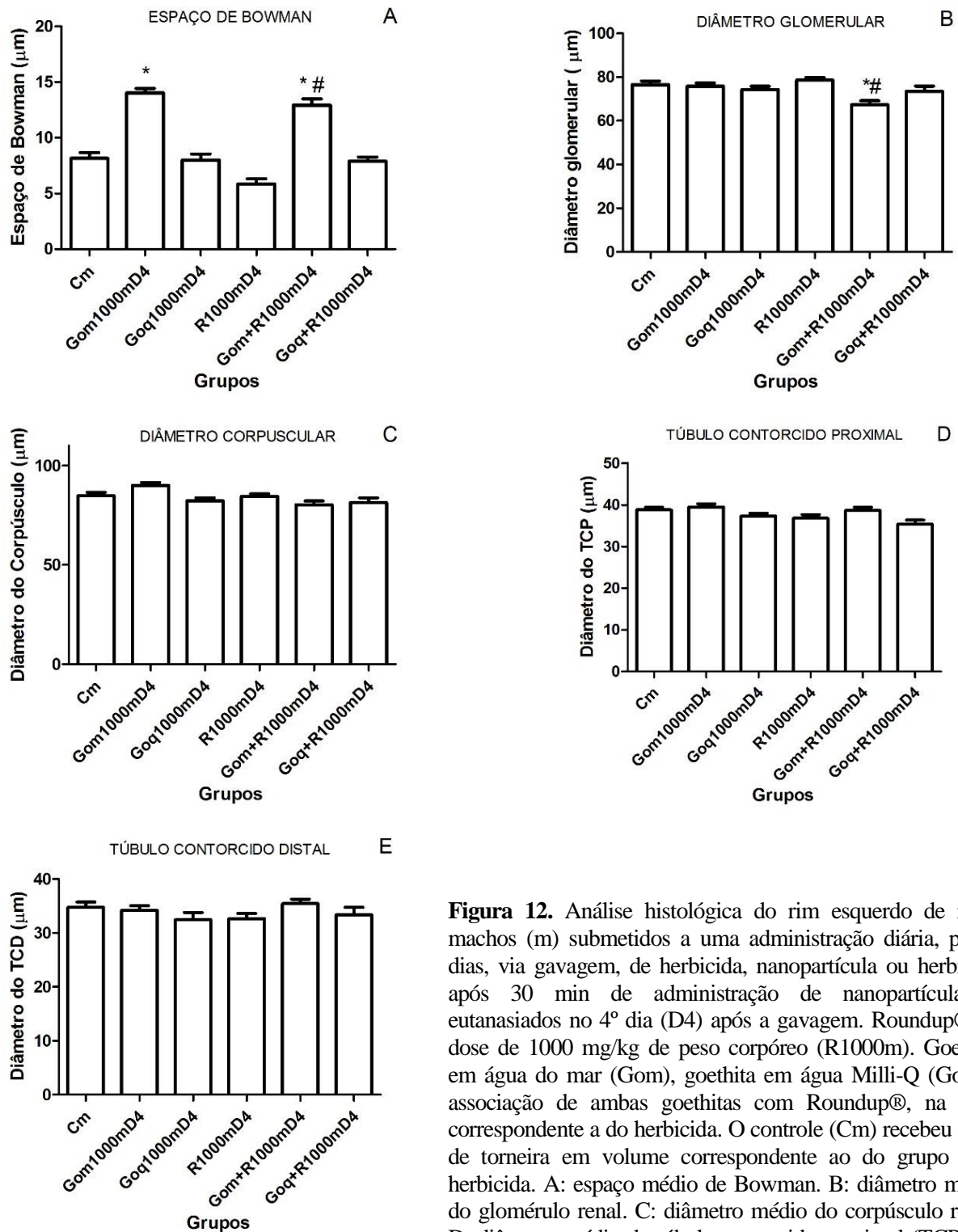
**Figura 9.** Análise histológica do fígado de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, via gavagem, por 4 dias, de Roundup® na dose de 1000 mg/kg de peso corpóreo (R1000m), e eutanasiados no 1º, 2º, 3º ou 4º dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. A: diâmetro médio da veia centrolobular. B: diâmetro médio da veia porta. C: número médio de hepatócitos ativos em área de 1000 µm<sup>2</sup> próxima à veia centrolobular. D: número médio de hepatócitos ativos em área de 1000 µm<sup>2</sup> próxima à veia porta. \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey (p<0,05).



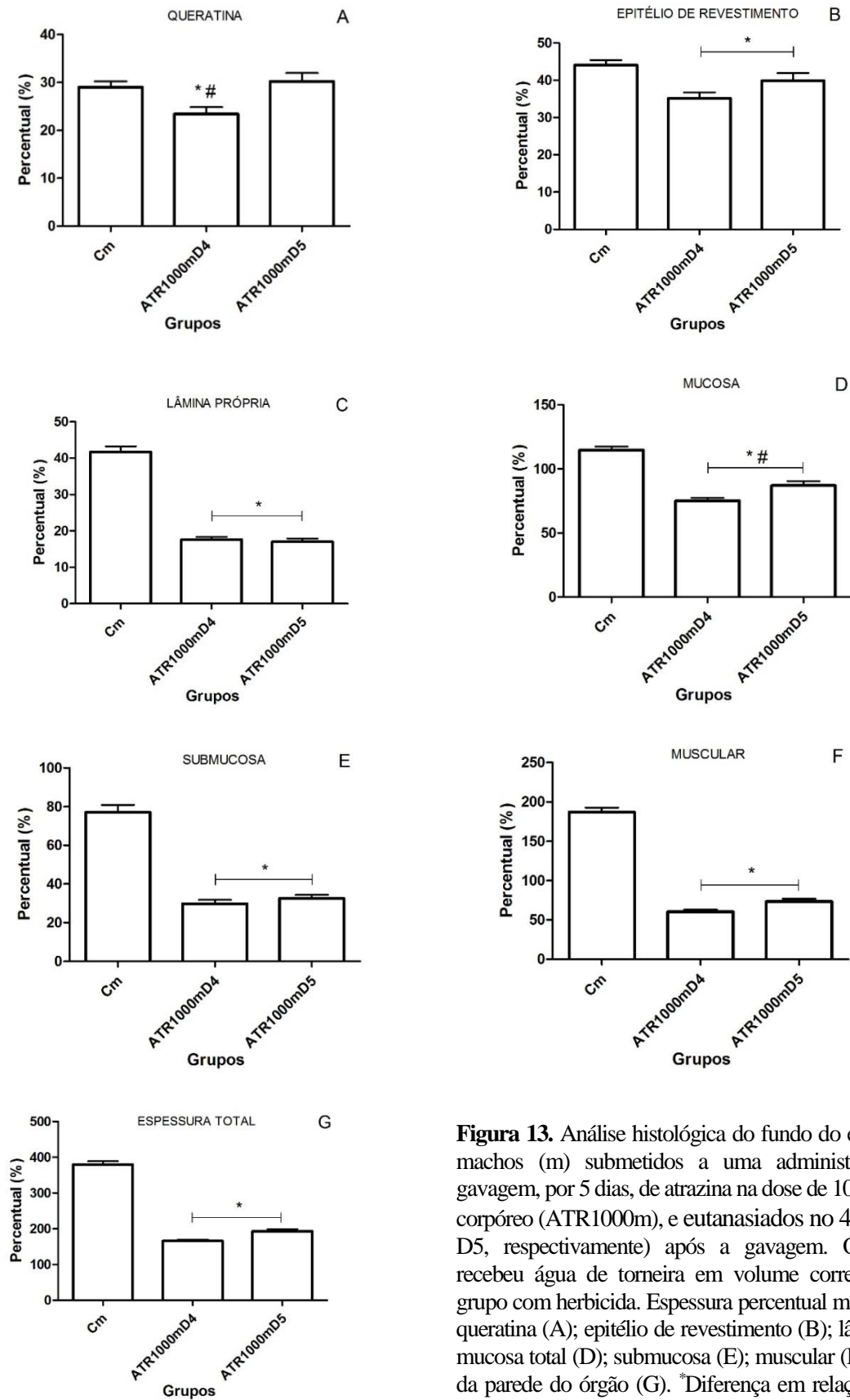
**Figura 10.** Análise histológica do fígado de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, por 4 dias, via gavagem, de herbicida, nanopartícula ou herbicida após 30 min de administração de nanopartícula, e eutanasiados no 4º dia (D4) após a gavagem. Roundup® na dose de 1000 mg/kg de peso corpóreo (R1000m). Goethita em água do mar (Gom), goethita em água Milli-Q (Goq) e associação de ambas goethitas com Roundup®, na dose correspondente a do herbicida. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. A: diâmetro médio da veia centrolobular. B: diâmetro médio da veia porta. C: número médio de hepatócitos ativos em área de 1000 µm<sup>2</sup> próxima à veia centrolobular. D: número médio de hepatócitos ativos em área de 1000 µm<sup>2</sup> próxima à veia porta. \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo R1000mD4; ANOVA *one way*, teste de Tukey (p<0,05).



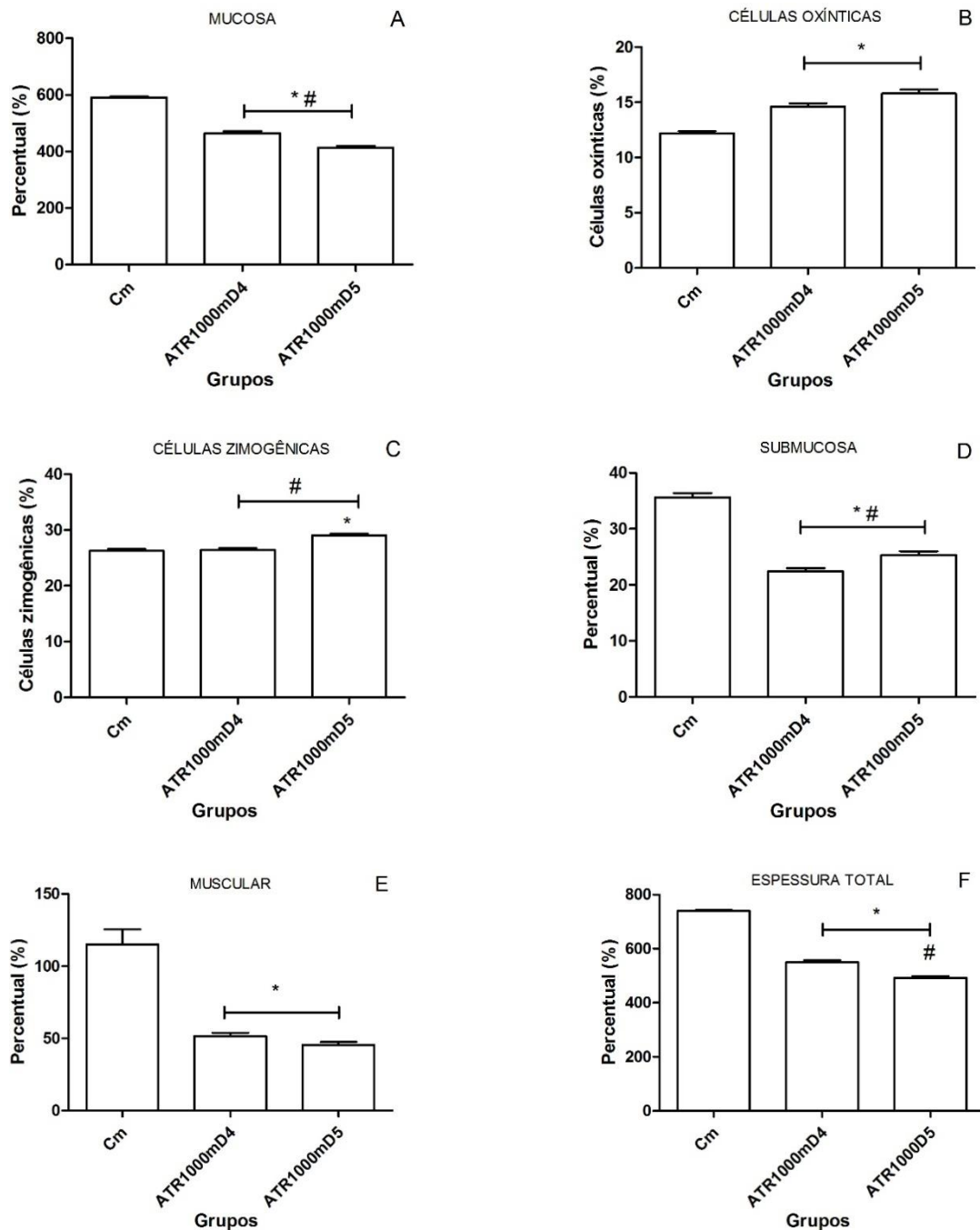
**Figura 11.** Análise histológica do rim esquerdo de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, via gavagem, por 4 dias, de Roundup® na dose de 1000 mg/kg de peso corpóreo (R1000m), e eutanasiados no 1º, 2º, 3º ou 4º dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. A: espaço médio de Bowman. B: diâmetro médio do glomérulo renal. C: diâmetro médio do corpúsculo renal. D: diâmetro médio do túbulo contorcido proximal (TCP). E: diâmetro médio do túbulo contorcido distal (TCD). \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

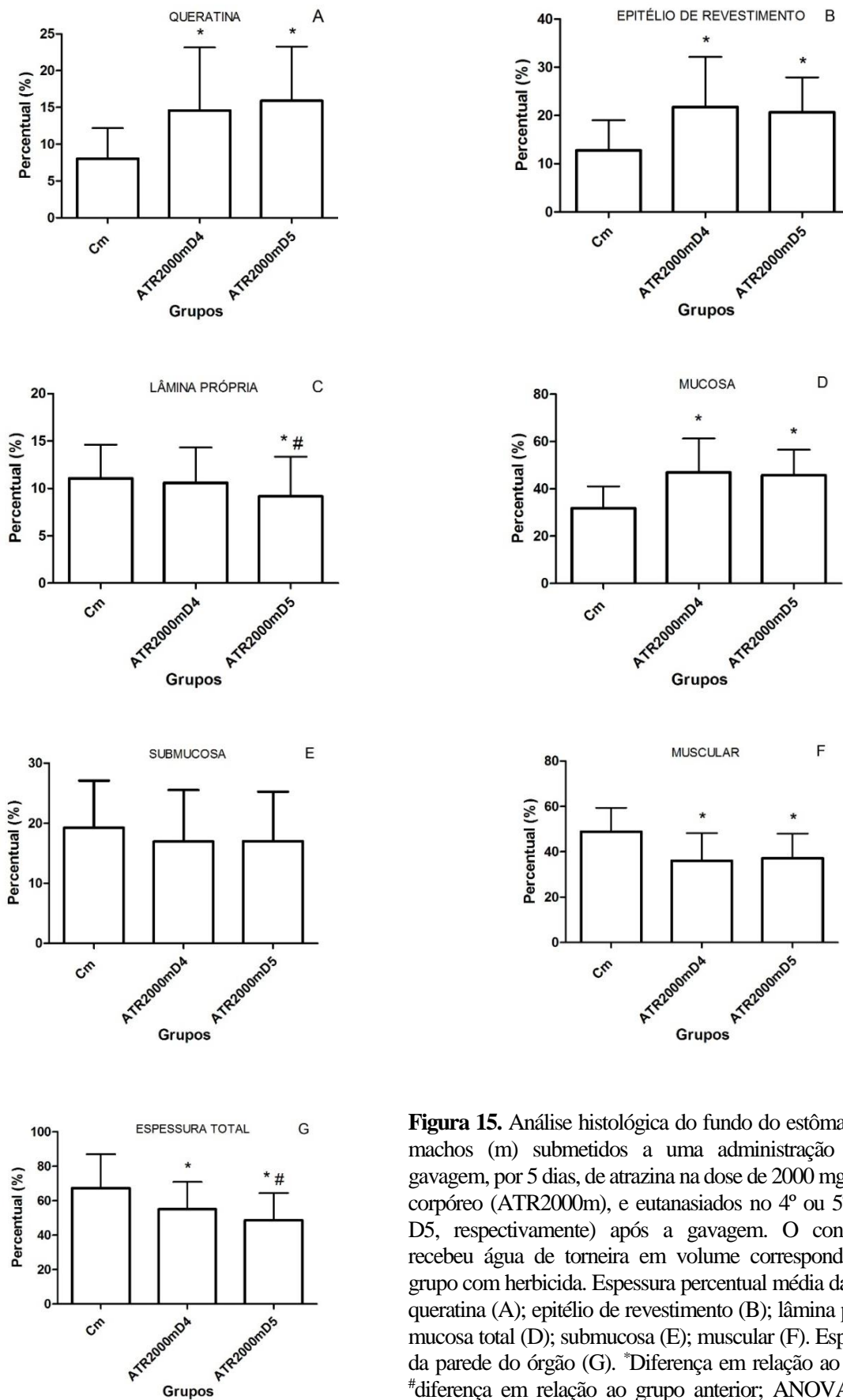


**Figura 12.** Análise histológica do rim esquerdo de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, por 4 dias, via gavagem, de herbicida, nanopartícula ou herbicida após 30 min de administração de nanopartícula, e eutanasiados no 4º dia (D4) após a gavagem. Roundup® na dose de 1000 mg/kg de peso corpóreo (R1000m). Goethita em água do mar (Gom), goethita em água Milli-Q (Goq) e associação de ambas goethitas com Roundup®, na dose correspondente a do herbicida. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. A: espaço médio de Bowman. B: diâmetro médio do glomérulo renal. C: diâmetro médio do corpúsculo renal. D: diâmetro médio do túbulo contorcido proximal (TCP). E: diâmetro médio do túbulo contorcido distal (TCD). \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo R1000mD4; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

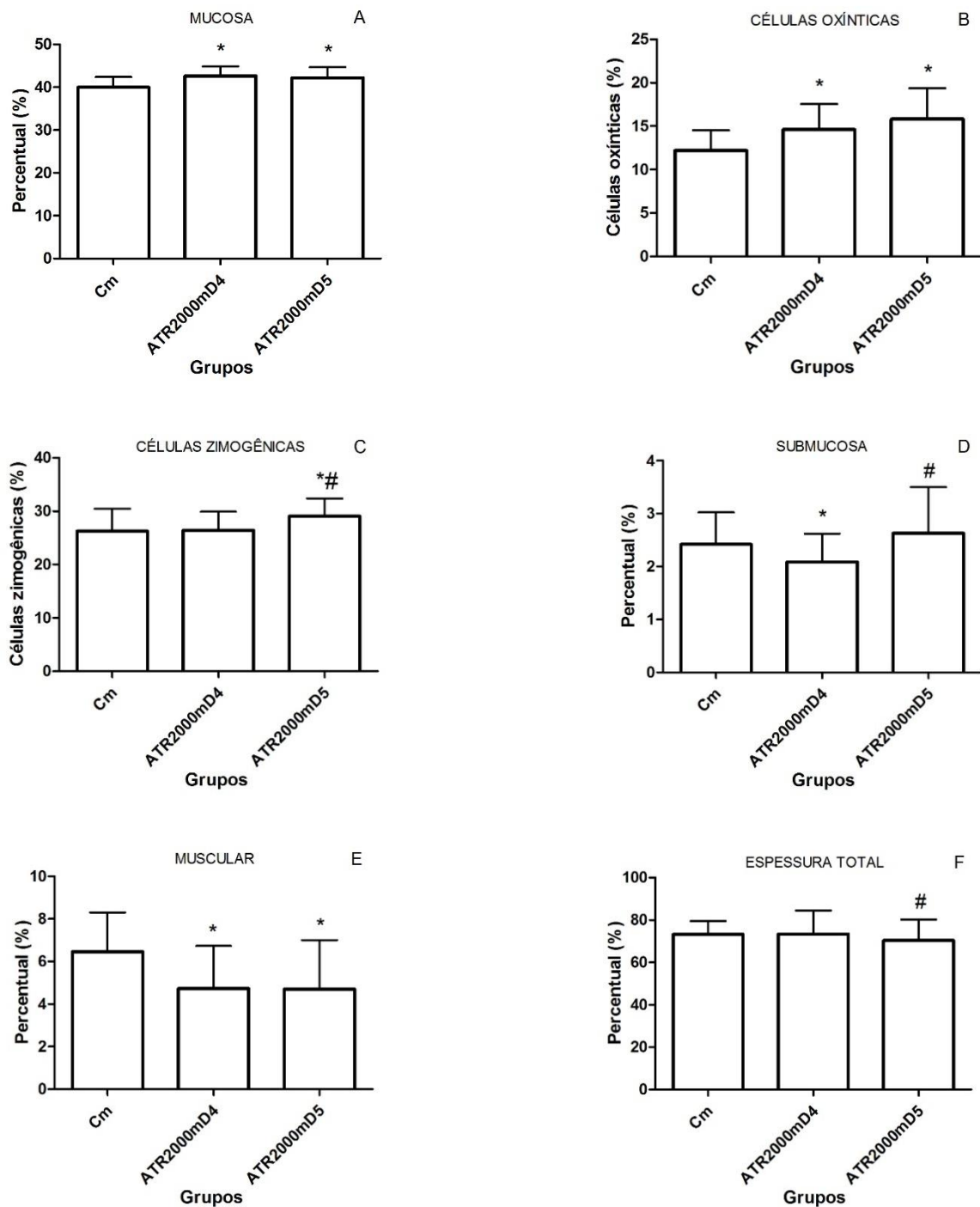


**Figura 13.** Análise histológica do fundo do estômago de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, via gavagem, por 5 dias, de atrazina na dose de 1000 mg/kg de peso corpóreo (ATR1000m), e eutanasiados no 4º ou 5º dia (D4 e D5, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. Espessura percentual média das camadas: queratina (A); epitélio de revestimento (B); lâmina própria (C); mucosa total (D); submucosa (E); muscular (F). Espessura total da parede do órgão (G). \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

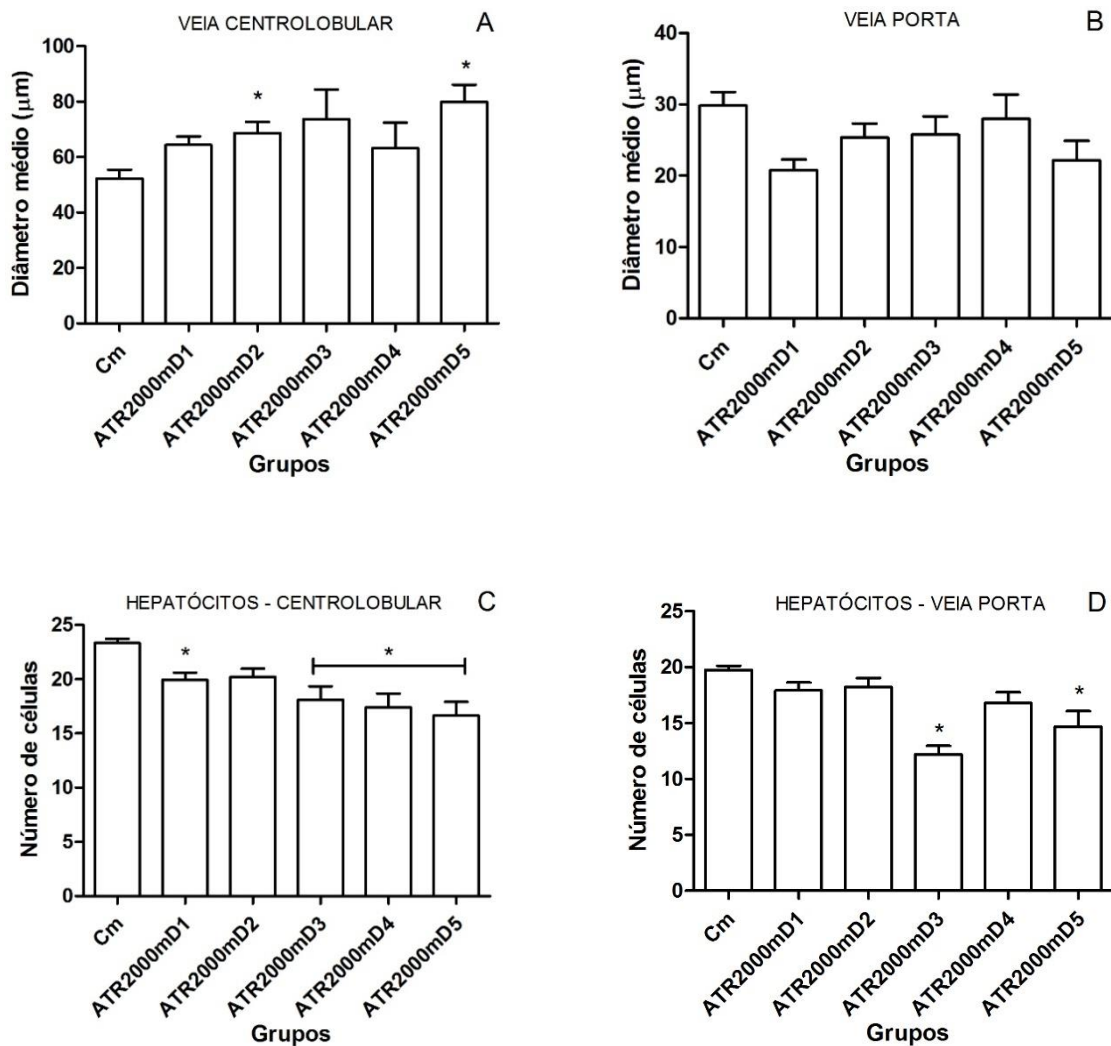




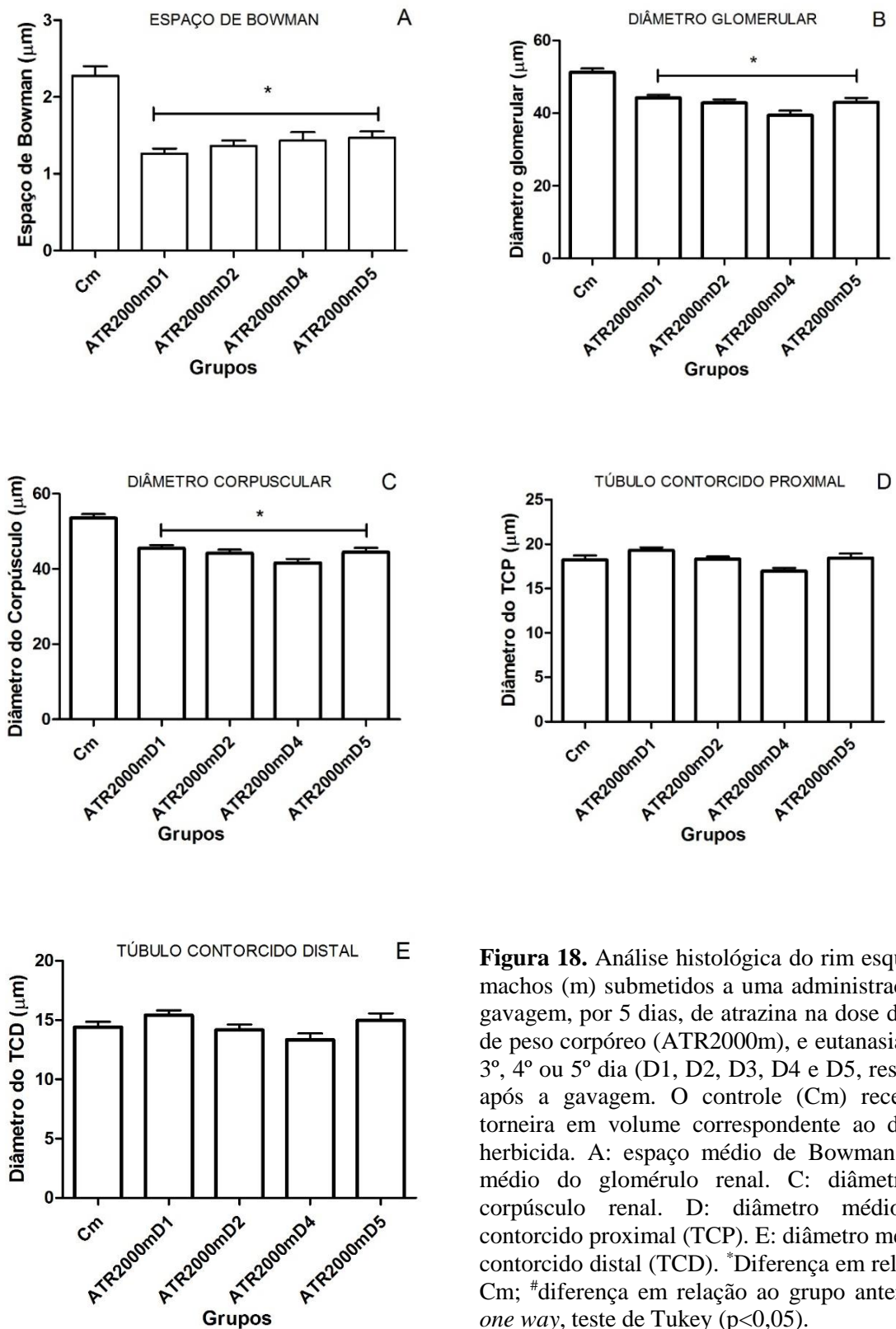
**Figura 15.** Análise histológica do fundo do estômago de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, via gavagem, por 5 dias, de atrazina na dose de 2000 mg/kg de peso corpóreo (ATR2000m), e eutanasiados no 4º ou 5º dia (D4 e D5, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. Espessura percentual média das camadas: queratina (A); epitélio de revestimento (B); lâmina própria (C); mucosa total (D); submucosa (E); muscular (F). Espessura total da parede do órgão (G). \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



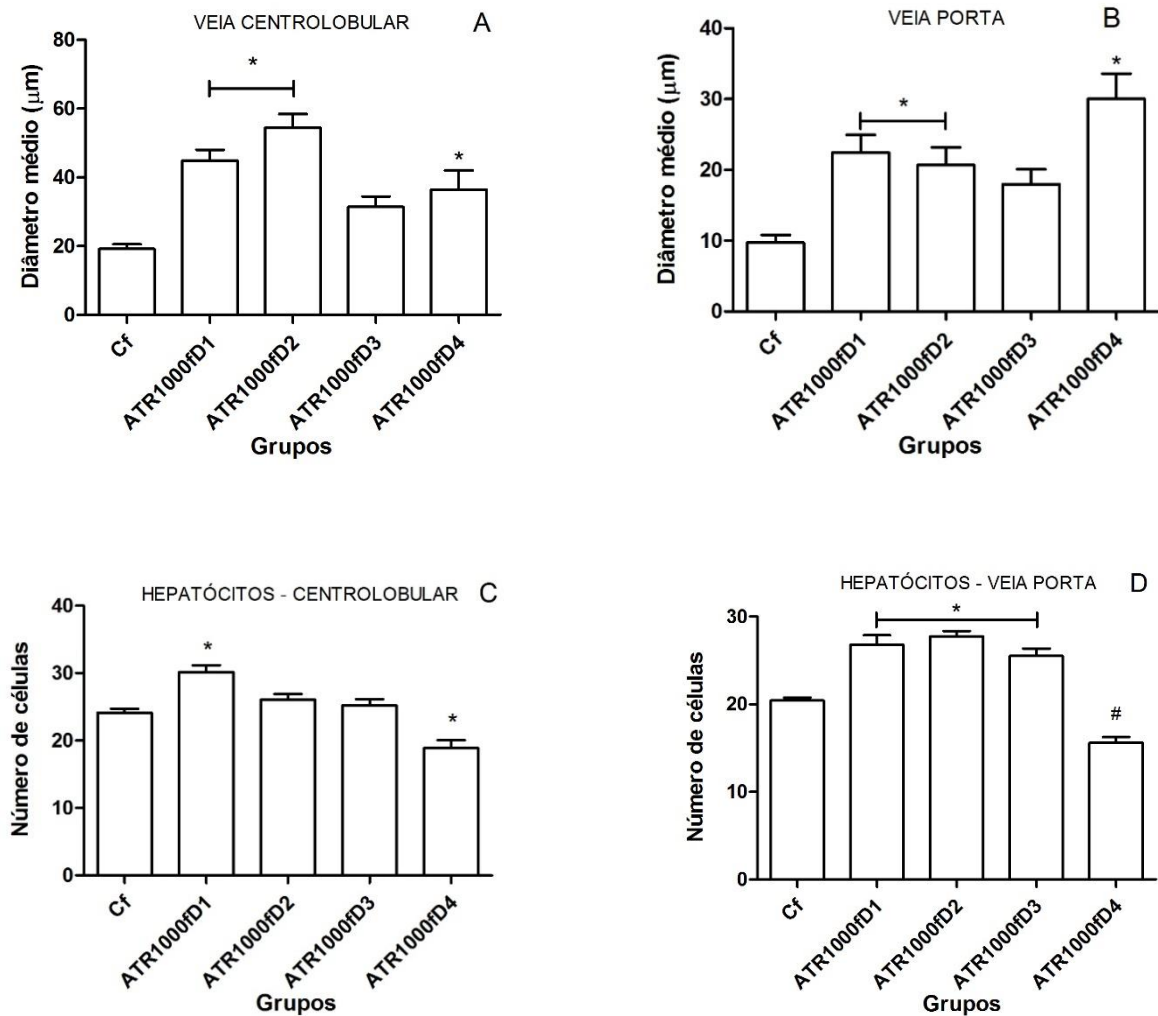
**Figura 16.** Análise histológica do corpo do estômago de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, via gavagem, por 5 dias, de atrazina na dose de 2000 mg/kg de peso corpóreo (ATR2000m), e eutanasiados no 4º ou 5º dia (D4 e D5, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. Espessura percentual média das camadas mucosa (A), número médio de células oxínticas em área de 2000  $\mu\text{m}^2$  das glândulas gástricas (B), número médio de células zimogênicas em área de 2000  $\mu\text{m}^2$  das glândulas gástricas (C), submucosa (D), muscular (E) e espessura total média da parede (F). \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



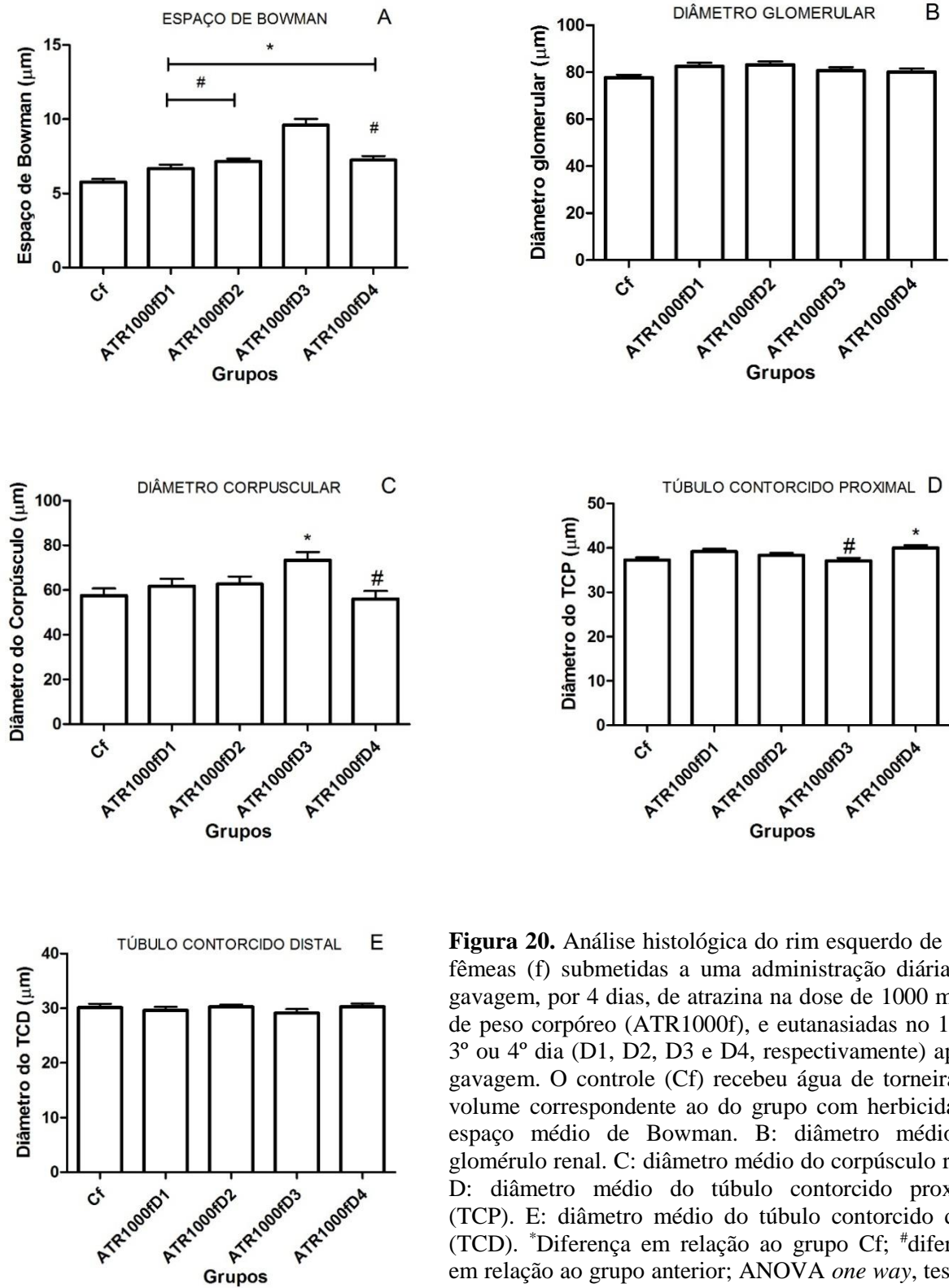
**Figura 17.** Análise histológica do fígado de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, via gavagem, por 5 dias, de atrazina na dose de 2000 mg/kg de peso corpóreo (ATR2000m), e eutanasiados no 1º, 2º, 3º, 4º ou 5º dia (D1, D2, D3, D4 e D5, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. A: diâmetro médio da veia centrolobular. B: diâmetro médio da veia porta. C: número médio de hepatócitos ativos em área de 1000 µm<sup>2</sup> próxima à veia centrolobular. D: número médio de hepatócitos ativos em área de 1000 µm<sup>2</sup> próxima à veia porta. \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



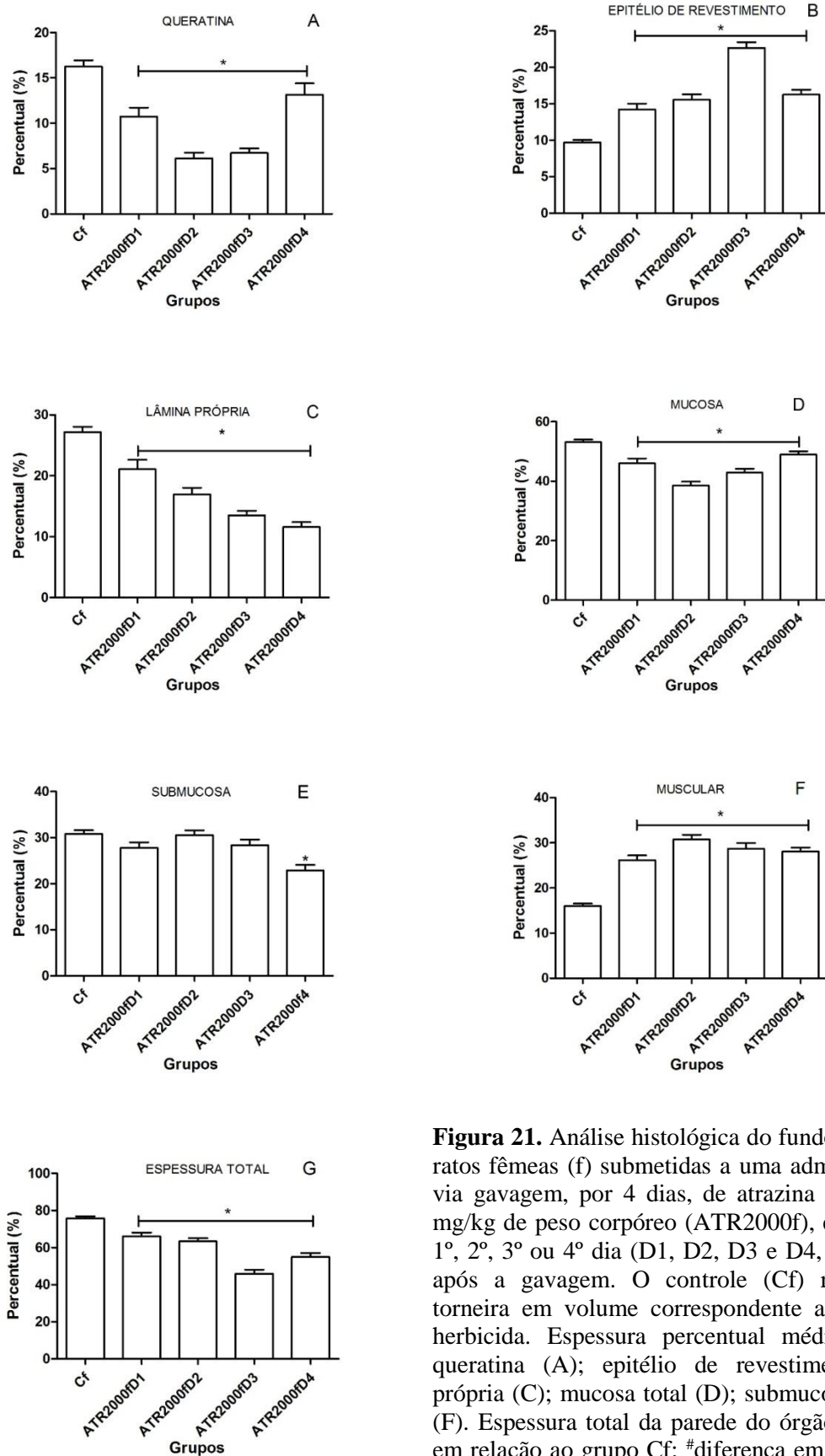
**Figura 18.** Análise histológica do rim esquerdo de ratos machos (m) submetidos a uma administração diária, via gavagem, por 5 dias, de atrazina na dose de 2000 mg/kg de peso corpóreo (ATR2000m), e eutanasiados no 1°, 2°, 3°, 4° ou 5° dia (D1, D2, D3, D4 e D5, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cm) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. A: espaço médio de Bowman. B: diâmetro médio do glomérulo renal. C: diâmetro médio do corpúsculo renal. D: diâmetro médio do túbulo contorcido proximal (TCP). E: diâmetro médio do túbulo contorcido distal (TCD). \*Diferença em relação ao grupo Cm; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



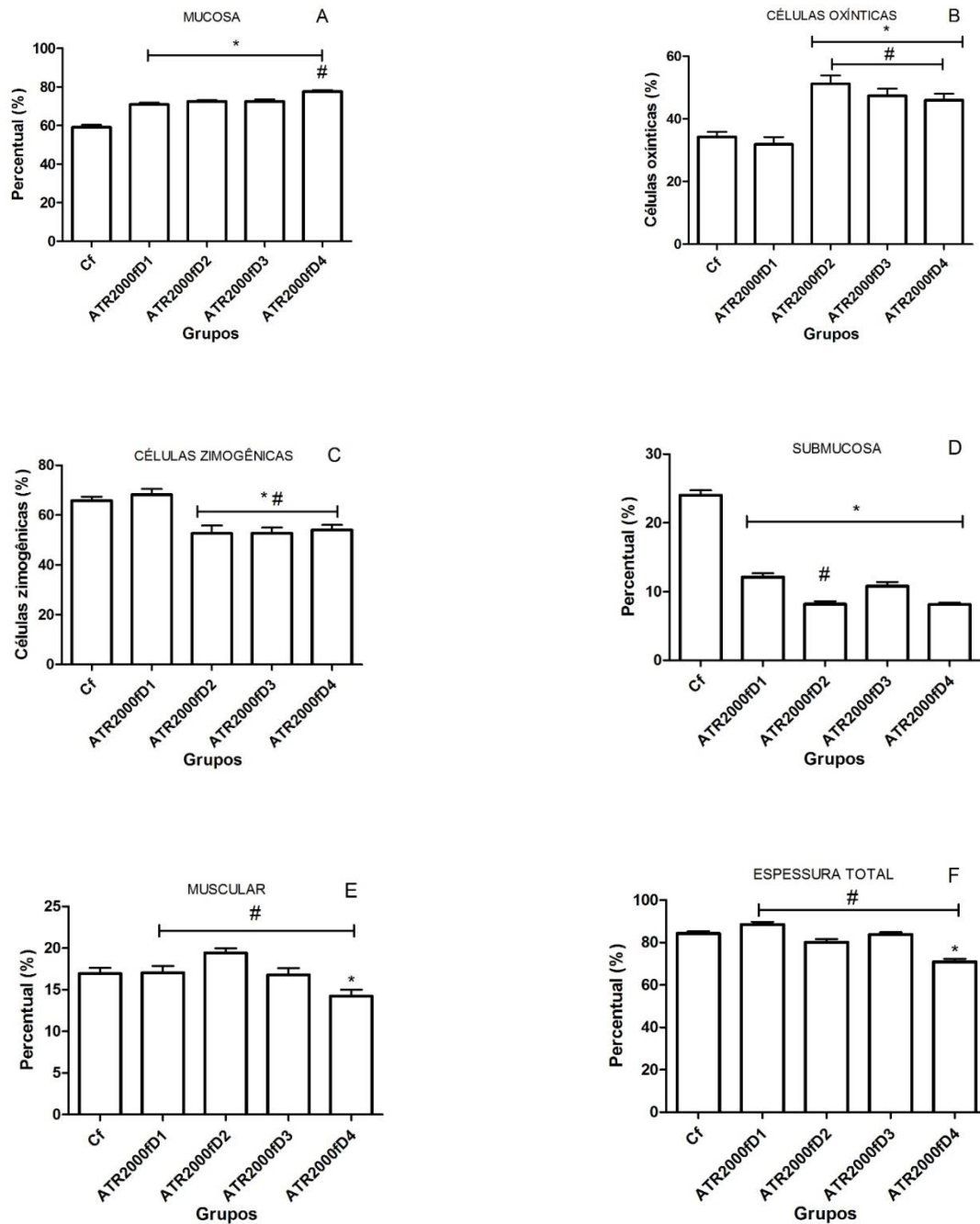
**Figura 19.** Análise histológica do fígado de ratos fêmeas (f) submetidas a uma administração diária, via gavagem, por 4 dias, de atrazina na dose de 1000 mg/kg de peso corpóreo (ATR1000f), e eutanasiadas no 1º, 2º, 3º ou 4º dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cf) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. A: diâmetro médio da veia centrolobular. B: diâmetro médio da veia porta. C: número médio de hepatócitos ativos em área de 1000 µm<sup>2</sup> próxima à veia centrolobular. D: número médio de hepatócitos ativos em área de 1000 µm<sup>2</sup> próxima à veia porta. \*Diferença em relação ao grupo Cf; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey (p<0,05).



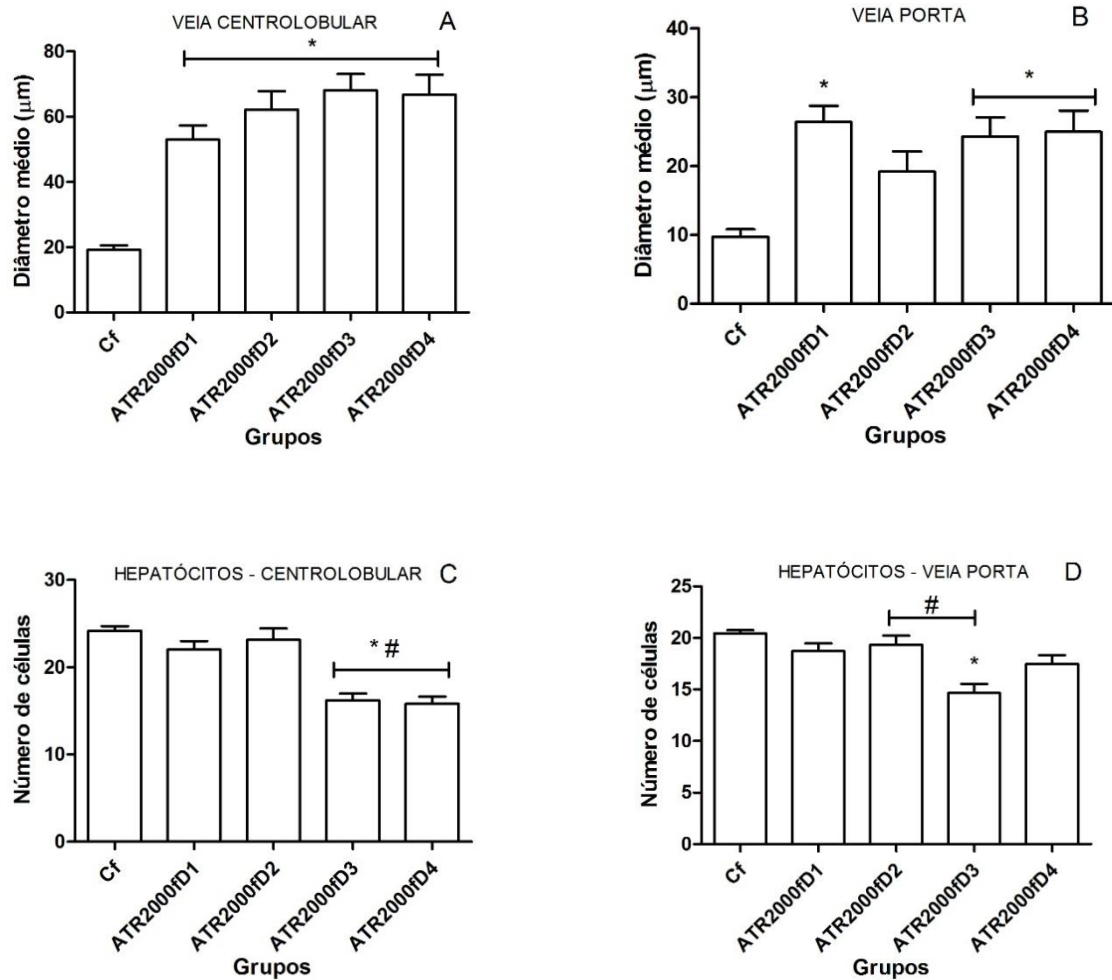
**Figura 20.** Análise histológica do rim esquerdo de ratos fêmeas (f) submetidas a uma administração diária, via gavagem, por 4 dias, de atrazina na dose de 1000 mg/kg de peso corpóreo (ATR1000f), e eutanasiadas no 1º, 2º, 3º ou 4º dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cf) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. A: espaço médio de Bowman. B: diâmetro médio do glomérulo renal. C: diâmetro médio do corpúsculo renal. D: diâmetro médio do túbulo contorcido proximal (TCP). E: diâmetro médio do túbulo contorcido distal (TCD). \*Diferença em relação ao grupo Cf; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 21.** Análise histológica do fundo do estômago de ratos fêmeas (f) submetidas a uma administração diária, via gavagem, por 4 dias, de atrazina na dose de 2000 mg/kg de peso corpóreo (ATR2000f), e eutanasiadas no 1º, 2º, 3º ou 4º dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cf) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. Espessura percentual média das camadas: queratina (A); epitélio de revestimento (B); lâmina própria (C); mucosa total (D); submucosa (E); muscular (F). Espessura total da parede do órgão (G). \*Diferença em relação ao grupo Cf; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 22.** Análise histológica do corpo do estômago de ratos fêmeas (f) submetidas a uma administração diária, via gavagem, por 4 dias, de atrazina na dose de 2000 mg/kg de peso corpóreo (ATR2000f), e eutanasiadas no 1º, 2º, 3º ou 4º dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cf) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. Espessura percentual média das camadas mucosa (A), número médio de células oxínticas em área de 2000  $\mu\text{m}^2$  das glândulas gástricas (B), número médio de células zimogênicas em área de 2000  $\mu\text{m}^2$  das glândulas gástricas (C), submucosa (D), muscular (E) e espessura total média da parede (F). \*Diferença em relação ao grupo Cf; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 23.** Análise histológica do fígado de ratos fêmeas (f) submetidas a uma administração diária, via gavagem, por 4 dias, de atrazina na dose de 2000 mg/kg de peso corpóreo (ATR2000f), e eutanasiadas no 1º, 2º, 3º ou 4º dia (D1, D2, D3 e D4, respectivamente) após a gavagem. O controle (Cf) recebeu água de torneira em volume correspondente ao do grupo com herbicida. A: diâmetro médio da veia centrolobular. B: diâmetro médio da veia porta. C: número médio de hepatócitos ativos em área de 1000 µm<sup>2</sup> próxima à veia centrolobular. D: número médio de hepatócitos ativos em área de 1000 µm<sup>2</sup> próxima à veia porta. \*Diferença em relação ao grupo Cf; #diferença em relação ao grupo anterior; ANOVA *one way*, teste de Tukey (p<0,05).