



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATARA DIAS GOMES DA SILVA

**TOXICIDADE DO GLIFOSATO E DO PRODUTO
FORMULADO ROUNDUP® PARA A LINHAGEM CELULAR
ZFL, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS
DE GOETHITA**



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



NATARA DIAS GOMES DA SILVA

**TOXICIDADE DO GLIFOSATO E DO PRODUTO
FORMULADO ROUNDUP® PARA A LINHAGEM CELULAR
ZFL, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS
DE GOETHITA**

LONDRINA - PARANÁ

2015

NATARA DIAS GOMES DA SILVA

**TOXICIDADE DO GLIFOSATO E DO PRODUTO
FORMULADO ROUNDUP® PARA A LINHAGEM CELULAR
ZFL, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS
DE GOETHITA**

Trabalho apresentado ao curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de
Londrina como requisito para obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Profª Drª Cláudia Bueno dos Reis
Martinez.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586t Silva, Natara Dias Gomes da.

Toxicidade do glifosato e do produto formulado Roundup® para a linhagem celular ZFL, na presença e ausência de nanopartículas de goethita / Natara Dias Gomes da Silva. – Londrina, 2015.
78 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2015. Inclui bibliografia.

1. Organismos aquáticos – Toxicologia – Teses. 2. Peixe – Teses. 3. Herbicidas – Teses. 4. Nanopartículas – Teses. 5. Ferro – Teses. 6. Estresse oxidativo – Teses. 7. Toxicologia genética – Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 597

NATARA DIAS GOMES DA SILVA

**TOXICIDADE DO GLIFOSATO E DO PRODUTO FORMULADO
ROUNDUP® PARA A LINHAGEM CELULAR ZFL, NA PRESENÇA E
AUSÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE GOETHITA**

Trabalho apresentado ao curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de
Londrina como requisito para obtenção do título de
Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Profª Drª Marta Marques Souza
Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Profª Drª Silvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 10 de abril de 2015.

Aos meus amados pais, Paulo e Valéria.

AGRADECIMENTOS

Não foi fácil chegar até aqui, tampouco tranquilo. Foi um longo caminho percorrido desde o processo seletivo, passando pela aprovação, cumprimento dos créditos, experimentos até a conclusão do mestrado. Esta dissertação marca o fim de uma importante etapa na minha vida. E nada mais justo do que agradecer àqueles que contribuíram de forma decisiva para que a realização desta fosse possível.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática/CNPq e à Fundação Araucária/CNPq (PRONEX - Síntese de nanocompostos de ferro objetivando a solução de problemas ambientais e de saúde animal) pelo apoio financeiro. À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Cláudia Bueno dos Reis Martinez por ter me acolhido em seu laboratório, pela atenção e paciência ao longo desses 5 anos. Obrigada por ter confiado no meu potencial, por ter me incentivado, investido e contribuído para o meu amadurecimento científico.

À Prof^a Dr^a Silvia Helena Sofia, Prof^a Dr^a Ilce Mara de Syllos Cólus e a Prof^a Dr^a Marta Marques de Souza pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho e participação nas bancas examinadoras.

Ao Prof. Dr. Dimas Augusto Morozin Zaia e a Dr^a Cristine Elizabeth Alvarenga Carneiro, pela doação da goethita e auxílio para a determinação de glifosato. Ao Wagner E. Risso pelo auxílio nas análises de ferro.

Ao tio João Costa por prontamente ter me ajudado a entender minhas análises estatísticas bem como pelas ótimas idéias e sugestões que me auxiliaram na solução de problemas.

A toda família LEFA pela amizade e pelo companheirismo. O carinho de cada um de vocês tornou essa minha trajetória mais fácil e alegre. Obrigada pela ajuda no laboratório, pelas boas risadas, pelas cantorias e pelos maravilhosos momentos que desfrutamos em churrascos, festas, confraternizações, congressos e viagens. De alguma forma levarei comigo um pedacinho de vocês e espero ter deixado boas recordações. Vocês são incríveis!

Às minhas queridas amigas e amigos da graduação pelo carinho e amor sincero. Obrigada pela força, por ter torcido e comemorado as minhas menores conquistas. Apesar da distância sempre tenho a sensação de ainda estarem aqui do meu lado. Amo vocês de todo o meu coração!

Ao meu namorado lindo Nê por ser um companheiro e amigo maravilhoso. Obrigada por enfrentar o dia a dia comigo, por me dar forças, por me aconselhar e me fazer pensar e encarar a vida de uma forma completamente diferente. Obrigada pelo seu carinho e jeitinho na hora de me acalmar todas as vezes que meus experimentos falhavam. Você sofreu junto comigo quando algo dava errado e comemorou quando eu conseguia atingir meus objetivos. Obrigada por tudo meu amor e saiba que o sucesso deste trabalho também é seu!

Aos meus queridos e amados pais Paulo e Valéria pelo amor incondicional. Obrigada por terem me proporcionado essa experiência e terem abdicado de alguns sonhos em favor dos meus. Obrigada pelo lar afetuoso, pelos ensinamentos e por me encaminharem para o caminho do bem. Vocês são os melhores pais que eu poderia ter e tudo o que eu sou hoje eu devo a vocês. O meu eterno obrigado por tudo! Amo muito vocês!

“Para ter algo que você nunca teve, é preciso fazer algo que você nunca fez.”

Francisco Cândido Xavier

DA SILVA, N. D. G. **Toxicidade do glifosato e do produto formulado Roundup® para a linhagem celular ZFL, na presença e ausência de nanopartículas de goethita.** 2015. 78 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Biodiversidade) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

RESUMO

As nanopartículas de óxido de ferro trazem importantes perspectivas na remediação ambiental, pois devido à sua grande área superficial, elas podem adsorver uma ampla variedade de contaminantes, dentre eles o glifosato. Atualmente os herbicidas à base de glifosato, como o Roundup®, representam os agrotóxicos mais utilizados no Brasil e no mundo, e devido à sua intensa utilização, esse herbicida tem grande potencial para contaminar os corpos d'água. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade do glifosato e do produto formulado Roundup® para a linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL), na presença e ausência de nanopartículas (NPs) de goethita, por meio de ensaios citotóxicos, bioquímicos e genotóxicos. Para tanto, as células ZFL foram expostas por 1, 6 e 12 h aos seguintes tratamentos: 1, 10 e 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de goethita (N₁; N₁₀; N₁₀₀); 10 mg L⁻¹ de Roundup® (RD), 3,6 mg L⁻¹ de Glifosato (Gli) e co-exposições de Roundup® (RD N₁; RD N₁₀; RD N₁₀₀) e glifosato (Gli N₁; Gli N₁₀; Gli N₁₀₀) na presença de NPs de goethita ou apenas a salina (CTR). Foram realizados ensaios de citotoxicidade, pelo teste de exclusão do azul de Tripan (AT), de redução do MTT (MTT) e de incorporação do vermelho neutro (VN), ensaios para avaliar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e capacidade antioxidante total (CAOT) e o ensaio do cometa, para avaliar a ocorrência de danos no DNA. No meio experimental N₁₀₀, tanto isolado quanto em associação com o RD e Gli, ocorreu a formação de aglomerados que provocaram alterações na morfologia das células e comprometeram a adesão celular. Apesar disso, os resultados indicaram viabilidade celular superior a 90%, através do teste AT. O teste do MTT mostrou redução do metabolismo mitocondrial das células ZFL após 6 h de exposição aos meios N₁ e N₁₀ e a todos os meios contendo RD, enquanto o teste do VN indicou redução da atividade lisossomal das células expostas, por 6 h, aos meios N₁, N₁₀ e RD N₁₀, e aumento desta atividade nas células expostas a todos os meios contendo NPs, por 1 h, e ao meio N₁₀₀ por 6 h. Verificou-se aumento na produção de ERO apenas nas células ZFL expostas ao meio RD N₁₀₀ por 6 h, e aumento da CAOT nas células expostas por 1 h aos meios RD N₁, RD N₁₀₀ e Gli N₁₀. O teste do cometa mostrou resultados mais expressivos, que indicaram aumento de danos no DNA das células ZFL expostas aos meios N₁ e N₁₀ por 1 h e N₁₀ e N₁₀₀ por 6 h, a todos os meios contendo RD por 1 h, aos meios RD e RD N₁₀₀ por 6 h e aos meios RD N₁, RD N₁₀ e RD N₁₀₀ por 12 h. Estes resultados mostram que o glifosato não causa efeitos tóxicos para a linhagem ZFL e tampouco sua associação com as diferentes concentrações de NPs de goethita. Entretanto, foi verificado que o produto formulado promove efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células ZFL, que não são revertidos na presença de goethita e que a presença das NPs intensifica a citotoxicidade e a genotoxicidade desta associação, inclusive para o maior tempo de exposição. Assim, este trabalho contribui para o conhecimento dos efeitos tóxicos gerados por nanopartículas de óxido de ferro e, segundo o modelo *in vitro*, sugere que sua utilização em programas de remediação ambiental deve ser feita com cautela.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Estresse oxidativo. Genotoxicidade. Nanotoxicologia. Óxido de ferro. Testes *in vitro*.

DA SILVA, N. D. G. **Toxicity of glyphosate and Roundup® in ZFL cell line, in the presence and absence of goethite nanoparticles.** 2015. 78 p. Dissertation (Master Degree in Biological Science) – State University of Londrina, Londrina, Paraná.

ABSTRACT

The iron oxide nanoparticles bring significant benefits in environmental remediation, because due to its large surface area, they can adsorb a wide variety of contaminants, including glyphosate. Currently, the glyphosate-based herbicides, as Roundup®, representing the pesticides most commonly used in Brazil and in the world, and because of its intensive use, this herbicide has great potential to contaminate water bodies. In this context, the aim of this study was to evaluate the toxicity of glyphosate and formulated product Roundup® in the hepatocyte cell line of *Danio rerio* (ZFL), in the presence and absence of goethite nanoparticles (NPs) through cytotoxic, biochemical and genotoxic assays. Therefore, the ZFL cells were exposed for 1, 6 and 12 h to the following treatments: 1, 10 and 100 mg L⁻¹ goethite nanoparticles (N₁, N₁₀, N₁₀₀); 10 mg L⁻¹ Roundup® (RD), 3.6 mg L⁻¹ Glyphosate (Gly) and co-exposure of Roundup® (RD N₁, N₁₀ RD, RD N₁₀₀) and glyphosate (Gly N₁, Gly N₁₀; Gly N₁₀₀) in the presence of goethite NPs or saline only (CTR). Cytotoxicity assays were performed by exclusion method Trypan blue (TB), MTT reduction (MTT) and incorporation of neutral red (VN), assays to evaluate their generation of reactive oxygen species (ROS) and total antioxidant capacity (CAOT) and the comet assay to assess the damage to the DNA. In N₁₀₀ experimental medium, either alone or in association with RD and Gly, has occurred formation of clusters that caused changes in cell morphology and committed the cell adhesion. Despite this, the results showed cell viability greater than 90%, by test AT. The MTT test showed a reduction on ZFL mitochondrial metabolism after 6 h of exposure to N₁ and N₁₀ medium and all medium containing RD, while the VN test showed a reduction on ZFL lysosomal activity exposed for 6 h, to the N₁, N₁₀ and RD N₁₀ medium, and increase this activity in exposed to all medium containing NPs, for 1 h, and to the N₁₀₀ for 6 h. An increase in ZFL ROS generation only exposed to the medium RD N₁₀₀ for 6 h and CAOT increased in cells exposed for 1 h to medium RD N₁, RD N₁₀₀ and Gly N₁₀. The comet assay showed more significant results, which indicated an increase on ZFL DNA damage exposed to N₁ and N₁₀ medium for 1 h and N₁₀ and N₁₀₀ for 6 h, to all medium containing RD for 1 h, to RD and RD N₁₀₀ medium for 6 h and to medium RD N₁, RD N₁₀ and RD N₁₀₀ for 12 h. These results demonstrate that glyphosate causes no toxic effects on ZFL neither its association with different concentrations of goethite NPs. However, it was found that the formulated product promotes cytotoxic and genotoxic effects on ZFL, which are not reversed in the presence of goethite and the presence of these NPs enhances the cytotoxicity and genotoxicity of this association, including for the longer exposure time. This work contributes to the knowledge of the toxic effects caused by iron oxide nanoparticles and, according to the *in vitro* model, suggests that their use in environmental remediation programs must be done with caution.

Keywords: Cytotoxicity. Genotoxicity. *In vitro* assays. Iron oxide. Nanotoxicology. Oxidative stress.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	12
2.	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	22
3.2	PREPARO DAS SUBSTÂNCIAS TESTE	22
3.3	PREPARO DAS CÉLULAS E EXPOSIÇÕES	24
3.4	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	25
3.5	ENSAIOS BIOQUÍMICOS - GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAOT)	27
3.6	ENSAIO DE GENOTOXICIDADE - ENSAIO DO COMETA VERSÃO ALCALINA	28
3.7	QUANTIFICAÇÃO DE FERRO E GLIFOSATO	30
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
4.	MANUSCRITO	32
4.1	INTRODUÇÃO.....	34
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.2.1	Linhagem Celular ZFL.....	35
4.2.2	Substâncias Teste	36
4.2.3	Exposições In Vitro	36
4.2.4	Ensaio de Citotoxicidade	37
4.3	RESULTADOS.....	41
4.3.1.	Quantificação de Ferro	41
4.3.2.	Quantificação de Glifosato	41
4.3.4.	Ensaio do AT	43
4.3.5.	Ensaio do MTT.....	43
4.3.6.	Teste do VN.....	46
4.3.7.	Geração de ERO	48
4.3.8.	Capacidade antioxidante total (CAOT).....	50

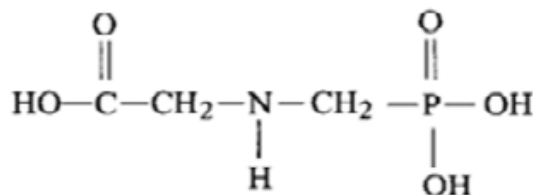
4.3.9.	Ensaio do Cometa.....	52
4.4	DISCUSSÃO.....	46
	Agradecimentos	61
	Referências	61
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
6.	REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de agrotóxicos cresce a cada ano. Estudos apontam que nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, enquanto o mercado brasileiro destes produtos cresceu 190% (ANVISA e UFPR, 2012). Dentre a variedade de agrotóxicos, os herbicidas são o grupo mais utilizado em todo mundo, visto a sua eficácia contra plantas invasoras (Queiroz et al., 2011; IBAMA, 2013).

Atualmente, merecem destaque os herbicidas que apresentam como ingrediente ativo o glifosato, o qual ocupa o primeiro lugar no ranking de comercialização de herbicidas no Brasil, sendo os estados do Mato Grosso e Paraná os maiores consumidores deste ingrediente ativo (IBAMA, 2013). O glifosato foi originalmente sintetizado em 1950, mas apenas em 1971 sua propriedade como herbicida foi descoberta (Toni et al., 2006; Yamada e Castro, 2007). O glifosato [N-(fosfometil)glicina], $C_3H_8NO_5P$, é pós-emergente e não seletivo (Amarante et al., 2002; Coutinho e Mazo, 2005), muito utilizado em diversas culturas, como soja, trigo, milho, algodão, feijão e arroz (Queiroz et al., 2011). Em sua estrutura (Fig. 1), o glifosato apresenta três grupos funcionais: amina, carboxil e fosfato e, em condições ambientais, este composto é solúvel em água e quase insolúvel em solventes orgânicos.

Figura 1 – Fórmula estrutural do glifosato



Williams et al., 2000.

Na planta, uma vez absorvido, o glifosato inibe a ação da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs), a qual é de fundamental importância para a síntese de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, a tirosina e o triptofano (Jaworski, 1972; Zablutowicz e Reddy, 2004). Esses aminoácidos são essenciais para a síntese protéica e servem de substrato para a produção de compostos secundários, os quais podem ser afetados quando a planta é atingida pelo glifosato (Yamada e Castro, 2007). Devido à sua eficácia, este herbicida vem sendo amplamente utilizado no controle de plantas invasoras, tanto na agricultura quanto para o uso doméstico (Solomon e Thompson, 2003). Nos animais como mamíferos, peixes, aves, répteis e insetos sua toxicidade é baixa (EPA, 1993; WHO, 1994;

EC, 2002), visto que essa via bioquímica não ocorre; no entanto, alguns autores sugerem uma maior toxicidade dos produtos formulados à base de glifosato como, por exemplo, o Roundup® (Amarante et al., 2002; Tsui e Chu, 2003; Howe et al., 2004).

O Roundup® (Fig. 2) aparece como uma das formulações a base de glifosato mais populares em todo o mundo e, além do glifosato como ingrediente ativo, apresenta o surfactante polioxietileno amina (POEA), o qual parece estar relacionado com o aumento da toxicidade do produto (Amarante et al., 2002; Tsui e Chu, 2003; Howe et al., 2004). Devido à sua intensa utilização, este herbicida pode ser detectado em diferentes compartimentos ambientais, levando à contaminação do solo, assim como das águas superficiais e subterrâneas, principalmente através de processos como escoamento superficial e lixiviação (Giesy et al., 2000). Queiroz et al. (2011) mostraram que o transporte de glifosato pela lixiviação foi cerca de nove vezes superior ao transporte por escoamento superficial, quando um solo agrícola foi submetido à simulação de chuva, demonstrando o risco do glifosato para águas subterrâneas.

Figura 2 – Composição do herbicida Roundup® à base de glifosato.

BROU 20/1206-00



MONSANTO 

**REGISTRADO NO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA SOB Nº 00898793**

COMPOSIÇÃO:

Sal de Isopropilamina de N - (fosfometil) glicina	480 g/L (48,0% m/v)
Equivalente ácido de N - (fosfometil) glicina	
(GLIFOSATO).....	360 g/L (36,0% m/v)
Ingredientes Inertes	684 g/L (68,4% m/v)

Fonte: Bula Roundup®, Monsanto.

No Brasil, existem alguns estudos que reportam a presença do glifosato em amostras de águas superficiais, porém as concentrações encontradas são bem variadas. No estado do Rio Grande do Sul, o glifosato foi detectado em 46,7% das amostras de água analisadas de um rio, e a maioria destas amostras apresentava concentrações de 20 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Silva et al., 2003). No estado de São Paulo, amostras de águas superficiais da bacia do Rio Corumbataí foram avaliadas quanto à concentração de glifosato, porém este composto não foi detectado em níveis quantificáveis, ocorrendo em concentrações inferiores a 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Armas et al., 2007).

De acordo com a resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA,

2005), a qual estabelece as diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, o limite máximo de glifosato para águas doces destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional e à proteção das comunidades aquáticas, recreação de contato primário (natação, esqui aquático e mergulho), irrigação (hortaliças, parques, jardins, etc) e aquicultura e atividade de pesca (classes 1 e 2) é de $65 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que para águas doces destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado, à pesca amadora e dessedentação de animais (classes 3 e 4) é de $280 \mu\text{g L}^{-1}$.

Assim, apesar dos estudos de Silva et al. (2003) e Armas et al. (2007) indicarem a presença do glifosato nas amostras analisadas, as concentrações encontradas foram menores do que o padrão regulamentado pelo CONAMA (2005). No entanto, diante do aumento no consumo de herbicidas à base de glifosato no Brasil, cresce a preocupação sobre os efeitos tóxicos deste composto sobre a saúde humana e de outros organismos.

Os organismos aquáticos, como peixes e invertebrados, podem ser sensíveis a este ingrediente ativo, bem como aos outros componentes de seu produto formulado, uma vez que esses compostos podem se bioacumular ou se adsorver ao material em suspensão e ser ingerido por estes organismos (Amarante et al., 2002). Segundo Giesy et al. (2000), a meia vida do glifosato em ambientes aquáticos varia de 7 a 14 dias, podendo ser considerado um potencial contaminante nestes ambientes.

Assim, dado seu potencial de contaminação dos corpos d'água, é de suma importância avaliar os riscos ambientais do glifosato e do produto formulado Roundup[®], a fim de prevenir impactos prejudiciais em seres vivos.

De acordo com Costa et al. (2008), a sobrevivência do homem depende diretamente do bem-estar de outras espécies e da disponibilidade de ar, água, solo e alimentos limpos. Dessa forma, é importante buscar formas de amenizar a contaminação dos corpos hídricos e dos organismos que dependem desses ecossistemas. Neste contexto, a nanotecnologia traz importantes perspectivas na remediação de ambientes contaminados por resíduos ou substâncias químicas provenientes de atividades antropogênicas.

A expansão da nanotecnologia resultou no desenvolvimento de uma gama de novos materiais em escala nanométrica (Franchi et al., 2012). A nanotecnologia envolve manipulação e aplicação de partículas e sistemas projetados com dimensões extremamente pequenas, da ordem de um a cem nanômetros (NRC, 2002; Quina, 2004; Biswas e Wu, 2005; Hoyt e Mason, 2008; Paschoalino et al., 2010). Em outras palavras, é a possibilidade de manipular a matéria conscientemente, permitindo criar características físicas e químicas

únicas que englobam propriedades benéficas superando as de substâncias tradicionais (Ferrari, 2005).

Por apresentarem uma grande área superficial, materiais em escala nanométrica podem exibir um incremento em propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas, catalíticas ou químicas, sendo sua utilização benéfica para diversos setores como alimentício, eletrônico, farmacêutico, biotecnológico, cosmético, médico-hospitalar e agrícola (Quina, 2004; Ferrari, 2005; Paschoalino et al., 2010). Assim, cada vez mais presente para fins comerciais, a nanotecnologia tem recebido altos investimentos em pesquisa e desenvolvimento, demonstrando o grande potencial desta tecnologia (Roco, 2003; Hoyt e Mason, 2008; Paschoalino et al., 2010).

Além de abranger diversos setores da economia, a nanotecnologia oferece ainda grandes perspectivas no que diz a respeito à preservação do meio ambiente (Biswas e Wu, 2005). O uso de nanomateriais catalíticos, por exemplo, aumenta a eficácia de processos industriais resultando em um aproveitamento eficiente das matérias primas e, portanto, diminuindo a produção de resíduos indesejáveis (Quina, 2004).

Devido à sua grande área superficial, as nanopartículas também podem ser excelentes ferramentas para a remediação da poluição, uma vez que apresentam propriedades de adsorção a metais e substâncias orgânicas, como também podem auxiliar no tratamento de efluentes industriais, de água e solos (Quina, 2004; Li et al., 2006; Paschoalino et al., 2010). Ainda, é possível utilizar os nanomateriais para a detecção e monitoramento de poluentes orgânicos e inorgânicos no meio ambiente (Quina, 2004).

Dentre os diversos nanomateriais produzidos, grande atenção tem sido dada às nanopartículas (NPs) de ferro por suas propriedades magnéticas, sua utilidade e aplicação no tratamento das águas por meio da remediação de poluentes e bactérias, e sua baixa toxicidade em relação a outros nanomateriais (Kharisov et al., 2012). Pesquisas realizadas nas últimas duas décadas têm demonstrado a eficiência de nanomateriais de ferro para a remoção de uma grande variedade de contaminantes presentes na água, como por exemplo, bactérias, produtos organoclorados, corantes, contaminantes emergentes, metais, radionuclídeos e vírus (Li et al., 2006; Kharisov et al., 2012). Estas NPs também estão sendo usadas para eliminação de certas substâncias inorgânicas e orgânicas das águas subterrâneas, sedimentos e solos, isso porque elas reagem de forma efetiva com uma escala ampla de contaminantes ambientais (Kharisov et al., 2012; Liu et al., 2014).

Neste contexto, as NPs de ferro são consideradas como promissoras ferramentas adsorventes para remover contaminantes de sistemas aquáticos poluídos, funcionando

simultaneamente como um adsorvente e um agente redutor, causando uma quebra nos contaminantes orgânicos em cadeias simples de carbonos que são menos tóxicos (Kharisov et al., 2012). Para o tratamento de resíduos, alguns processos de adsorção têm utilizado a ferrita e uma variedade de minerais ferrosos como a akaganeita, feroxihita, ferrihidrita, goethita, hematita, lepidocrocita, maghemita e magnetita (Tiwari et al., 2008), os quais apresentam diferentes colorações, variando do amarelo ao marrom escuro (Fig. 3).

A goethita (α -FeOOH) é o óxido de ferro mais estável termodinamicamente, apresenta coloração amarelada (Fig. 3) e tem sido extensivamente pesquisada quanto à sua estrutura, sua capacidade de adsorção e seu potencial de aplicação na proteção do meio ambiente (Cornell e Schwertmann, 2003). Este mineral pode funcionar como adsorvente e/ou catalisador para os contaminantes, especialmente para cátions e substâncias orgânicas, como o glifosato e, geralmente, a adsorção dos compostos orgânicos pela goethita ocorre por ligações iônicas (Liu et al., 2014).

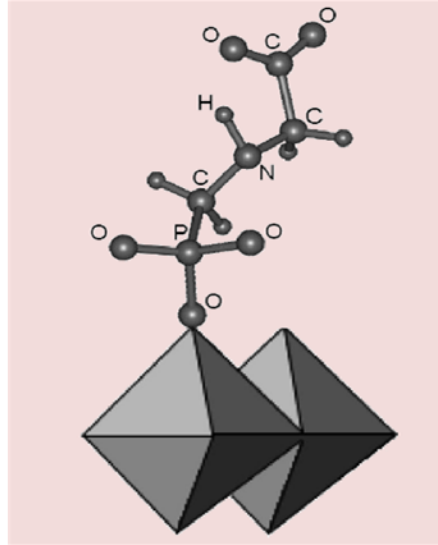
Figura 3 – Coloração dos diferentes tipos de óxidos de ferro



(Modificado de Schwertmann e Cornell, 2000).

Alguns trabalhos reportam a grande capacidade da goethita para adsorção do glifosato que resulta da formação de complexos na superfície da goethita, diretamente dependente do pH (McConnell e Hossner, 1985; Sheals et al., 2002; Barja e dos Santos Afonso, 2005; Pessagno et al., 2008). O glifosato forma predominantemente complexos monodentados na superfície da goethita que estão ligados através do grupo fosfato, enquanto que o grupo carboxil permanece “livre” da complexação com a goethita (Fig. 4), ficando sujeito a degradação e/ou complexação com outros íons metálicos presentes no solo (Sheals et al., 2002).

Figura 4 – Estequiometria e estrutura do complexo superficial glifosato-goethita baseado em resultados de espectroscopia infravermelha e de raios-X



(Sheals et al., 2002).

Assim, tendo em vista o potencial de adsorção da goethita, sua utilização na remediação de ambientes aquáticos impactados por contaminantes orgânicos se mostra uma alternativa eficaz. No entanto, até o presente momento, não há trabalhos avaliando respostas biológicas frente à exposição a essas NPs de ferro e, portanto, seus impactos toxicológicos permanecem pouco compreendidos.

Neste cenário, a Ecotoxicologia Aquática vem contribuindo na avaliação dos efeitos das substâncias químicas sobre os organismos aquáticos, permitindo que seus possíveis efeitos tóxicos ou alterações sejam detectados com certa antecedência e em baixos níveis de organização biológica, possibilitando a identificação de problemas antes que o ambiente seja afetado como um todo (Cajaraville et al., 2000; Jonsson e Castro, 2005; Costa et al., 2008). Ainda, testes de toxicidade com organismos aquáticos possibilitam o desenvolvimento de protocolos que auxiliam na definição de limites de toxicidade permissíveis, os quais podem servir de guia para as agências reguladoras na tomada de decisões (Zagatto, 1998).

Para a avaliação da qualidade do ecossistema aquático, diferentes biomarcadores são utilizados para sinalizar as mudanças associadas à presença de contaminantes (Van Der Oost et al., 2003). Um biomarcador eficiente deve apresentar boa sensibilidade, boa reprodutibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (Freire et al., 2008). Ainda, faz-se necessário o uso de mais de um biomarcador para a avaliação do ambiente aquático, uma vez que um único indicador pode não refletir o real efeito do contaminante em questão (Freire et al., 2008).

Biomarcadores baseados em respostas ao nível molecular ou celular indicam os primeiros sinais de perturbação ambiental (Cajaraville et al., 2000; Fontainhas-Fernandes, 2005; Nigro et al., 2006). Portanto, esses biomarcadores podem ser usados de maneira a antecipar possíveis mudanças nos níveis mais altos de organização biológica, tornando uma ferramenta sensível e importante em programas de monitoramento e proteção ambiental (Monserrat et al., 2003; Jesus e Carvalho, 2008).

Além disso, os biomarcadores celulares podem fornecer informações importantes sobre os mecanismos específicos de ação dos contaminantes associados à sua citotoxicidade (Bols et al., 2005). A necessidade de testes de citotoxicidade de confiança levou ao desenvolvimento de vários ensaios que são rotineiramente utilizados para detectar efeitos citotóxicos em sistemas *in vitro* (Bopp e Lettieri, 2008).

O método de exclusão pelo azul de Tripán consiste na incorporação deste corante por células que apresentam um comprometimento da membrana celular. Em contrapartida, células viáveis, cuja membrana está íntegra, bloqueiam a entrada do corante. Desta forma, células inviáveis coram-se de azul e as viáveis ficam transparentes. É importante ressaltar que essa metodologia detecta células inviáveis que possuem danos na membrana celular, mas pode não detectar células inviáveis cujos danos afetam a adesão celular ou que podem progredir para a morte celular (McAteer e Davis, 1994 apud Ribeiro et al., 2003).

Outro ensaio de citotoxicidade amplamente utilizado é o método de redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Neste ensaio, o MTT é reduzido a cristais de formazana por células viáveis, pela ação da succinato desidrogenase mitocondrial – enzima presente na membrana interna das mitocôndrias (Mosmann, 1983). O produto formado, de cor púrpura, é insolúvel em água e pode ser extraído das células através da adição de um solvente apropriado: o dimetil sulfoxido ou DMSO. Assim, qualquer alteração no metabolismo mitocondrial poderá promover um aumento ou uma diminuição na redução do sal de MTT, o qual é quantificado espectrofotometricamente (Bols et al., 2005).

Ainda, a citotoxicidade de substâncias químicas pode ser avaliada por meio do ensaio do Vermelho Neutro (VN), que se baseia na incorporação do corante (VN) pelos lisossomos de células viáveis, depois de sua incubação com compostos tóxicos químicos. O corante, que é fracamente catiônico, penetra nas membranas das células por difusão não iônica e se liga intracelularmente na matriz dos lisossomos (Repetto et al., 2008). Apenas os lisossomos de células saudáveis conseguem reter o vermelho neutro e em células em que a integridade da membrana lisossomal foi prejudicada, por exemplo, por exposição a substâncias químicas, a retenção do corante vermelho neutro não acontece (Svendsen et al., 2004).

Por sua vez, os biomarcadores bioquímicos são importantes porque envolvem as enzimas responsáveis pela detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, as de defesa antioxidante e os marcadores de danos oxidativos (Zagatto, 2006). As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas eletricamente instáveis, como o ânion radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil ($\bullet OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo potencialmente reativas com todo o tipo de biomoléculas (Manduzio et al., 2005; Lushchak, 2011). Para prevenir e impedir prejuízos causados pelas ERO, organismos aeróbicos apresentam mecanismos de defesa antioxidante (Martinez, 2006; Modesto e Martinez, 2010a; Cavalcante et al., 2014). Quando o sistema de defesa antioxidante é insuficiente no combate às ERO, institui-se um desequilíbrio pró-oxidante, também denominado estresse oxidativo, podendo resultar em danos teciduais e celulares, como a degradação de proteínas, lipídios de membrana e danos ao genoma (Montserrat et al., 2007; Lushchak, 2011).

Por fim, os biomarcadores genéticos detectam compostos com potencial de causar danos no DNA dos organismos. Essas substâncias podem agir diretamente, através de rupturas na cadeia de DNA, modificações nos nucleotídeos, produzir aberrações cromossômicas e mutações de ponto, alterando a estrutura do DNA (Frenzilli et al., 2004). Os recentes avanços na genética toxicológica resultaram em uma variedade de metodologias que podem ser usadas para avaliar o impacto de agentes potencialmente genotóxicos aos organismos (Lyons et al., 1997; Bickham et al., 2000; Jha, 2004). Dentre elas pode-se citar o ensaio do cometa: a versão mais empregada deste ensaio é a versão alcalina, na qual se realiza a eletroforese em pH maior que 13,0, desnaturando o DNA, e podendo detectar quebras de fitas simples e duplas, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão incompletos e as ligações cruzadas (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). Esta versão é a mais abrangente, pois além de detectar os danos diretos torna possível a avaliação de danos indiretos, como lesões por metilação e adutos, os quais sendo álcali-lábeis expressam-se com quebras simples frente ao tratamento alcalino (Tice et al., 2000). Como vantagens de sua utilização, o ensaio do cometa apresenta uma alta sensibilidade para detecção de danos no DNA, necessita de um número pequeno de células por amostra, é de baixo custo e fácil aplicação (Tice et al., 2000).

Ainda, na perspectiva da contaminação aquática, o uso de organismos biomonitores é extremamente importante, pois a sua utilização é capaz de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes (Adams, 2002). Dessa maneira, para a realização dos testes de toxicidade, os peixes são largamente usados como modelos biológicos, uma vez que avaliando a saúde destes, podemos avaliar a saúde do ambiente aquático, assim como o potencial risco para os seres humanos (Bols et al., 2005).

Um exemplo de organismo aquático muito utilizado em estudos ecotoxicológicos é o peixe-paulistinha ou zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) (Bopp et al., 2006; Sandrini et al., 2009). Esse peixe é utilizado tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro*, com o desenvolvimento de linhagens de cultura celular de diferentes tecidos, como fígado e gônadas (Bopp et al., 2006; Bopp e Lettieri, 2007; Fent, 2007). Até o momento, são disponíveis comercialmente seis linhagens celulares de *Danio rerio*: ZF4, PAC2 e ZEM2, de origem embrionária; AB.9 e SJD.1, de fibroblastos obtidos a partir da nadadeira caudal; e ZFL, obtido a partir de um *pool* de 10 fígados do peixe zebrafish adultos (Ruyra et al., 2015).

Na última década, estudos *in vitro* tiveram um crescimento importante na Toxicologia. Isso porque sistemas *in vitro* fornecem informações básicas sobre a natureza dos agentes testados e/ou da resposta celular, além de apresentarem vantagens em relação aos estudos *in vivo* (Fent, 2007; Binelli et al., 2009). Dentre essas vantagens podemos citar a facilidade, boa reprodutibilidade na obtenção de resultados e redução no número de animais para experimentação ou até mesmo a substituição destes (Bols et al., 2005; Fent, 2007). Adicionalmente, os estudos *in vitro* fornecem melhor entendimento sobre os mecanismos de ação das diversas substâncias testadas em nível molecular e celular, uma vez que com o uso das linhagens celulares as condições podem ser controladas e isoladas de múltiplos sistemas fisiológicos, os quais integram e regulam animais inteiros (Castaño et al., 2003).

No entanto, a limitação de se trabalhar com linhagens celulares de peixes reside na sua menor sensibilidade em relação ao peixe utilizado em ensaios *in vivo*, dificultando a extrapolação direta dos resultados obtidos *in vitro* para o modelo *in vivo*, bem como a determinação de níveis ambientalmente seguros dos produtos químicos (Davila et al., 1998; Castaño et al., 2003). Apesar desta limitação, o uso de linhagens celulares de peixe é bastante promissor e desempenha um papel importante na pesquisa toxicológica, servindo de modelo para estudar os mecanismos celulares de toxicidade de diferentes contaminantes ambientais.

2. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer os efeitos citotóxicos, bioquímicos e genotóxicos das nanopartículas (NPs) de goethita, do glifosato e do produto formulado Roundup[®] para a linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) e avaliar a interferência do nanomaterial nos efeitos destes herbicidas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a viabilidade celular, a produção de espécies reativas de oxigênio, a capacidade antioxidante total e a ocorrência de danos no DNA nas células ZFL expostas a diferentes concentrações de NPs de goethita;
- Avaliar os mesmos parâmetros citotóxicos, bioquímicos e genotóxicos nas células ZFL expostas ao glifosato e ao Roundup[®], na presença e ausência de NPs de goethita;
- Comparar os efeitos produzidos pelo glifosato e pelo produto formulado Roundup[®] nas células ZFL;
- Verificar se esses efeitos são modificados na presença de NPs de goethita.

3. MATERIAL E MÉTODOS

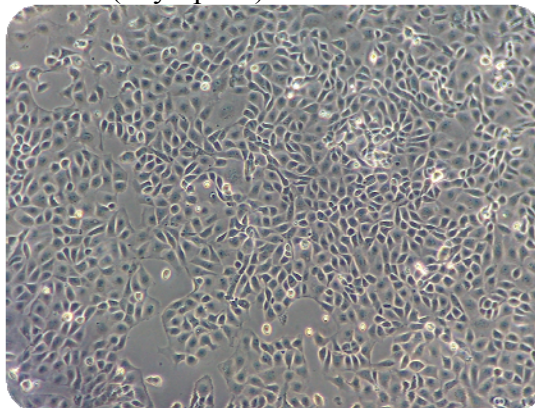
3.1. MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

A linhagem celular ZFL utilizada nesse estudo foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). Esta linhagem celular foi criada em 1992, a partir de um *pool* de cerca de 10 fígados do peixe *Danio rerio* (zebrafish) adultos, e exibem algumas propriedades características de células do parênquima hepático (Fig. 5).

A linhagem celular de hepatócitos (ZFL) foi cultivada em frascos de cultura celular de 25 cm², nos quais foram adicionados 5 mL de meio de cultura, composto por 50% de meio Leibovitz L-15 (Gibco[®]), 40% de meio RPMI 1640 (Gibco[®]) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco[®]). Os frascos foram mantidos em estufa sem adição de CO₂ a 28°C.

Como essa linhagem apresenta um ciclo celular de 72 h, as células foram verificadas diariamente quanto à morfologia celular e presença/ausência de contaminação, com troca de meio de cultura a cada 2 dias. As células foram cultivadas em monocamadas nos frascos de cultura e, quando essas começaram a se sobrepor, foi realizado o procedimento de repique celular para manter boas condições de proliferação. Para controle interno, cada repique celular realizado foi considerado uma passagem ou uma nova geração, de modo que todos os experimentos utilizando ZFL neste trabalho apresentaram um intervalo de 3 a 15 passagens.

Figura 5 – Visualização da linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) em microscópio invertido (Olympus[®]). Aumento: 40x.



Fonte: a autora.

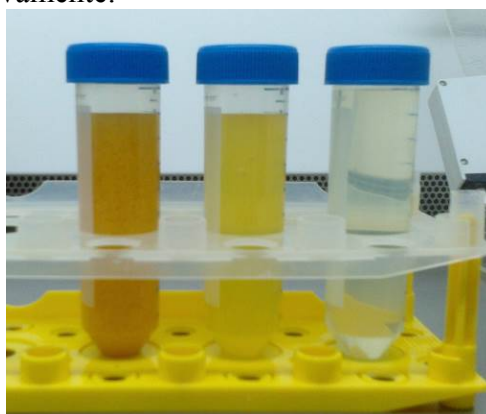
3.2. PREPARO DAS SUBSTÂNCIAS TESTE

Nanopartículas de goethita (NPs)

As nanopartículas de goethita foram fornecidas pelo Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina. Para o seu preparo uma solução de KOH ($2,5 \text{ mol.L}^{-1}$) foi misturada com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ($0,15 \text{ mol.L}^{-1}$) em recipiente plástico. A mistura foi agitada vigorosamente até sua completa homogeneização e, posteriormente, esta solução permaneceu em estufa a 70°C por 60 h. O precipitado formado foi filtrado e disperso em HNO_3 ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$) para lavagem do material. Esse procedimento foi repetido 5 vezes. Ao final das lavagens com HNO_3 , o material foi lavado 3 vezes em água ultra pura (Schwertmann e Cornell, 2000). Após essas etapas, o material foi disperso em água ultra pura e sonicado para posterior quantificação das NPs de goethita por peso seco (NPs = $35,55 \text{ g L}^{-1}$) e a quantificação da concentração de ferro ($\text{Fe} = 17,19 \text{ g L}^{-1}$), em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA – Analyst 700, Perkin Elmer[®], EUA) pelo método de leitura em chama. Posteriormente, essa solução foi autoclavada (solução estoque).

Como há carência de dados reportando efeitos referentes às nanopartículas de goethita, a escolha das concentrações para o presente trabalho foi baseada em resultados encontrados na literatura para NPs de diferentes óxidos de ferro (Karlsson et al., 2008; Singh et al., 2010; Bhattacharya et al., 2012). Dessa forma, foram escolhidas as concentrações de 1, 10 e 100 mg L^{-1} de NPs de goethita, visando avaliar o efeito geral das mesmas. A partir da solução estoque foram preparadas as soluções de NPs nas concentrações 10, 100 e 1000 mg L^{-1} (Fig. 6), diluídas em salina fosfatada Dulbecco (PBS Dulbecco: NaCl 136,9 mM; KCl 2,68 mM; CaCl_2 0,9 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,49 mM; NaH_2PO_4 7,58 mM; KH_2PO_4 1,47 mM; glicose 5,55 mM; pH 7,4). No momento da exposição essas soluções foram diluídas novamente em PBS Dulbecco diretamente na placa de exposição, atingindo as concentrações desejadas de 1, 10 e 100 mg L^{-1} , respectivamente.

Figura 6 – Soluções de NPs diluídas em PBS Dulbecco nas concentrações de 1000, 100 e 10 mg L^{-1} , respectivamente.



Fonte: a autora.

Roundup® e Glifosato

Além das nanopartículas de goethita, a linhagem celular ZFL foi exposta ao Roundup® (Monsanto do Brasil Ltda) na concentração nominal de 10 mg L⁻¹ e ao glifosato (Milenia Agrociências S/A) na concentração nominal de 3,6 mg L⁻¹, a qual corresponde à quantidade de sal de glifosato presente na formulação comercial do Roundup® (360 g de glifosato L⁻¹). A escolha de tais concentrações está baseada nos variados trabalhos que o nosso laboratório já desenvolveu com o peixe neotropical *Prochilodus lineatus* exposto a 1 e 5 mg L⁻¹ de Roundup Transorb® (Modesto e Martinez, 2010a), a 10 mg L⁻¹ de Roundup® (Cavalcante et al., 2008; Modesto e Martinez, 2010b) e a 0,48 e 2,40 mg L⁻¹ de glifosato (Moreno et al., 2014).

Foram preparadas soluções estoques do Roundup® e do glifosato misturados com PBS Dulbecco nas concentrações de 100 e 36 mg L⁻¹ respectivamente e, no momento da exposição, essas soluções foram diluídas novamente em PBS Dulbecco diretamente na placa de exposição, atingindo as concentrações desejadas de 10 e 3,6 mg L⁻¹, respectivamente.

3.3. PREPARO DAS CÉLULAS E EXPOSIÇÕES

Para todos os ensaios de toxicidade realizados neste trabalho a linhagem celular ZFL foi cultivada em frascos de cultura até que estes estivessem em monocamada. As células foram soltas do frasco com tripsina (0,125%) e inativadas com o meio de cultura utilizado na manutenção da linhagem. Em seguida, uma alíquota dessa suspensão celular foi corada com azul de Tripán (0,4%) para contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer, sendo apenas os quatro quadrantes externos da câmara contabilizados. Após a contagem, foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células/mL} = \left[\frac{\text{Soma do n}^{\circ} \text{ de células viáveis contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{4} \right]$$

A partir do valor encontrado, foi possível calcular o quanto de suspensão celular era necessário para se obter uma densidade de 10⁶ células mL⁻¹. Dessa maneira, uma alíquota da suspensão celular foi misturada ao meio de cultura, em tubo cônico de 50 mL e, após homogeneizar bem, uma alíquota dessa mistura foi adicionada em placa transparente de 96 poços (TPP®) para os ensaios de citotoxicidade, em placa preta de 96 poços (Perkin Elmer®)

para os ensaios bioquímicos ou em placa transparente de 24 poços (TPP[®]) para o ensaio de genotoxicidade.

Após 24 horas de adesão em estufa a 28°C, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com salina tamponada fosfatada, livre de cálcio e magnésio (PBS: NaCl 136,8 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 0,9 mM; Na₂HPO₄ 8,13 mM; pH 7,4). Em seguida, o PBS foi retirado e as células foram expostas por 1, 6 e 12 h aos seguintes tratamentos: 1, 10 e 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de goethita (N₁; N₁₀; N₁₀₀); 10 mg L⁻¹ de Roundup[®] (RD); 3,6 mg L⁻¹ de glifosato (Gli) e co-exposições de Roundup[®] (RD N₁; RD N₁₀; RD N₁₀₀) e glifosato (Gli N₁; Gli N₁₀; Gli N₁₀₀) na presença de NPs de goethita. As células do controle (CTR) foram expostas apenas ao PBS Dulbecco. Vale ressaltar que a escolha do PBS Dulbecco para as exposições foi determinada em testes preliminares. Para o ensaio de genotoxicidade, foi feito um controle positivo (CP) utilizando-se metil metanosulfonato (MMS) na concentração de 0,5 mM. Para cada ensaio foram montadas 4 placas independentes por tempo experimental, com número de réplicas variável, dependendo do ensaio. Com relação à exposição apenas às NPs foram montadas 8 placas para os ensaios de citotoxicidade.

3.4. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Método de exclusão com azul de Tripan (AT)

Para avaliar a integridade da membrana plasmática, foi realizado o método de exclusão com o azul de Tripan. Este método foi empregado previamente ao ensaio do cometa versão alcalina e, portanto, os métodos de preparo e exposição da linhagem celular ZFL segue conforme o ensaio de genotoxicidade. A linhagem ZFL foi cultivada em uma densidade de 10⁶ células mL⁻¹ em placas transparentes de 24 poços. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 24 h e, após esse período de adesão, as células foram lavadas com PBS e submetidas aos diferentes tratamentos e tempos experimentais. Apesar de cada tratamento ter 2 réplicas por placa, apenas uma réplica foi contabilizada para este teste. Após o período de exposição, as soluções foram retiradas com cuidado dos poços e, em seguida, foram lavados com PBS. Depois, foram adicionados 200 µL de tripsina para soltar as células do fundo da placa e, estas foram inativadas com 600 µL de PBS com 10% de soro bovino fetal. O conteúdo foi homogeneizado e colocado em microtubos para centrifugação por 7 min a 275 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, deixando-se apenas 0,5 mL de solução, a qual foi homogeneizada para ressuspender o pellet. Dessa forma, alíquotas de 50 µL da amostra foram homogeneizadas com 50 µL do corante azul de Tripan (0,4%). A partir dessa mistura,

uma alíquota de 10 μL de cada poço foi colocada em câmara de Neubauer para contagem total de 100 células em microscópio óptico (Zeiss[®], Primo Star, Alemanha), diferenciando células viáveis das inviáveis. Os quadrantes que foram contabilizados tiveram uma ordem definida e os resultados da viabilidade celular foram dados em porcentagem de células viáveis.

Método de redução do MTT (MTT)

Para avaliar a viabilidade metabólica mitocondrial foi realizado o método de redução do sal brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), segundo o protocolo de Mosmann (1983) com algumas alterações. Para tanto, a linhagem ZFL foi cultivada em uma densidade de 10^6 células mL^{-1} em placas transparentes de 96 poços. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 24 h e, após esse período de adesão, as células foram lavadas com PBS e submetidas aos diferentes tratamentos e tempos experimentais, sendo que cada tratamento continha 10 réplicas por placa. Após o período de exposição, as soluções foram retiradas com cuidado dos poços e, em seguida, foram lavadas com PBS. Posteriormente, foram adicionados 100 μL do sal de MTT (0,80 mM) misturado com PBS Dulbecco por um período de 4 h. Após esse período, a placa foi centrifugada em 200 g por 5 min. Em seguida, a solução de MTT foi retirada e foram adicionados 200 μL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazana. Posteriormente à homogeneização, a absorbância correspondente a cada amostra foi determinada em leitor de microplaca (Victor 3, Perkin Elmer[®]) a 540 nm. A absorbância obtida para as células do CTR foi considerada como 100% de viabilidade metabólica (VM). A VM dos diferentes tratamentos foi determinada pela seguinte fórmula: $VM_A = [(Abs_A - Abs_{Br}) / (Abs_{CTR} - Abs_{Br})] \times 100$, onde: VM_A : viabilidade metabólica da amostra; Abs_A : absorbância da amostra; Abs_{Br} : absorbância do Branco; Abs_{CTR} : absorbância do Controle.

Método do Vermelho Neutro (VN)

Para avaliar a viabilidade lisossomal, a linhagem ZFL foi cultivada em uma densidade de 10^6 células mL^{-1} em placas transparentes de 96 poços. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 24 h e, após esse período de adesão, as células foram lavadas com PBS e submetidas aos diferentes tratamentos e tempos experimentais, sendo que cada tratamento continha 10 réplicas por placa. Após o período de exposição, as soluções foram retiradas com cuidado dos poços e, em seguida, foram lavadas com PBS. Posteriormente, foram adicionados 100 μL do corante VN ($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) dissolvido em PBS Dulbecco, por um período de 3 h. Após esse período, a placa foi centrifugada em 200 g por 5 minutos. Em seguida, a solução do VN foi retirada e foram adicionados 200 μL da solução de formaldeído (0,5%) em cloreto de cálcio (1%), para fixação do corante, por 2 min. Em seguida, foram adicionados 200 μL da solução de álcool ácido (1% de ácido acético em 50% de álcool etílico) e a placa permaneceu em

agitação constante por 15 min. Posteriormente à homogeneização, a absorbância correspondente a cada amostra foi determinada em leitor de microplaca (Victor 3, Perkin Elmer[®]) a 540 nm. A absorbância obtida para as células do CTR foi considerada como 100% de viabilidade lisossomal (VL) e a VL dos diferentes tratamentos foi determinada pela mesma fórmula utilizada pelo método de redução do MTT.

3.5. ENSAIOS BIOQUÍMICOS - GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAOT)

Para avaliar estes biomarcadores foi utilizado o protocolo de Amado et al. (2009) com modificações. Dessa forma, as células foram cultivadas em uma densidade de 10^6 células mL⁻¹ em placas pretas de 96 poços. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 24 horas e, após esse período de adesão, as células foram lavadas com PBS e submetidas aos diferentes tratamentos e tempos experimentais. Após o período de exposição, as soluções foram retiradas com cuidado dos poços e, em seguida, foram lavadas com PBS. Em seguida, foi adicionado meio de reação (HEPES 30 mM; KCl 200 mM; MgCl₂ 1 mM, pH 7,2) em todos os poços. Para cada tratamento experimental foram realizadas seis repetições por placa, sendo três poços tratados com tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,4) e, os outros três, receberam substância geradora de radicais peroxil, 2,2'- azobis (2 metilpropinamida) dihidroclorido (ABAP: 10 mM, pH 7,2). Em seguida, foi feita a leitura da autofluorescência em leitor de microplaca (Victor 3, Perkin Elmer[®]) e com esse procedimento, foi obtida a fluorescência espontânea de cada amostra. Feito isso, adicionou-se a todos os poços o composto 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA 1mM) e uma nova leitura foi realizada a 35°C, por 70 min com leituras a cada 5 min, excitação de 485 nm e emissão de 520 nm (Costa et al., 2012). A esta temperatura, o ABAP é degradado e libera nas células grande quantidade de radicais peroxil. Ocorre também a clivagem do H₂DCF-DA pelas esterases presentes nas amostras, liberando o H₂DCF. Este último reage com ERO, liberando diclorofluoresceína (DCF), um composto fluorescente (Amado et al., 2009). Sendo assim, quanto maior a quantidade de ERO, maior a fluorescência da amostra. Para o cálculo da quantidade de ERO e da CAOT, foi feito o ajuste dos dados de fluorescência para uma função polinomial de segunda ordem e calculado o valor da integral. Para a quantificação de ERO, foram analisados os valores das integrais das amostras tratadas apenas com tampão fosfato de potássio. Já para avaliação da CAOT, foi feita a diferença dos valores de área das amostras tratadas e não tratadas com ABAP segundo a fórmula:

$$\text{Área relativa} = \frac{(\text{Área}_{\text{ABAP}} - \text{Área}_{\text{SEM ABAP}})}{\text{Área}_{\text{SEM ABAP}}}$$

Assim, quanto maior a diferença entre as áreas, menor a CAOT, visto que altos valores de fluorescência indicam maior quantidade de ERO e menor capacidade de neutralização destes compostos. Para facilitar a visualização dos resultados, os dados de CAOT apresentados neste trabalho foram invertidos, ou seja, estão apresentados como 1/área relativa.

3.6. ENSAIO DE GENOTOXICIDADE - ENSAIO DO COMETA VERSÃO ALCALINA

Para a avaliação dos danos no DNA a linhagem ZFL foi cultivada em uma densidade de 10^6 células mL^{-1} em placas transparentes de 24 poços. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 24 h e, após esse período de adesão, as células foram lavadas com PBS e submetidas aos diferentes tratamentos e tempos experimentais, sendo que para cada tratamento havia 2 réplicas por placa. Após o período de exposição, as soluções foram retiradas com cuidado dos poços e, em seguida, foram lavados com PBS. Depois, foram adicionados 200 μL de tripsina para soltar as células do fundo da placa e, estas foram inativadas com 600 μL de PBS com 10% de soro bovino fetal. O conteúdo foi homogeneizado e colocado em microtubos para centrifugação por 7 min a 275 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, deixando-se apenas 0,5 mL de solução, a qual foi homogeneizada para ressuspender o pellet e usada na confecção das lâminas do Ensaio do Cometa, seguindo o protocolo descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações.

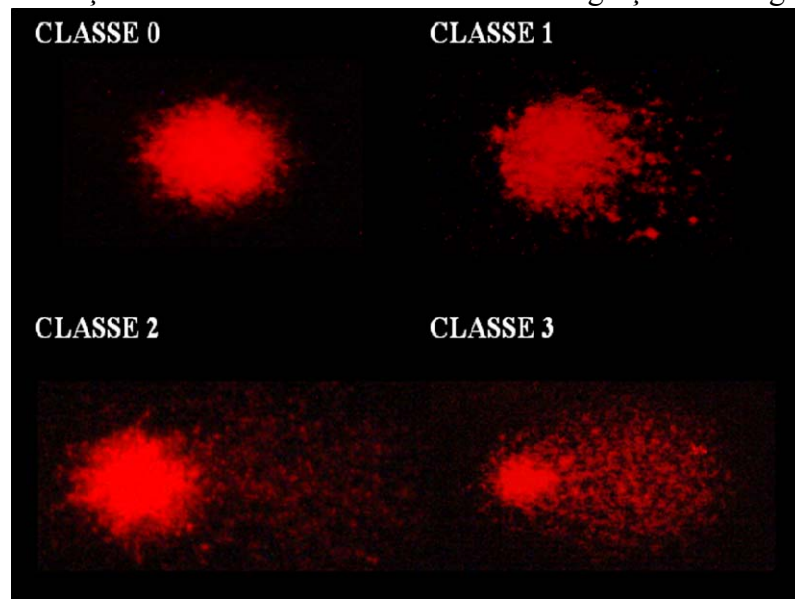
O ensaio do cometa versão alcalina estabelece que as células utilizadas devam apresentar viabilidade celular maior ou igual a 80% (Tice et al., 2000). Para tanto, a viabilidade das células foi verificada previamente pelo teste de exclusão com azul de Tripán (0,4%) para os diferentes tratamentos testados como descrito no item 3.4. Dessa forma, alíquotas de 20 μL de solução de cada amostra foram homogeneizadas com 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão 5% (acondicionada em banho-maria a 37°C) para a preparação de duas lâminas por poço. Esta alíquota foi colocada em uma lâmina previamente preparada com agarose de ponto de fusão normal (1,5%) e, em seguida, coberta por uma lamínula. As lâminas foram levadas à geladeira por 40 min para solidificação da agarose e, após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas colocadas em uma cuba de vidro contendo solução de lise (NaCl 2,5 mM; EDTA 100 mM; Tris 10 mM, pH 10; Triton X-100 a 1%; DMSO a 10%), onde foram

mantidas por 2 h. Passado o tempo de lise, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese, a qual continha tampão alcalino gelado e recém preparado (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM, pH > 13), permanecendo neste procedimento por 35 min para a desespiralização do DNA e exposição dos sítios álcali-lábeis. Em seguida, a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por 20 min. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram colocadas por 15 min em solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5), fixadas com etanol absoluto e secas à temperatura ambiente. No momento da análise, as lâminas foram coradas com 50 µL de solução de Gel Red (15 uL de Gel Red 10.000X em 5 mL de NaCl 1 M e 45 mL de água destilada - Biotium®). A análise foi feita em microscópio de fluorescência (Leica®, DM 2500), utilizando-se filtro de excitação de 510-560 nm e filtro de barreira de 590 nm, em aumento de 40X. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina, em teste cego e, apesar das lâminas terem sido montadas em duplicata, apenas uma foi contabilizada. De acordo com Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificados visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA em quatro classes (Fig. 7): classe 0 – nucleóide sem cauda com poucos fragmentos ao redor, classe 1 – cauda menor que o diâmetro do núcleo, classe 2 – cauda com comprimento de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo e classe 3 – cauda com comprimento maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. O escore de dano para cada lâmina foi obtido multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe analisada (A, B, C e D) pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Escore de danos no DNA} = (A \times 0) + (B \times 1) + (C \times 2) + (D \times 3)$$

Assim, o valor de escore para cada lâmina pode variar de um valor mínimo de 0 e um máximo de 300.

Figura 7 – Classificação dos nucleóides de acordo com a migração dos fragmentos de DNA.



Fonte: a autora.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO E GLIFOSATO

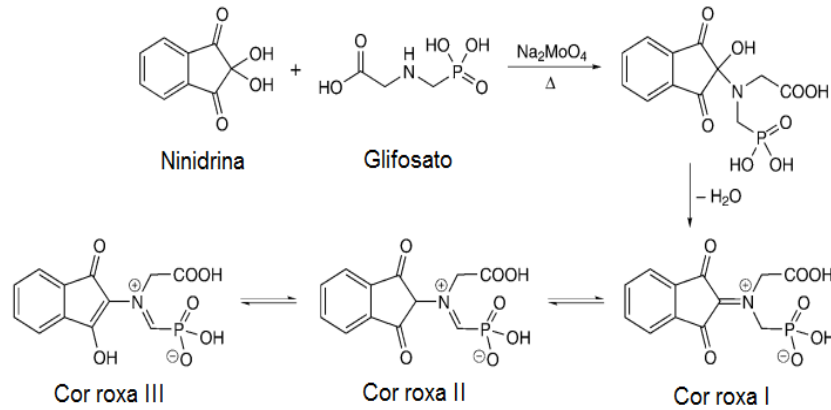
Quantificação de ferro

Ao final dos experimentos, as soluções de exposição dos diferentes tratamentos foram analisadas quanto à concentração de ferro total e dissolvido. Para a análise de ferro total, as soluções foram fixadas com ácido nítrico (0,5% - FMaia) e para a dosagem de ferro dissolvido, as soluções foram filtradas (0,45 μm) e fixadas (HNO_3 0,5% - FMaia). As amostras foram congeladas (-20°C) até o momento das análises em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA - Analyst 700, Perkin Elmer[®], EUA) pelo método de leitura em chama.

Quantificação de glifosato

Ao final dos experimentos, as soluções de exposição contendo glifosato e Roundup[®] foram analisadas quanto à concentração de glifosato através do método da ninidrina (Fig. 8). O princípio deste método se baseia na reação do glifosato com 5% (m/v) de ninidrina (2,2-diidróxi-hidrindeno-1,3-diona) em presença de 5% (m/v) de molibdato de sódio (Na_2MoO_4) em meio aquoso neutro a 100°C , com limite de detecção que varia entre 0,1 – 3,5 mg L^{-1} de glifosato. Quando a ninidrina detecta grupos aminas livres, uma cor azul escura ou roxa, conhecida como *púrpura de Ruhemann* é produzida podendo ser quantificada em espectrofotômetro a 570 nm (Bhaskara e Nagaraja, 2006).

Figura 8 – Reação do glifosato com ninidrina em presença do molibdato de sódio



(Modificado de Bhaskara e Nagaraja, 2006).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística cada placa utilizada nos experimentos foi considerada um N amostral. Como os experimentos para cada tratamento foram realizados de forma independente, os resultados para cada parâmetro analisado, nos diferentes tratamentos, foram comparados com seus respectivos controles, para um mesmo tempo experimental da seguinte forma: CTR x N₁ x N₁₀ x N₁₀₀, CTR x RD x RD N₁ x RD N₁₀ x RD N₁₀₀, CTR x Gli x Gli N₁ x Gli N₁₀ x Gli N₁₀₀, através da análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não-paramétrica (Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados de normalidade e homogeneidade da variância. Quando necessário, as diferenças foram identificadas pelo teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls (SNK). Foram considerados valores significativos de $P < 0,05$ e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

Efeitos de nanopartículas de goethita, do glifosato e do Roundup[®] para a linhagem celular ZFL: interferência do nanomaterial nos efeitos destes herbicidas

Natara Dias Gomes da Silva e Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Manuscrito a ser enviado para Toxicology *In Vitro*

RESUMO

As nanopartículas de óxido de ferro trazem importantes perspectivas na remediação ambiental, pois devido à sua grande área superficial, elas podem adsorver uma ampla variedade de contaminantes, como o glifosato. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a toxicidade do glifosato e do produto formulado Roundup[®] para a linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL), na presença e ausência de nanopartículas (NPs) de goethita através de ensaios citotóxicos, bioquímicos e genotóxicos. As células foram avaliadas quanto à viabilidade da membrana plasmática, mitocondrial e lisossomal pelo azul de Tripán, redução do MTT e vermelho neutro, respectivamente, enquanto que os danos genotóxicos foram quantificados pelo ensaio do cometa. A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante total (CAOT) também foram determinadas. Os resultados indicaram que as NPs isoladas foram citotóxicas e genotóxicas. Por sua vez, o Roundup[®] foi citotóxico e genotóxico para as ZFL e sua associação com as NPs intensificaram os efeitos produzidos pelo herbicida. Para o glifosato não foi observado efeito de toxicidade nos parâmetros analisados e, quando em associação, uma possível adsorção do glifosato pelas NPs pode ter ocorrido, resultando em mudança estrutural das NPs e diminuição dos seus efeitos para a linhagem ZFL.

Palavras-chave: citotoxicidade; estresse oxidativo; genotoxicidade; nanotoxicologia; óxido de ferro; testes *in vitro*.

O glifosato é o herbicida mais utilizado atualmente no controle de plantas invasoras, tanto na agricultura quanto para o uso doméstico. Apresentando caráter não seletivo e, portanto, com amplo espectro de ação, o glifosato está presente em muitas formulações de herbicidas, como o Roundup[®] (Solomon e Thompson, 2003; Borggaard e Gimsing, 2008; Tang et al., 2015). Além do glifosato como ingrediente ativo, o Roundup[®] apresenta o surfactante polioxietileno amina (POEA), o qual é adicionado para aumentar a eficiência do produto formulado (Tsui e Chu, 2003).

Devido sua ampla utilização e por apresentar elevada solubilidade na água (Williams et al., 2000; Tsui e Chu, 2003; Bhaskara e Nagaraja, 2006), a presença do glifosato em ambientes aquáticos é cada vez mais comum (Silva et al., 2003; Armas et al., 2007; Peruzzo et al., 2008; Gasnier et al., 2009), podendo facilmente atingir águas superficiais e subterrâneas através do escoamento superficial e lixiviação (Giesy et al., 2000; Borggaard e Gimsing, 2008; Queiroz et al., 2011). Ainda, o glifosato pode se bioacumular ou adsorver ao material em suspensão, com tempo de permanência variando de 7 a 14 dias em ambientes aquáticos (Giesy et al., 2000; Amarante et al., 2002; Silva et al., 2003).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a toxicidade do glifosato é baixa para organismos não-alvos (WHO, 1994). No entanto, estudos reportam o aumento da toxicidade dos produtos formulados à base de glifosato relacionado à presença de surfactantes em sua composição, como o POEA adicionado ao herbicida Roundup[®] (Amarante et al., 2002; Tsui e Chu, 2003; Howe et al., 2004; Peixoto, 2005; Lushchak et al., 2009). Dessa maneira, cresce a preocupação sobre os efeitos tóxicos deste composto sobre a saúde humana e de organismos aquáticos.

As nanopartículas de óxido de ferro trazem importantes perspectivas na remediação de ambientes contaminados por substâncias orgânicas, devido sua alta reatividade (Kharisov et al., 2012; O'Carroll et al., 2012; Tosco et al., 2014). Dentre os óxidos de ferro mais utilizados, a goethita (α -FeOOH) se destaca por ser mais estável termodinamicamente (Cornell e Schwertmann, 2003) e por apresentar grande capacidade de adsorção ao glifosato (Liu et al., 2014), formando complexos monodentados na superfície da goethita ligados pelo grupo fosfato (Sheals et al., 2002; Barja e dos Santos Afonso, 2005; Jonsson et al., 2008; Pessagno et al., 2008).

Apesar de diversas pesquisas referentes à sua estrutura (Cornell e Schwertmann, 2003; Liu et al., 2014), sua capacidade de adsorção (Sheals et al., 2002; Barja e dos Santos Afonso, 2005; Jonsson et al., 2008; Pessagno et al., 2008) e seu potencial de aplicação na proteção do

meio ambiente (Liu et al., 2014), há carência de trabalhos avaliando respostas biológicas frente a exposição à goethita e, portanto, seus impactos toxicológicos permanecem desconhecidos, principalmente para organismos aquáticos.

Neste contexto, estudos em nível celular são extremamente importantes porque fornecem informações sobre os mecanismos de ação dos agentes testados e/ou da resposta celular e, por esse motivo, podem ser utilizados de forma preventiva (Castaño et al., 2003; Bols et al., 2005, Fent, 2007). Desse modo, o desenvolvimento de modelos *in vitro* teve um crescimento importante nos últimos anos e tem papel fundamental na pesquisa toxicológica, oferecendo vantagens éticas, científicas e econômicas (Castaño et al., 2003).

No presente trabalho, utilizamos a linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (“zebrafish”), um modelo que foi anteriormente empregado para estudar a toxicidade de metais (Chan et al., 2006; Sandrini et al., 2009; Chen e Chan, 2011), nanopartículas (Chen et al., 2011; Christen et al., 2013) e produtos farmacêuticos (Bopp e Lettieri, 2008). A linhagem celular ZFL, obtida por Ghosh et al. (1994), exibe algumas características de células do parênquima hepático e tem sido utilizada, principalmente, para estudos toxicológicos e ecotoxicológicos (Tang et al., 2013; Cavalcante et al., 2014) devido seu genoma amplamente conhecido.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade do glifosato, do produto formulado Roundup[®] e de nanopartículas (NPs) de goethita para a linhagem celular de hepatócitos *Danio rerio* (ZFL), por meio de ensaios citotóxicos, bioquímicos e genotóxicos, e verificar se os efeitos produzidos pelos herbicidas são atenuados na presença de NPs de goethita.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Linhagem Celular ZFL

A linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). A linhagem ZFL foi cultivada em frascos de cultura celular de 25 cm², no qual foram adicionados meio de cultura completo contendo 50% de meio Leibovitz L-15 (Gibco[®]), 40% de meio RPMI 1640 (Gibco[®]) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco[®]), mantidas em estufa sem adição de CO₂ a 28°C.

4.2.2. Substâncias Teste

Nanopartículas de goethita (NPs): As nanopartículas de goethita foram produzidas segundo o protocolo descrito por Schwertmann e Cornell (2000) e fornecidas pelo Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina. O material foi disperso em água ultra pura e sonicado e foi feita a quantificação das NPs de goethita por peso seco (NPs = 35,55 g L⁻¹) e a quantificação de ferro (Fe = 17,19 g L⁻¹) correspondente, em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA – Analyst 700, Perkin Elmer[®], EUA) pelo método de leitura em chama. Posteriormente, essa solução foi autoclavada. A partir da solução inicial, foram preparadas soluções de NPs nas concentrações de 1, 10 e 100 mg L⁻¹ diluídas em salina fosfatada Dulbecco (PBS Dulbecco: NaCl 136,9 mM; KCl 2,68 mM; CaCl₂ 0,9 mM; MgCl₂.6H₂O 0,49 mM; NaH₂PO₄ 7,58 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; glicose 5,55 mM; pH 7,4). As concentrações de NPs de goethita utilizadas no presente trabalho (1, 10 e 100 mg L⁻¹) foram definidas com base em trabalhos desenvolvidos com NPs de diferentes óxidos de ferro (Karlsson et al., 2008; Singh et al., 2010; Bhattacharya et al., 2012).

Roundup[®] e Glifosato: A linhagem celular ZFL foi exposta ao Roundup[®] (Monsanto do Brasil Ltda) na concentração nominal de 10 mg L⁻¹ e ao glifosato (Milenia Agrociências S/A) na concentração nominal de 3,6 mg L⁻¹, a qual corresponde a quantidade de sal de glifosato presente na formulação comercial do Roundup[®] (360 g de glifosato L⁻¹). A escolha dessas concentrações reflete os trabalhos que o nosso laboratório já desenvolveu com o peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos ao Roundup Transorb[®], Roundup[®] e ao glifosato (Cavalcante et al., 2008; Modesto e Martinez, 2010a; Modesto e Martinez, 2010b; Moreno et al., 2014). Dessa forma, foram preparadas soluções do Roundup[®] e do glifosato misturados com PBS Dulbecco nas concentrações de 10 e 3,6 mg L⁻¹, respectivamente.

4.2.3. Exposições In Vitro

A linhagem celular ZFL foi cultivada em uma densidade de 10⁶ células mL⁻¹ em placa transparente de 96 poços para os testes de citotoxicidade, em placa preta de 96 poços (Perkin Elmer[®]) para os testes bioquímicos e, por fim, em placa transparente de 24 poços (TPP[®]) para o teste de genotoxicidade. Após 24 h de adesão em estufa a 28°C, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com salina tamponada fosfatada livre de cálcio e magnésio (PBS: NaCl 136,8 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 0,9 mM; Na₂HPO₄ 8,13 mM; pH 7,4). Em seguida, o PBS foi retirado e as células foram expostas por 1, 6 e 12 h aos seguintes tratamentos: 1, 10 e 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de goethita (N₁; N₁₀; N₁₀₀); 10 mg L⁻¹ de Roundup[®]

(RD), 3,6 mg L⁻¹ de Glifosato (Gli) e co-exposições de Roundup® (RD N₁; RD N₁₀; RD N₁₀₀) e glifosato (Gli N₁; Gli N₁₀; Gli N₁₀₀) na presença de NPs de goethita; ou apenas ao PBS Dulbecco (CTR). Para o ensaio de genotoxicidade, também foi feito um controle positivo (CP) utilizando 0,5 mM de metil metanosulfonato (MMS). Os experimentos para cada tratamento (apenas NP, RD + NP e Gli + NP) foram realizados de forma independente, sendo que para cada ensaio foram montadas quatro placas por tempo experimental e, dependendo do ensaio, o número de réplicas por tratamento foi variável. Com relação à exposição apenas às NPs foram montadas oito placas para os ensaios de citotoxicidade.

4.2.4. Ensaio de Citotoxicidade

Método de exclusão com azul de Tripan: Para avaliar a viabilidade da membrana plasmática foi realizado o método de exclusão com o corante azul de Tripan (AT). Este método foi empregado previamente ao ensaio do cometa versão alcalina e, portanto, os métodos de preparo e exposição da linhagem celular ZFL segue conforme o ensaio de genotoxicidade. Para o ensaio do cometa cada tratamento continha duas réplicas por placa, no entanto, para o AT apenas uma dessas réplicas foram contabilizadas. Dessa forma, alíquotas de 50 µL da amostra foram homogeneizadas com 50 µL do corante azul de Tripan (0,4%). A partir dessa mistura, uma alíquota de 10 µL de cada poço foi colocada em câmara de Neubauer para contagem total de 100 células em microscópio óptico (Zeiss®, Primo Star, Alemanha), diferenciando células viáveis das inviáveis. Os quadrantes que foram contabilizados tiveram uma ordem definida e os resultados da viabilidade celular foram dados em porcentagem de células viáveis.

Método de redução do MTT: Para avaliar a viabilidade metabólica mitocondrial foi realizado o método de redução do sal brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), segundo o protocolo de Mosmann (1983), com algumas alterações. Para este ensaio cada tratamento continha 10 réplicas por placa e, após o período de exposição, as soluções foram retiradas e os poços foram lavados com PBS. Posteriormente, foram adicionados 100 µL do sal de MTT (0,80 mM) misturado com PBS Dulbecco por um período de 4 horas. Terminada esta etapa, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 200 g. Em seguida, a solução de MTT foi retirada e foram adicionados 200 µL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazana. Posteriormente à homogeneização, a absorbância correspondente a cada amostra foi determinada em leitor de microplaca (Victor 3, Perkin Elmer®) a 540 nm e a absorbância obtida para as células do CTR foi considerada como 100% de viabilidade

metabólica (VM). Ainda, a VM dos diferentes tratamentos foi determinada pela seguinte fórmula: $VM_A = [(Abs_A - Abs_{Br}) / (Abs_{CTR} - Abs_{Br})] \times 100$, onde: VM_A : viabilidade metabólica da amostra; Abs_A : absorvância da amostra; Abs_{Br} : absorvância do Branco; Abs_{CTR} : absorvância do Controle.

Método do Vermelho Neutro (VN): Para avaliar a viabilidade lisossomal foi realizado o método do vermelho neutro. Para este ensaio cada tratamento continha 10 réplicas por placa e, após o período de exposição, as soluções foram retiradas e os poços foram lavados com PBS. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L do corante VN (40 μ g.mL⁻¹) dissolvido em PBS Dulbecco por um período de 3 horas. Terminada esta etapa, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 200 g. Em seguida, a solução do VN foi retirada e foram adicionados 200 μ L da solução de formaldeído (0,5%) em cloreto de cálcio (1%), para fixação do corante por 2 min. Em seguida, foram adicionados 200 μ L da solução de álcool ácido (1% de ácido acético em 50% de álcool etílico), a qual permaneceu em agitação constante por 15 min. Posteriormente à homogeneização, a absorvância correspondente a cada amostra foi determinada em leitor de microplaca (Victor 3, Perkin Elmer®) a 540 nm. A absorvância obtida para as células do CTR foi considerada como 100% de viabilidade lisossomal (VL) e a VL dos diferentes tratamentos foi determinada pela mesma fórmula utilizada pelo método de redução do MTT.

4.2.5. Ensaio Bioquímicos

Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e determinação da Capacidade Antioxidante Total (CAOT): Para avaliar estes biomarcadores foi utilizado o protocolo de Amado et al. (2009) com modificações. Após o período de exposição, as soluções foram retiradas e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, foi adicionado meio de reação (HEPES 30 mM; KCl 200 mM; MgCl₂ 1 mM, pH 7,2) em todos os poços. Para cada tratamento experimental foram realizadas seis repetições por placa, sendo três poços tratados com tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,4) e, os outros três, receberam substância geradora de radicais peroxil, 2,2'-azobis (2 metilpropinamida) dihidroclorido (ABAP: 10 mM, pH 7,2). Em seguida, foi feita a leitura da autofluorescência em leitor de microplaca (Victor 3, Perkin Elmer®) e com esse procedimento, foi obtida a fluorescência espontânea de cada amostra. Feito isso, adicionou-se a todos os poços o composto 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA 1mM) e uma nova leitura foi realizada a 35°C por 70 min com leituras a cada 5 min, excitação de 485 nm e emissão de 520 nm (Costa et al., 2012). Para o cálculo da quantidade de ERO e da CAOT, foi feito o ajuste dos dados de fluorescência para uma função

polinomial de segunda ordem e calculado o valor da integral. Para a quantificação de ERO, foram analisados os valores das integrais das amostras tratadas apenas com tampão fosfato de potássio. Já para avaliação da CAOT, foi feita a diferença dos valores de área das amostras tratadas e não tratadas com ABAP. Assim, quanto maior a diferença entre as áreas, menor a CAOT, visto que altos valores de fluorescência indicam maior quantidade de ERO e menor capacidade de neutralização destes compostos. Para facilitar a visualização dos resultados, os dados de CAOT apresentados neste trabalho foram invertidos, ou seja, $1/\text{área}$ relativa.

4.2.6. Ensaio de Genotoxicidade

Ensaio do cometa versão alcalina: Para a avaliação dos danos no DNA foi realizado o ensaio do cometa versão alcalina conforme Singh et al. (1988) com algumas modificações. Este ensaio estabelece que as células utilizadas devam apresentar viabilidade celular maior ou igual a 80% (Tice et al., 2000). Para tanto, a viabilidade celular foi verificada pelo teste de exclusão com azul de Tripán (0,4%) para os diferentes tratamentos testados. Para este ensaio cada tratamento continha 2 réplicas por placa. Dessa forma, alíquotas de 20 μL de solução de cada amostra foram homogeneizadas com 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão 5% (acondicionada em banho-maria a 37°C) para a preparação de duas lâminas por poço. Esta alíquota foi colocada em uma lâmina previamente preparada com agarose de ponto de fusão normal (1,5%) e, em seguida, coberta por uma lamínula. As lâminas foram levadas à geladeira por 40 minutos para solidificação da agarose e, após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas colocadas em uma cuba de vidro contendo solução de lise (NaCl 2,5 mM; EDTA 100 mM; Tris 10 mM, pH 10; Triton X-100 a 1%; DMSO a 10%) por 2 h. Após a lise, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese, a qual continha tampão alcalino gelado e recém preparado (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM, pH > 13), permanecendo neste procedimento por 35 min para a desespiralização do DNA e exposição dos sítios álcalilábeis. Em seguida, a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por 20 min. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram colocadas por 15 min em solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5), fixadas com etanol absoluto e secas à temperatura ambiente. No momento da análise, as lâminas foram coradas com 50 μL de solução de Gel Red (15 μL de Gel Red 10.000X em 5 mL de NaCl 1 M e 45 mL de água destilada - Biotium®). A análise foi feita em microscópio de fluorescência (Leica®, DM 2500) em objetiva de 40X (filtro de excitação de 510-560 nm e filtro de barreira de 590 nm), no qual foram analisados 100 nucleóides por lâmina em teste cego e, apesar das lâminas terem sido montadas em duplicata, apenas uma foi contabilizada.

De acordo com Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificados visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA em quatro classes: classe 0 – nucleóide sem cauda com poucos fragmentos ao redor, classe 1 – cauda menor que o diâmetro do núcleo, classe 2 – cauda com comprimento de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo e classe 3 – cauda com comprimento maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Assim, o escore de dano para cada lâmina foi obtido multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano analisada (A, B, C e D) pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3).

4.2.7. Quantificação de Ferro e Glifosato

Ao final dos experimentos, as soluções de exposição dos diferentes tratamentos foram analisadas quanto à concentração de ferro total e dissolvido. Para a análise de ferro total, as soluções foram fixadas com ácido nítrico (0,5% - FMaia) e para a dosagem de ferro dissolvido, as soluções foram filtradas (0,45 μm) e fixadas (HNO_3 0,5% - FMaia). As amostras foram analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA – Analyst 700, Perkin Elmer[®], EUA) por atomização em chama. Por sua vez, as soluções de exposição contendo glifosato e Roundup[®] foram analisadas quanto à concentração de glifosato através do método que se baseia na reação do glifosato com 5% (m/v) de ninidrina (2,2-diidroxihidríndeno-1,3-diona) em presença de 5% (m/v) de molibdato de sódio (Na_2MoO_4) em meio aquoso neutro a 100 °C, com limite de detecção que varia entre 0,1 – 3,5 mg L^{-1} de glifosato. Quando a ninidrina detecta grupos aminas livres, uma cor azul escura ou roxa, conhecida como *púrpura de Ruhemann* é produzida podendo ser quantificada em espectrofotômetro a 570 nm (Bhaskara e Nagaraja, 2006).

4.2.8. Análises Estatísticas

Para a análise estatística cada placa utilizada nos experimentos foi considerada um N amostral. Como os experimentos para cada tratamento foram realizados de forma independente, os resultados para cada parâmetro analisado, nos diferentes tratamentos, foram comparados com seus respectivos controles, para um mesmo tempo experimental da seguinte forma: CTR x N₁ x N₁₀ x N₁₀₀, CTR x RD x RD N₁ x RD N₁₀ x RD N₁₀₀, CTR x Gli x Gli N₁ x Gli N₁₀ x Gli N₁₀₀, através da análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não-paramétrica (Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados de normalidade e homogeneidade da variância. Quando necessário, as diferenças foram identificadas pelo teste

de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls (SNK). Foram considerados valores significativos de $P < 0,05$ e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Quantificação de Ferro

A Tabela 1 apresenta os valores da concentração de ferro (Fe) total e dissolvido presente nas soluções de exposição. Esses resultados mostram que as concentrações de Fe dissolvido foram bem menores que as concentrações de Fe total em todos os tratamentos contendo N_{10} e N_{100} . As maiores concentrações de Fe dissolvido foram para as soluções de N_{100} , Gli N_{100} e RD N_{100} .

Tabela 1 – Concentrações de Fe total e dissolvido (mg L^{-1}) nas soluções de exposição dos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Concentração de Fe (mg L^{-1})	
	Total	Dissolvido
CTR	$0,76 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,01$
N_1	$0,73 \pm 0,08$	$0,52 \pm 0,02$
N_{10}	$5,23 \pm 0,23$	$0,69 \pm 0,03$
N_{100}	$60,01 \pm 5,93$	$8,36 \pm 0,28$
RD	$0,56 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,01$
RD N_1	$1,08 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,05$
RD N_{10}	$6,99 \pm 0,52$	$0,62 \pm 0,03$
RD N_{100}	$71,08 \pm 2,63$	$4,97 \pm 0,36$
Gli	$0,77 \pm 0,04$	$0,76 \pm 0,04$
Gli N_1	$1,48 \pm 0,22$	$0,97 \pm 0,10$
Gli N_{10}	$6,23 \pm 0,81$	$0,95 \pm 0,02$
Gli N_{100}	$62,20 \pm 1,23$	$7,10 \pm 0,44$

Os valores correspondem à média \pm EP ($n = 3$).

4.3.2. Quantificação de Glifosato

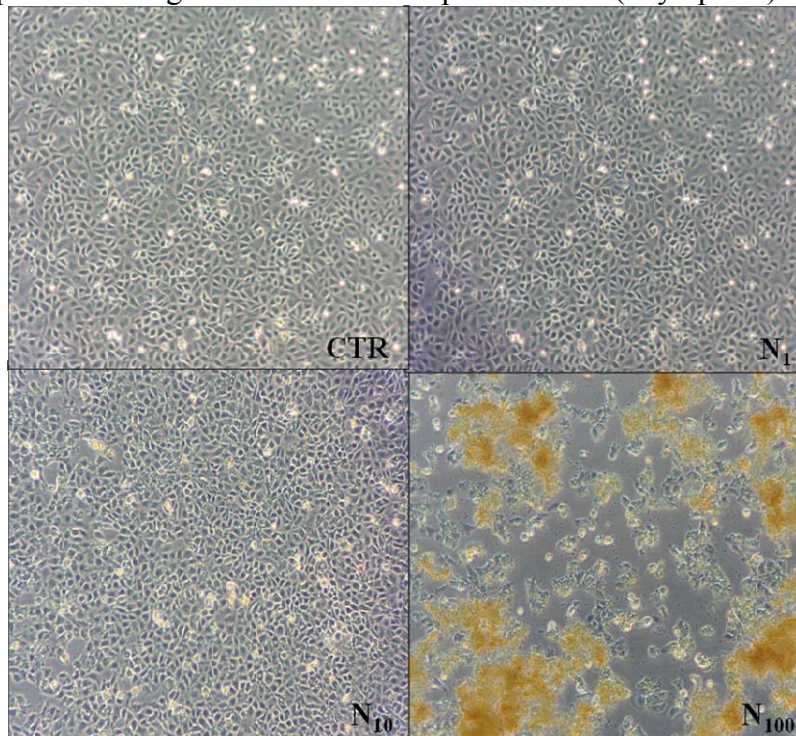
Os resultados da quantificação de glifosato, nos meios experimentais, indicaram valores (média \pm EP, $n = 3$) de $1,43 \pm 0,001 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato no tratamento RD e $2,86 \pm 0,009 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato no tratamento Gli, ambos menores que a concentração nominal inicial de glifosato em ambos os tratamentos, $3,6 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato. Vale ressaltar que a utilização tanto do PBS Dulbecco como das nanopartículas de goethita podem ter interferido na detecção do glifosato pelo método da ninidrina, uma vez que a precisão deste ensaio pode ser

fortemente influenciada pela presença de cátions, ânions e íons metálicos, como o ferro. Dessa forma, os resultados dos tratamentos de co-exposição RD N₁, RD N₁₀, RD N₁₀₀, Gli N₁, Gli N₁₀ e Gli N₁₀₀ não foram mostrados.

4.3.3. Alteração na Morfologia Celular

Após os períodos de exposição (1, 6 e 12 h), as placas foram observadas em microscópio invertido (Olympus®) e foi possível verificar que apenas os tratamentos que continham a maior concentração de NPs (N₁₀₀, RD N₁₀₀ e Gli N₁₀₀) formaram aglomerados no meio de cultura para todos os testes e tempos experimentais avaliados no presente trabalho. Também foi observado que esses aglomerados de NPs interagiam de forma intensa com as células, provocando alteração na morfologia celular e o descolamento das células da placa de exposição (Fig. 9). Apesar de essa interação ter ocorrido, não resultou em dano na membrana celular, o qual foi avaliado pelo método de exclusão com o azul de Tripán, indicando resultados de viabilidade celular superior a 90%.

Figura 9 – Visualização geral da morfologia (independente do tempo de exposição) da linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) após exposição ao PBS Dulbecco (CTR) ou às concentrações de 1, 10 e 100 mg L⁻¹ (N₁, N₁₀ e N₁₀₀) de nanopartículas de goethita em microscópio invertido (Olympus®). Aumento: 40x.



Fonte: a autora.

4.3.4. Ensaio do AT

A Tabela 2 mostra os resultados referentes à viabilidade da membrana plasmática após exposição aos diferentes tratamentos experimentais pelo teste de exclusão com AT. Os resultados indicam que para todos os tempos experimentais avaliados (1, 6 e 12 h) a viabilidade celular foi acima de 90% e, portanto, todos os tratamentos puderam ser utilizados no ensaio do cometa versão alcalina.

Tabela 2 – Viabilidade celular (média \pm EP, n = 4) calculada pelo método de exclusão com azul de Tripán na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) após 1, 6 e 12 h de exposição apenas ao PBS Dulbecco (CTR) ou às concentrações de: 1, 10 e 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de goethita (N₁, N₁₀ e N₁₀₀), 10 mg L⁻¹ de Roundup[®] (RD), 3,6 mg L⁻¹ de glifosato (Gli) e às co-exposições RD N₁, RD N₁₀ e RD N₁₀₀ e Gli N₁, Gli N₁₀ e Gli N₁₀₀.

	Viabilidade celular com azul de Tripán (%)		
	1 h	6 h	12 h
CTR	98,00 \pm 0,41	97,00 \pm 0,41	97,50 \pm 0,96
N ₁	96,00 \pm 0,82	95,75 \pm 1,18	96,00 \pm 0,82
N ₁₀	97,50 \pm 0,87	96,25 \pm 1,11	96,00 \pm 1,35
N ₁₀₀	95,50 \pm 1,32	94,75 \pm 1,75	94,00 \pm 0,71
RD	94,00 \pm 2,04	94,25 \pm 0,75	93,75 \pm 1,55
RD N ₁	96,25 \pm 1,80	97,00 \pm 0,71	95,50 \pm 0,65
RD N ₁₀	96,50 \pm 1,04	95,25 \pm 1,65	94,75 \pm 1,03
RD N ₁₀₀	93,75 \pm 0,63	93,25 \pm 0,48	92,25 \pm 1,31
Gli	97,00 \pm 1,41	95,25 \pm 1,49	96,75 \pm 1,11
Gli N ₁	97,00 \pm 0,91	96,50 \pm 0,87	94,75 \pm 0,85
Gli N ₁₀	95,75 \pm 0,95	94,50 \pm 0,87	93,75 \pm 1,38
Gli N ₁₀₀	96,25 \pm 1,25	92,75 \pm 0,85	92,75 \pm 1,25

4.3.5. Ensaio do MTT

Os resultados do ensaio do MTT indicaram que a viabilidade metabólica mitocondrial das células ZFL expostas às concentrações de 1, 10 e 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de goethita (N₁, N₁₀ e N₁₀₀) não mostraram diferença significativa quando comparado com o CTR para o tempo de 1 e 12 h. No entanto, os tratamentos N₁ e N₁₀ se mostraram citotóxicos para o tempo de 6 h, resultando em diminuição significativa na VM das células (Fig. 10A).

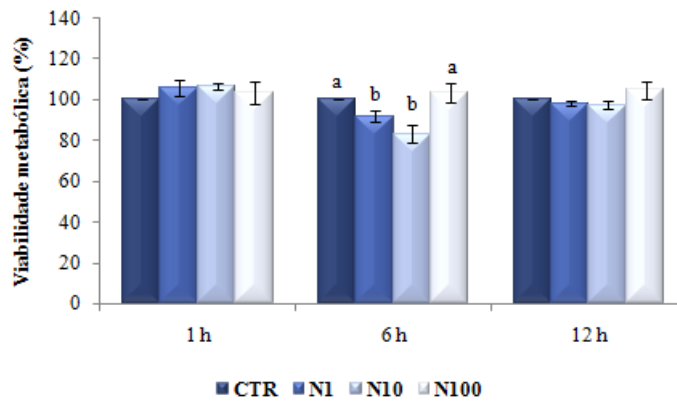
Nas células ZFL expostas ao Roundup[®], na ausência (RD) ou na presença das NPs (RD N₁, RD N₁₀ e RD N₁₀₀), foi possível verificar que, para o tempo de 6 h, todos os tratamentos resultaram em diminuição significativa na VM, quando comparado com o CTR e ainda, que a associação às NPs de goethita não reverteu a citotoxicidade causada pelo RD. Pelo contrário, as concentrações de NPs utilizadas parecem ter influenciado negativamente essa

citotoxicidade, visto que os tratamentos N_1 e N_{10} também resultaram em diminuição na VM mitocondrial. Ainda, a diminuição mais pronunciada na VM foi verificada para a co-exposição RD N_{10} . Com relação a esses mesmos tratamentos, nenhuma alteração na VM foi observada para os tempos de 1 e 12 h (Fig. 10B).

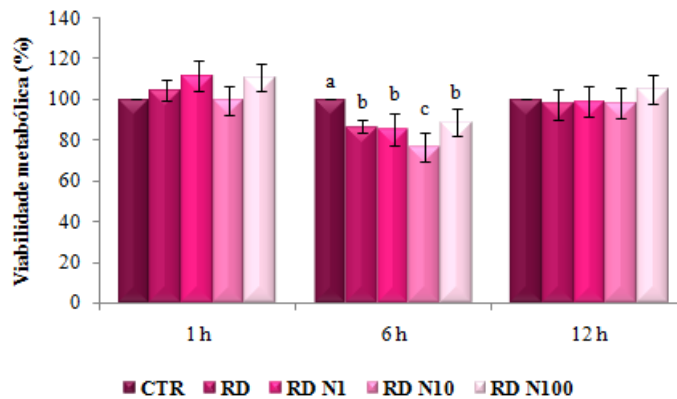
As ZFL expostas ao glifosato, tanto isolado (Gli) quanto em associação com as NPs (Gli N_1 , Gli N_{10} e Gli N_{100}) não apresentaram alterações significativas na VM mitocondrial, para nenhum dos tempos experimentais testados. Neste caso, mesmo as concentrações de NPs utilizadas terem tido efeito citotóxico quando isoladas, em associação com o glifosato este efeito desapareceu (Fig. 10C).

Figura 10 – Resultados (média \pm EP) do ensaio de viabilidade metabólica mitocondrial na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) após 1, 6 e 12 h de exposição apenas ao PBS Dulbecco (CTR) ou A) às concentrações de 1, 10 e 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de goethita (N₁, N₁₀ e N₁₀₀) (n=8); B) à concentração de 10 mg L⁻¹ de Roundup® (RD) e à co-exposição (RD N₁, RD N₁₀ e RD N₁₀₀) (n=4); C) à concentração de 3,6 mg L⁻¹ de glifosato (Gli) e à co-exposição (Gli N₁, Gli N₁₀ e Gli N₁₀₀) (n=4). As letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos para um mesmo tempo experimental (P < 0,05).

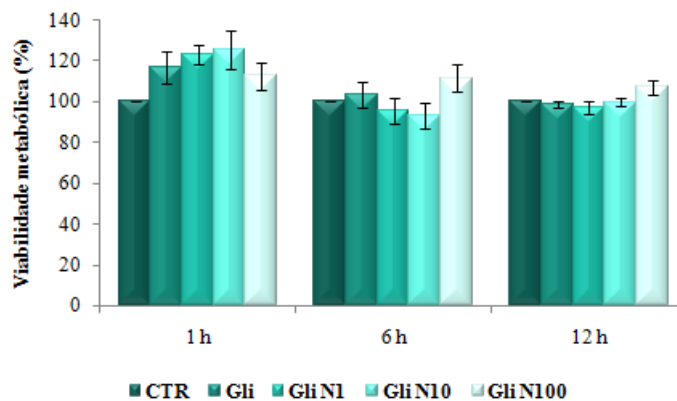
A)



B)



C)



4.3.6. Teste do VN

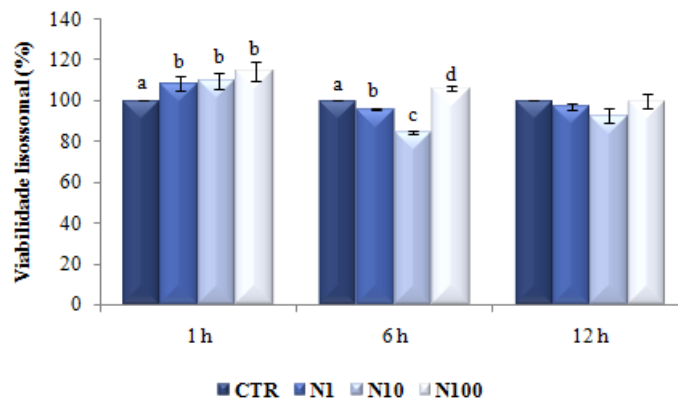
Com relação à viabilidade lisossomal (VL), os resultados indicaram que N₁, N₁₀ e N₁₀₀ promoveram aumento significativo para o tempo de 1 h, enquanto que para o tempo de 6 h, os tratamentos N₁ e N₁₀ foram citotóxicos, resultando em diminuição na VL. Além disso, a citotoxicidade de N₁₀ foi mais pronunciada. Apenas no tratamento N₁₀₀ as ZFL mantiveram aumento significativo da VL, quando comparado com o CTR, no tempo de 6 h. Para estes mesmos tratamentos, nenhuma alteração foi observada para o tempo de 12 h (Fig. 11A).

Nos tratamentos contendo Roundup[®] foi possível verificar que apenas RD não promoveu alterações significativas na VL das ZFL, porém a co-exposição RD N₁₀ resultou em redução significativa da VL no tempo de 6 h. Dessa forma, a concentração de 10 mg L⁻¹ de NPs, que foi citotóxica para as células ZFL, parece influenciar negativamente a citotoxicidade da co-exposição. Para os tempos de 1 e 12 h nenhuma alteração neste parâmetro foi encontrada (Fig. 11B).

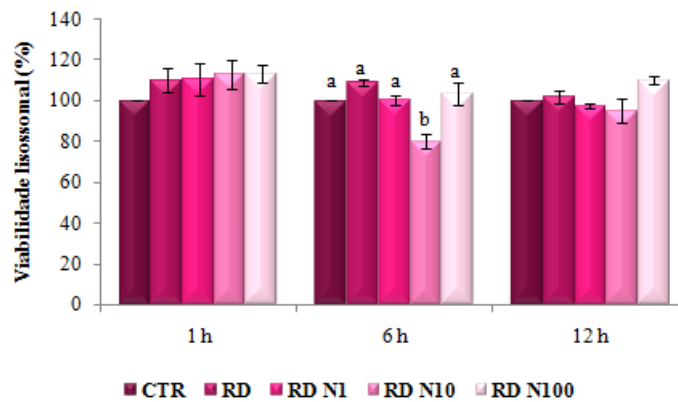
Quando os tratamentos contendo glifosato foram avaliados, o mesmo padrão para o ensaio do MTT se repetiu: o glifosato e as co-exposições não promoveram alterações na VL das células ZFL para nenhum dos tempos experimentais testados. Assim, apesar das NPs terem tido efeito citotóxico quando isoladas, em associação ao glifosato este efeito desapareceu (Fig. 11C).

Figura 11 – Resultados (média \pm EP) do ensaio de viabilidade lisossomal na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) após 1, 6 e 12 h de exposição apenas ao PBS Dulbecco (CTR) ou A) às concentrações de 1, 10 e 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de goethita (N₁, N₁₀ e N₁₀₀) (n=8); B) à concentração de 10 mg L⁻¹ de Roundup® (RD) e à co-exposição (RD N₁, RD N₁₀ e RD N₁₀₀) (n=4); C) à concentração de 3,6 mg L⁻¹ de glifosato (Gli) e à co-exposição (Gli N₁, Gli N₁₀ e Gli N₁₀₀) (n=4). As letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos para um mesmo tempo experimental (P < 0,05).

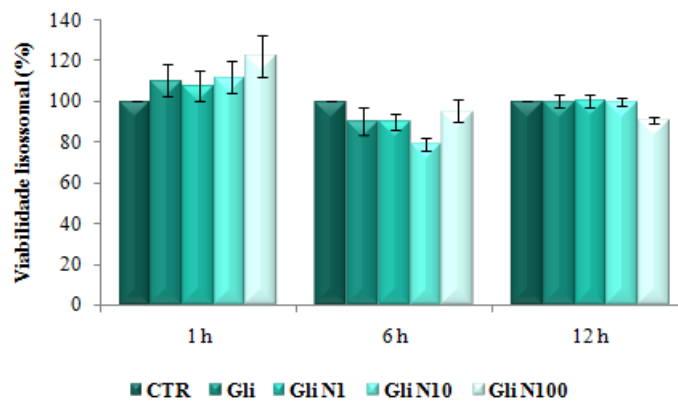
A)



B)



C)

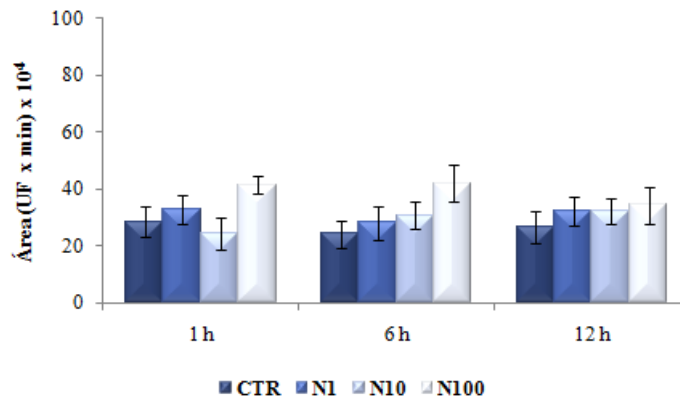


4.3.7. Geração de ERO

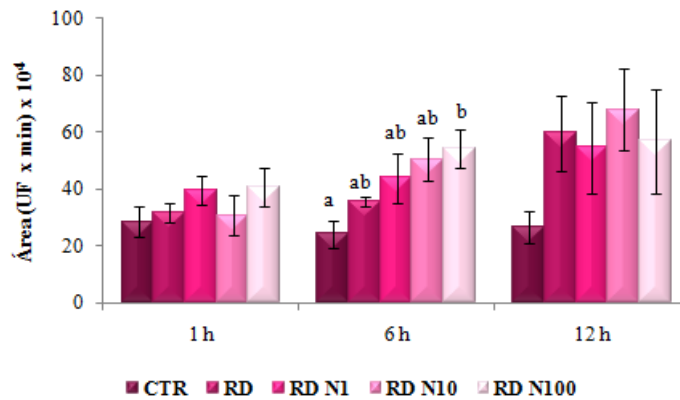
Quanto à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), os resultados não indicaram alterações significativas para nenhuma concentração de NPs e tempos testados (Fig. 12A). A exposição apenas ao RD também não promoveu alteração significativa na geração de ERO, para nenhum dos tempos testados. No entanto, a co-exposição RD N₁₀₀ resultou em aumento significativo de ERO para o tempo de 6 h. Nos demais tempos nenhum dos tratamentos resultou em alteração significativa neste parâmetro (Fig. 12B). Em nenhum dos tratamentos avaliados contendo glifosato verificou-se alteração na geração de ERO, para nenhum dos tempos testados (Fig. 12C).

Figura 12 – Resultados (média \pm EP) da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) após 1, 6 e 12 h de exposição apenas ao PBS Dulbecco (CTR) ou A) às concentrações de 1, 10 e 100 mg L^{-1} de nanopartículas de goethita (N₁, N₁₀ e N₁₀₀) (n=4); B) à concentração de 10 mg L^{-1} de Roundup® (RD) e à co-exposição (RD N₁, RD N₁₀ e RD N₁₀₀) (n=4); C) à concentração de 3,6 mg L^{-1} de glifosato (Gli) e à co-exposição (Gli N₁, Gli N₁₀ e Gli N₁₀₀) (n=4). As letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos para um mesmo tempo experimental ($P < 0,05$).

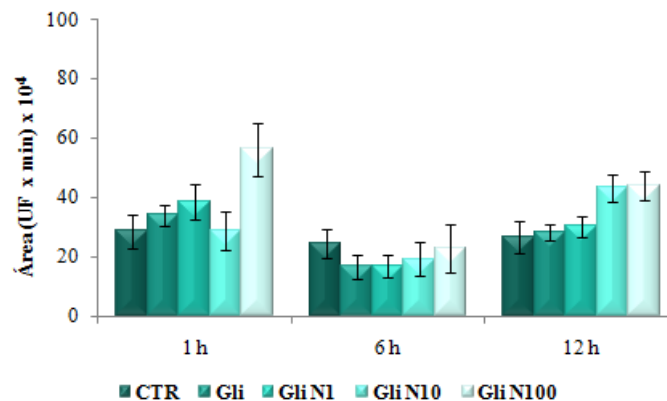
A)



B)



C)



4.3.8. Capacidade antioxidante total (CAOT)

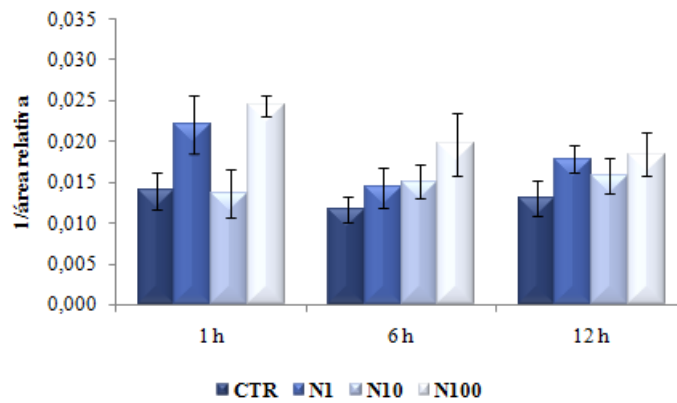
Com relação à capacidade antioxidante total (CAOT), os resultados não indicaram alterações significativas para nenhuma concentração de NPs e tempos testados quando comparado com o CTR (Fig. 13A).

Quanto aos resultados para os tratamentos contendo Roundup[®] foi possível observar que o tratamento apenas com RD não promoveu diferença significativa para nenhum dos tempos testados. No entanto, apesar das concentrações de NPs utilizadas não terem tido nenhum efeito neste parâmetro, a associação RD N₁ e RD N₁₀₀ resultou em aumento na CAOT das células ZFL para o tempo de 1 h. Para os demais tempos, nenhuma alteração significativa foi observada (Fig. 13B).

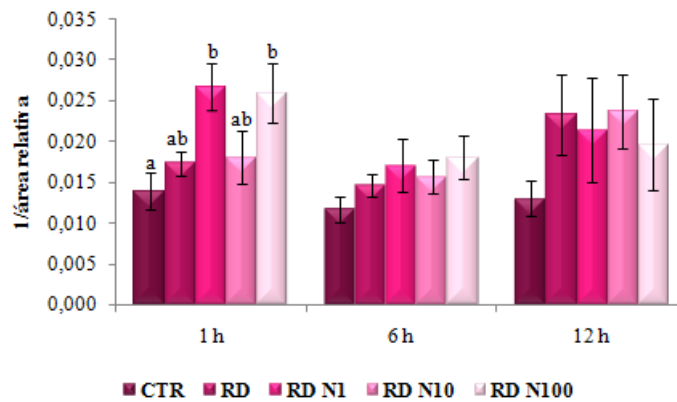
Os resultados obtidos para o glifosato e co-exposições mostraram que apenas o Gli não promoveu alterações significativas na CAOT, em nenhum dos tempos testados, no entanto, as ZFL expostas ao Gli N₁ apresentaram aumento significativo na CAOT, apenas no tempo de 1 h. Para os demais tempos experimentais, nenhuma alteração neste parâmetro foi observada (Fig. 13C).

Figura 13 – Resultados (média \pm EP) da capacidade antioxidante total (CAOT) na linhagem celular de *Danio rerio* (ZFL) após 1, 6 e 12 h de exposição apenas ao PBS Dulbecco (CTR) ou A) às concentrações de 1, 10 e 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de goethita (N₁, N₁₀ e N₁₀₀) (n=4); B) à concentração de 10 mg L⁻¹ de Roundup® (RD) e à co-exposição (RD N₁, RD N₁₀ e RD N₁₀₀) (n=4); C) à concentração de 3,6 mg L⁻¹ de glifosato (Gli) e à co-exposição (Gli N₁, Gli N₁₀ e Gli N₁₀₀) (n=4). As letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos para um mesmo tempo experimental (P < 0,05).

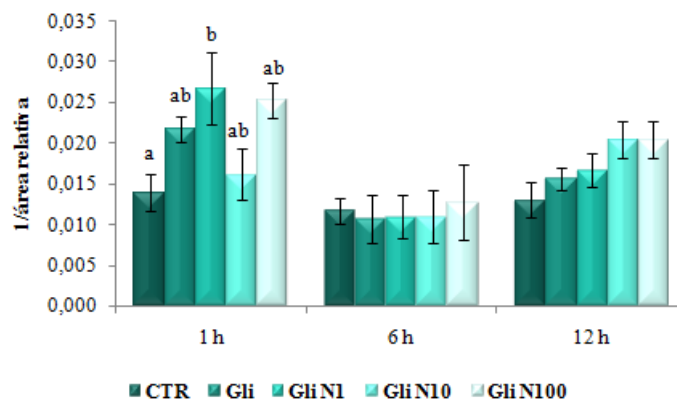
A)



B)



C)



4.3.9. Ensaio do Cometa

Os resultados obtidos para o ensaio do cometa para os tratamentos CN e CP revelaram que, em todos os tempos experimentais, as células ZFL expostas ao MMS (CP) apresentaram escore de danos no DNA significativamente maiores que seus respectivos CN (Fig. 13A, B e C). A utilização de um controle positivo (CP) assegura que o teste em questão foi realizado de acordo com os padrões estabelecidos, permitindo identificar de forma inequívoca uma resposta positiva. Desse modo, os resultados deste ensaio mostraram a eficiência do procedimento, validando a metodologia empregada.

Com relação aos resultados de exposição às NPs, foi detectado um aumento significativo nos danos no DNA nas células ZFL expostas a N_1 e N_{10} durante 1 h. Por outro lado, os tratamentos N_{10} e N_{100} foram genotóxicos para o tempo de 6 h. Quando o tempo de 12 h foi analisado, nenhuma alteração no DNA foi observada (Fig. 14A).

Todos os tratamentos contendo Roundup[®] (RD, RD N_1 , RD N_{10} e RD N_{100}) resultaram em aumento significativo no escore de danos no DNA em relação ao CN para o tempo de 1 h, no entanto, a genotoxicidade das co-exposições RD N_1 , RD N_{10} e RD N_{100} foram mais pronunciadas. Já para o tempo de 6 h, apenas os tratamentos RD e RD N_{100} promoveram um aumento significativo nos danos no DNA das ZFL. Entretanto, no tempo de 12 h apenas as co-exposições resultaram em aumento significativo no escore de danos, sendo os tratamentos RD N_1 e RD N_{100} aqueles que promoveram os maiores danos (Fig. 14B).

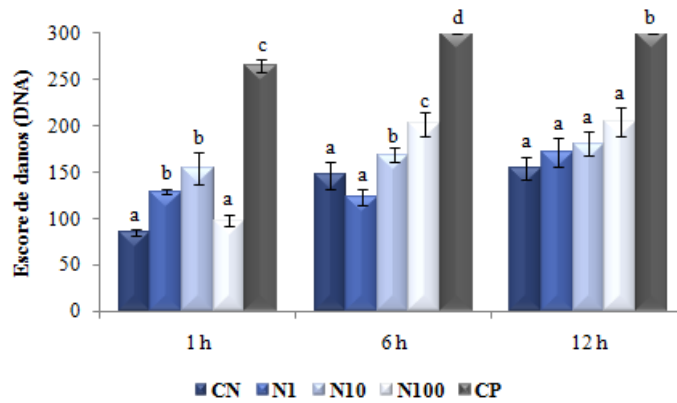
Para os tratamentos contendo glifosato, os resultados indicaram que tanto o tratamento Gli como os tratamentos de co-exposição (Gli N_1 , Gli N_{10} e Gli N_{100}) não promoveram alterações significativas em nenhum dos tempos avaliados quando comparado com seu respectivo CN (Fig. 14C).

A Tabela 3 apresenta o percentual de nucleóides observados em cada classe de dano de cometa e o número total de nucleóides danificados. De forma geral, os dados indicam um aumento significativo no número de nucleóides danificados das células ZFL em comparação com o CTR quando expostas aos tratamentos N_1 , N_{10} , N_{100} , RD, RD N_1 , RD N_{10} e RD N_{100} para o tempo de 1 h. Ainda para este mesmo tempo experimental, o tratamento Gli e as co-exposições (Gli N_1 , Gli N_{10} e Gli N_{100}) não diferiam significativamente em relação ao CN. Para o tempo de 6 h, foi observado que os tratamentos N_{100} , RD e a co-exposição RD N_{100} resultaram em aumento significativo no número de nucleóides danificados, no entanto, para o período experimental de 12 h, apenas RD N_1 e RD N_{100} resultaram em aumento significativo quando comparado com o respectivo CN. Com relação aos resultados obtidos para o Gli e as

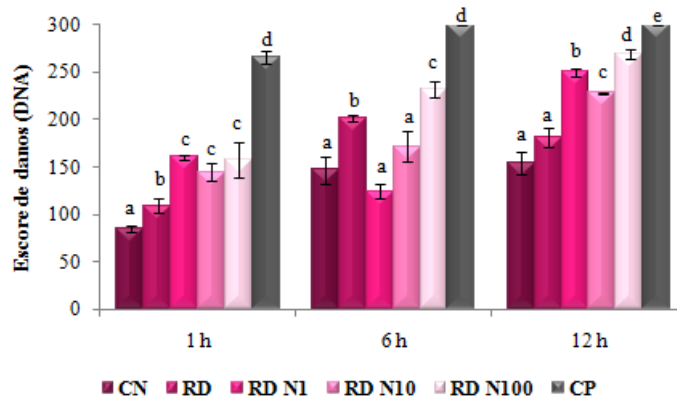
suas co-exposições (Gli N₁, Gli N₁₀ e Gli N₁₀₀) nenhuma diferença significativa foi verificada quanto ao número de nucleóides danificados para nenhum dos tempos experimentais testados quando comparado com o respectivo CN. Para todos os resultados significativos com relação ao número de nucleóides danificados observados, verificou-se o predomínio de nucleóides de classe 3.

Figura 14 – Resultados (média \pm EP) do escore de danos no DNA na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) após 1, 6 e 12 h de exposição apenas ao PBS Dulbecco (Controle Negativo ou CN), à concentração de 0,5 mM de MMS (Controle Positivo ou CP) ou A) às concentrações de 1, 10 e 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de goethita (N₁, N₁₀ e N₁₀₀) (n=4); B) à concentração de 10 mg L⁻¹ de Roundup® (RD) e à co-exposição (RD N₁, RD N₁₀ e RD N₁₀₀) (n=4); C) à concentração de 3,6 mg L⁻¹ de glifosato (Gli) e à co-exposição (Gli N₁, Gli N₁₀ e Gli N₁₀₀) (n=4). As letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos para um mesmo tempo experimental (P < 0,05).

A)



B)



C)

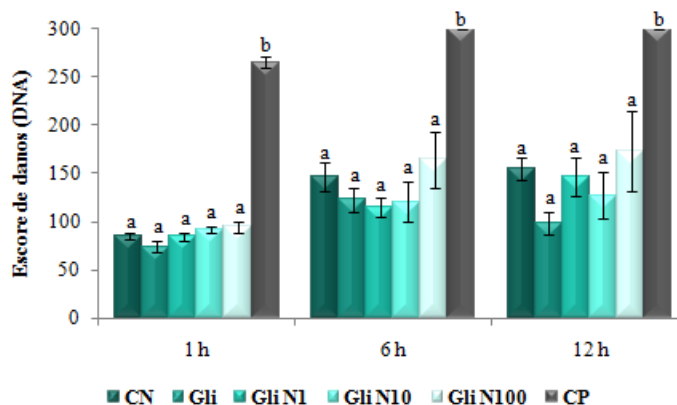


Tabela 3 – Frequência (%) de nucleóides observados em cada classe de dano do cometa (0, 1, 2 e 3) e o número total de nucleóides danificados (média ± EP, n = 4) na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) após 1, 6 e 12 h de exposição apenas ao PBS Dulbecco (Controle Negativo ou CN) ou às concentrações de: 0,5 mM de MMS (Controle Positivo ou CP), 1, 10 e 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de goethita (N₁, N₁₀ e N₁₀₀), 10 mg L⁻¹ de Roundup® (RD), 3,6 mg L⁻¹ de glifosato (Gli) e às co-exposições RD N₁, RD N₁₀ e RD N₁₀₀ e Gli N₁, Gli N₁₀ e Gli N₁₀₀. As letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos para um mesmo tempo experimental (P < 0,05).

Tempo	Tratamentos	Classes de danos (%)				Nucleóides danificados (média ± EP)
		0	1	2	3	
1 h	CN	59,25	6,00	25,00	9,75	40,75 ± 1,75 A
	CP	0,50	7,50	18,25	73,75	99,50 ± 0,29 C
	N ₁	47,75	5,50	16,50	30,25	52,25 ± 1,18 B
	N ₁₀	38,50	8,50	13,00	40,00	61,50 ± 5,63 B
	N ₁₀₀	50,75	17,00	15,75	16,50	49,25 ± 4,94 B
	RD	49,75	11,75	18,00	20,50	50,25 ± 2,87 B
	RD N ₁	41,50	4,25	6,50	47,75	58,50 ± 1,71 B
	RD N ₁₀	43,75	5,75	12,25	38,25	56,25 ± 2,98 B
	RD N ₁₀₀	35,75	10,50	14,25	39,50	64,25 ± 5,17 B
	Gli	64,00	10,75	12,75	12,50	36,00 ± 4,42 A
	Gli N ₁	60,75	9,00	14,75	15,50	39,25 ± 4,27 A
	Gli N ₁₀	55,25	10,50	21,25	13,00	44,75 ± 1,89 A
Gli N ₁₀₀	59,75	6,50	13,25	20,50	40,25 ± 2,50 A	
6 h	CN	35,00	14,00	20,00	31,00	65,00 ± 5,40 A
	CP	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00 ± 0,00 D
	N ₁	42,25	15,75	18,00	24,00	57,75 ± 2,02 A
	N ₁₀	30,75	9,00	20,75	39,50	69,25 ± 4,21 A
	N ₁₀₀	20,00	10,75	16,50	52,75	80,00 ± 4,53 B
	RD	16,75	13,25	21,75	48,25	83,25 ± 2,10 B
	RD N ₁	44,50	10,25	21,75	23,50	55,50 ± 4,79 A
	RD N ₁₀	33,00	10,00	9,50	47,50	67,00 ± 2,80 A
	RD N ₁₀₀	13,25	4,50	19,50	62,75	86,75 ± 2,25 C
	Gli	50,50	6,00	13,75	29,75	49,50 ± 5,25 A
	Gli N ₁	54,00	4,75	14,00	27,25	46,00 ± 3,14 A
	Gli N ₁₀	49,50	6,50	18,25	25,75	50,50 ± 6,20 A
Gli N ₁₀₀	32,25	9,50	19,75	38,50	67,75 ± 6,61 A	
12 h	CN	27,50	22,00	19,25	31,25	72,50 ± 5,95 AC
	CP	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00 ± 0,00 E
	N ₁	31,50	11,00	12,00	45,50	68,50 ± 4,09 AC
	N ₁₀	28,00	9,75	15,75	46,50	72,00 ± 3,70 AC
	N ₁₀₀	24,50	6,00	10,25	59,25	75,50 ± 2,99 AC
	RD	29,25	11,50	8,25	51,00	70,75 ± 3,07 AC
	RD N ₁	8,75	8,50	6,75	76,00	91,25 ± 2,46 B
	RD N ₁₀	17,00	6,00	9,00	68,00	83,00 ± 1,47 C
	RD N ₁₀₀	3,75	3,25	13,00	80,00	96,25 ± 2,17 D
	Gli	56,50	9,50	12,50	21,50	43,50 ± 5,17 A
	Gli N ₁	37,50	9,50	21,50	31,50	62,50 ± 7,56 AC
	Gli N ₁₀	49,25	6,50	11,75	32,50	50,75 ± 9,72 A
Gli N ₁₀₀	36,00	4,75	9,25	50,00	64,00 ± 12,88 AC	

4.4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho evidenciam a citotoxicidade e a genotoxicidade das NPs de goethita para as células ZFL, bem como a potencialização dos efeitos tóxicos do produto formulado Roundup[®] quando em associação com esse nanomaterial. Portanto, esses dados nos levam a concluir que as concentrações de NPs de goethita utilizadas não se mostraram seguras para a linhagem celular ZFL. Considerando a escassez de trabalhos que investigam os possíveis efeitos tóxicos das NPs de goethita para organismos aquáticos, nosso estudo é extremamente significativo, pois avalia os mecanismos de ação desse nanomaterial em nível celular. Além disso, estudos como esse são relevantes, pois favorecem a discussão e a investigação de estratégias que visam determinar concentrações de NPs ambientalmente seguras e que resultem em uma ferramenta eficaz na remoção de contaminantes de ecossistemas aquáticos poluídos.

Diversos trabalhos têm relatado que a incorporação de nanopartículas depende do seu tamanho, forma e sua superfície de revestimento (Gupta e Gupta, 2005; Ge et al., 2009; Cho et al., 2010; Ying e Hwang, 2010), não levando em consideração os possíveis efeitos da sedimentação dessas partículas. No presente trabalho, observou-se a aglomeração e sedimentação das NPs de goethita na maior concentração, tanto isolada quanto em associação ao Roundup[®] e ao glifosato. De acordo com Singh et al. (2010), as nanopartículas de óxidos de ferro não revestidas tem baixa solubilidade, podendo resultar em precipitação e alta taxa de aglomeração em condições fisiológicas. Desta forma, as NPs podem se sedimentar rapidamente, podendo formar agregados no meio de cultura que, além de mudar suas características físicas, resultam em uma exposição maior de NPs quando comparado com o valor inicial (Cho et al., 2011). Os resultados evidenciaram também que os tratamentos contendo N₁₀₀ provocaram alteração na morfologia e adesão das células ZFL para os três tempos avaliados. A adesão celular é de fundamental importância, pois é responsável por uma gama de funções celulares, como o crescimento celular, migração, diferenciação, sobrevivência e organização tecidual (Gupta et al., 2004).

Para ensaios *in vitro* com células aderentes, a adesão celular ocorre por meio de forças eletrostáticas, resultante do tratamento prévio dos frascos de cultura para que estes desenvolvam uma carga negativa, e da interação dessas cargas com glicoproteínas de adesão e com cátions divalentes, como Ca⁺² e Mg⁺² (Alves e Guimarães, 2009). Possivelmente, uma interação das NPs de goethita com a carga residual dos frascos de cultura pode ter sido prejudicial para a manutenção da adesão celular da linhagem ZFL durante os períodos de

exposição. Ainda, dependendo das propriedades físicas e químicas das NPs, uma resposta biofísica pela sua incorporação pode ser gerada, podendo resultar em alterações na membrana plasmática como mudanças de elasticidade celular, morfologia, mobilidade, adesão, bloqueio de proteínas de membrana e rompimento da membrana plasmática (Frönlich, 2013; Wu et al., 2013; Schirmer, 2014). Com relação aos ensaios de citotoxicidade abordados no presente trabalho, alterações associadas ao rompimento da membrana plasmática não foram verificadas para nenhum dos tratamentos avaliados, quando se empregou o teste de exclusão com azul de Tripán. Em decorrência da sua grande área superficial e alta reatividade, as NPs têm uma probabilidade maior em atravessar membranas biológicas, podendo causar alterações nas principais funções de componentes celulares como mitocôndrias, núcleo e DNA (Singh et al., 2010). As NPs podem atravessar a bicamada lipídica através de mecanismos de incorporação celular, como a endocitose (Huefner et al., 2014; Rees, 2014) e, uma vez internalizadas, podem sofrer o processo de dissolução ácida dentro dos lisossomos, como já foi demonstrado para NPs de óxido de zinco (Xia et al., 2008). Visto sua alta solubilidade em pH baixo, NPs de óxido de ferro podem se dissolver no meio ácido lisossomal, sugerindo que seu efeito tóxico dentro da célula seja, pelo menos em parte, decorrente da liberação de íons de Fe livres.

O ferro é conhecido por promover a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), através de reações como as de Fenton e Haber-Weiss, as quais podem promover danos em lipídios, proteínas e DNA (Valko et al., 2005; Park e Park, 2011; Brissot et al., 2012). Estudos reportam que o excesso de íons de Fe livres nas células pode levar a um desequilíbrio na sua homeostase, podendo causar respostas celulares como a citotoxicidade, danos no DNA, estresse oxidativo, eventos epigenéticos e processos inflamatórios (Singh et al., 2010).

Com relação aos resultados de MTT e VN, foi verificado que, após 6 h de exposição, as concentrações de 1 e 10 mg L⁻¹ de goethita se mostraram citotóxicas, provocando uma redução tanto na atividade metabólica mitocondrial quanto na lisossomal. Segundo Karlsson et al., (2008), concentrações de NPs de óxido de ferro (hematita e magnetita) abaixo de 100 mg L⁻¹ se mostraram seguras e não citotóxicas para a linhagem celular A549 de epitélio pulmonar humano. Em contrapartida, no trabalho de Bhattacharya et al. (2012), concentrações acima de 50 mg L⁻¹ para as NPs de hematita já se mostraram citotóxicas e genotóxicas para testes *in vitro* com células epiteliais brônquicas humanas. Em conjunto, esses resultados indicam que a citotoxicidade das NPs de ferro vai depender do tipo de óxido de ferro e da célula avaliada.

Sabe-se também que NPs catiônicas se mostram mais citotóxicas *in vitro* quando comparadas com NPs neutras ou aniônicas, uma vez que a interação da carga da superfície das NPs com a face interna da membrana lisossomal pode resultar em dano lisossomal (Asati et al., 2010; Cho et al., 2012). Por sua vez, a liberação de íons de Fe livres e, por consequência, o aumento dos níveis desse metal no citoplasma podem provocar desestabilização mitocondrial, podendo resultar em ativação de mecanismos de morte celular como a apoptose (Levi e Rovida, 2009; Park e Park, 2011; Frönlich, 2013). Embora a atividade citotóxica para partículas de óxido de metal esteja frequentemente associada com um aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Nel et al., 2006), nenhuma alteração significativa foi encontrada para os parâmetros de ERO e CAOT para as células ZFL expostas as NPs de goethita no presente trabalho. Assim, a citotoxicidade observada no nosso estudo para o tempo de 6 h pode estar relacionada tanto com a carga superficial desse nanomaterial como também com aumento dos níveis de ferro no citoplasma celular.

O grau de integridade do DNA tem sido proposto como um indicador sensível de genotoxicidade e um biomarcador efetivo para o monitoramento ambiental (Frenzilli et al., 2004). Um agente que interage com a molécula de DNA, causando danos genotóxicos ou mutagênicos e escolhido para constituir o controle positivo (CP) do ensaio do cometa *in vitro* foi o metil metanosulfonato (MMS). Este agente tóxico foi selecionado para este tipo de experimento porque interage com a molécula de DNA sem a necessidade de ativação metabólica (Tice et al., 2000). Nossos resultados mostraram que o MMS interagiu com a molécula de DNA das células ZFL, dando origem a danos superiores aos encontrados no CN em todos os tempos experimentais avaliados, validando assim o emprego deste ensaio *in vitro*.

Com relação à genotoxicidade, as concentrações de 1 e 10 mg L⁻¹ de NPs para o tempo de 1 h e as concentrações de 10 e 100 mg L⁻¹ de NPs de goethita para o tempo de 6 h tiveram potencial genotóxico para a linhagem celular ZFL. Danos no DNA têm sido reportados por NPs de óxido de ferro em diferentes linhagens celulares, sendo as concentrações dessas NPs bem variadas (Auffann et al., 2006; Bhattacharya et al., 2012). A grande maioria dos trabalhos reporta que o dano no DNA causado por exposição à nanopartículas é indireto, resultante da formação de ERO. No entanto, como nenhuma alteração neste parâmetro foi encontrada no presente trabalho, sugere-se que os danos no DNA nas células ZFL sejam decorrentes de danos diretos das NPs de goethita. De acordo com o trabalho de Singh et al. (2010), nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) podem provocar danos diretos no DNA por mecanismos ainda desconhecidos.

Entre os efeitos descritos para peixes, a genotoxicidade do Roundup® tem sido apontada como um dos mais prejudiciais (Cavalcante et al., 2008; Ghisi e Cestari, 2013; Marques et al., 2014). Quando se analisa os efeitos resultantes da exposição das ZFL ao Roundup® foi possível verificar que este se mostrou citotóxico, conforme indicado pelo ensaio do MTT para o tempo de 6 h. O Roundup® também se mostrou genotóxico para o tempo de 1 e 6 h para as células ZFL. Cavalcante et al. (2008), utilizando peixes da espécie *Prochilodus lineatus*, expostos a 10 mg L⁻¹ do Roundup®, obtiveram aumento significativo nos danos no DNA após 6 e 96 h de exposição para eritrócitos e 6 e 24 h para brânquias, corroborando seu efeito genotóxico para células de peixe. Os danos no DNA das células ZFL retornaram aos níveis do CTR após 12 h e, isso pode indicar uma possível ativação do sistema de reparo do DNA, atuando para reparar as quebras ocasionadas pela exposição ao produto formulado Roundup®. O sistema de reparo do DNA é um fator importante na prevenção de danos genéticos graves, como mutações, quebras no DNA e aberrações cromossômicas (Marques et al., 2014). Embora este teste não possibilite inferir com fidedignidade o processo de reparo, o teste do cometa é utilizado para detectar lesões genômicas que são passíveis de correção.

Considerando-se a exposição ao Roundup® na presença das NPs de goethita, foi possível constatar que a associação se mostrou citotóxica, tanto para o ensaio do MTT quanto para o VN, promoveu aumento na geração de ERO e na CAOT, assim como teve potencial genotóxico. Com relação à genotoxicidade, nota-se que este efeito esteve presente inclusive para o maior tempo de exposição. De acordo com esses resultados, é possível assumir que a presença de NPs de goethita potencializou os efeitos tóxicos do produto formulado, provavelmente por atuar como “cavalo de Tróia”. Este conceito implica em uma entrada facilitada de moléculas tóxicas adsorvidas por nanomateriais nas células, pois devido às características físico-químicas das nanopartículas, estes podem servir como carreadores, inclusive para contaminantes, aumentando a concentração intracelular desses compostos e, conseqüentemente, a sua potencial toxicidade (Choi et al., 2007; Limbach et al., 2007; Costa et al., 2012).

Quando os resultados referentes à exposição ao glifosato foram analisados, foi possível constatar que o glifosato não teve efeito citotóxico, não promoveu estresse oxidativo e não teve potencial genotóxico para as células ZFL. Possivelmente, a falta de efeitos do glifosato para a linhagem celular ZFL se deva a concentração utilizada de 3,6 mg L⁻¹ de glifosato (0,021,3 mM), que é menor que a concentração recomendada (10 mM) para a verificação de efeitos deste herbicida em ensaios *in vitro* para células de mamíferos (Kier e Kirkland, 2013). Segundo a revisão destes autores, respostas positivas de genotoxicidade, detectadas pelo

ensaio do cometa *in vitro* para o glifosato, são encontradas em trabalhos que utilizam concentrações na faixa milimolar.

Apesar das NPs isoladas terem resultado em efeitos citotóxicos e genotóxicos para as células, quando se avaliou a co-exposição de NPs e glifosato, nenhum efeito de toxicidade foi observado para a linhagem ZFL. Alguns trabalhos reportam que a presença de aminoácidos durante a síntese de nanopartículas pode resultar em mudança de tamanho e forma desses nanomateriais. Carneiro et al. (2013), através de imagens de microscopia eletrônica de varredura, observaram que a adição de cisteína durante a síntese de goethita resultava em agregados tanto de cristais esféricos como de cristais aciculares, demonstrando a síntese de hematita e goethita, respectivamente. Portanto, quando se analisa os resultados da associação no presente trabalho, presume-se que a adsorção do glifosato pelas NPs resultou em mudanças na forma dessas NPs e, conseqüentemente, alterou o resultado da toxicidade das mesmas para a linhagem celular ZFL.

Por fim, considerando-se os efeitos de toxicidade do glifosato e do Roundup[®] obtidos no presente trabalho, foi possível verificar que o produto formulado foi mais tóxico para as células ZFL, sugerindo que a presença de outros compostos em sua formulação, como o surfactante POEA, pode ter um papel importante na toxicidade do herbicida Roundup[®]. Quando a toxicidade de todos os compostos presentes na formulação do herbicida Roundup[®] foi analisada em sete organismos aquáticos, foi observado que a ordem de toxicidade dos agentes químicos foi: POEA > Roundup[®] > glifosato > sal de isopropilamina de glifosato (IPA), apontado que a toxicidade do produto formulado, para organismos aquáticos, pode ser atribuída ao surfactante POEA (Tsui e Chu, 2003). Em outro trabalho, a contribuição relativa do glifosato e do POEA para a genotoxicidade do Roundup[®] foi avaliada, através de biomarcadores genéticos para a espécie de peixe *Anguilla anguilla*, e foi apontado que o potencial genotóxico do herbicida está diretamente relacionado com a genotoxicidade do surfactante POEA (Guilherme et al., 2012). Da mesma forma, Navarro e Martinez (2014) evidenciaram o aumento significativo de danos no DNA de eritrócitos do peixe *Prochilodus lineatus* após exposição ao POEA, sustentando o caráter genotóxico deste surfactante.

Em resumo, o presente trabalho mostrou que, nas concentrações e tempos experimentais utilizados, as NPs de goethita tiveram efeitos citotóxicos e genotóxicos para a linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL), bem como intensificaram a toxicidade do produto formulado Roundup[®] quando em associação. Por sua vez, o herbicida Roundup[®] teve potencial citotóxico e genotóxico para as células ZFL e, visto a falta de efeitos tóxicos do glifosato, é possível sugerir que a presença do surfactante POEA na composição do produto

formulado deve favorecer a toxicidade deste herbicida quando comparado com o ingrediente ativo glifosato. Assim, este trabalho contribui para o conhecimento dos efeitos tóxicos gerados por nanopartículas de óxido de ferro e, segundo o modelo *in vitro*, sugere que sua utilização em programas de remediação ambiental deve ser feita com cautela.

Agradecimentos

À Dr^a Cristine E.A. Carneiro e Dr. Dimas A.M. Zaia pelo fornecimento da goethita. Ao Dr. Wagner E. Risso pelo auxílio nas análises de ferro. À Fundação Araucária e CNPq (PRONEX: 24732/2012), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq: 573949/2008-5) pelo apoio financeiro. A CAPES pela concessão de bolsa de mestrado para N.D.G. da Silva e ao CNPq pela bolsa pesquisador para C.B.R. Martinez. Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado de N.D.G. da Silva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina

Referências

- Adams, M., 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Maryland, USA: American Fisheries Society Bethesda.
- Alves, E.A. e Guimarães, A.C.R., 2009. Cultivo celular. In: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Fundação Oswaldo Cruz 2, 215 – 253. Disponível em: www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo_5_vol2.pdf
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalorf, B., Ferreira, L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115 - 2123.
- Amarante, O.P.J., Santos, T.C.R., Brito, N.M., Ribeiro, M.L., 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova* 25, 589 – 593.
- Armas, E.D., Monteiro, R.T.R., Antunes, P.M., Santos, M.A.P.F., Camargo, P.B., 2007. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. *Química Nova* 30, 1119 – 1127.
- Asati, A., Santra, S., Kaittanis, C., Perez, J. M., 2010. Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano* 4, 5321 – 5331.
- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., Meo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-Lefranc, J., Botta, A., Wiesner, M., Bottero, J., 2006. *In vitro* interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environ. Sci. Technol.* 20, 4367 – 4373.
- Barja, B.C. e dos Santos Afonso, M., 2005. Aminomethylphosphonic acid and glyphosate onto goethite: a comparative study. *Environ. Sci. Technol.* 39, 585 – 592.

- Bhaskara, B.L. e Nagaraja, P., 2006. Direct sensitive spectrophotometric determination of glyphosate by using ninhydrin as a chromogenic reagent in formulations and environmental water samples. *Helv. Chim. Acta* 89, 2686 – 2693.
- Bhattacharya, K., Hoffmann, E., Schins, R.F.P., Boertz, J., Prantl, E., Alink, G.M., Byrne, H. J., Kuhlbusch, T.A.J., Rahman, Q., Wiggers, H., Schulz, C., Dopp, E., 2012. Comparison of micro- and nanoscale Fe³⁺-containing (hematite) particles for their toxicological properties in human lung cells in vitro. *Toxicol. Sciences* 126, 173 – 182.
- Bols, N.C., Dayeh, V.R., Lee, L.E. J., Schirmer, K., 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology. J. Biochem. Mol. Biol.* 6, 42.
- Bopp, S.K. e Lettieri, T., 2008. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BioMed Central Pharm.* 1 – 11.
- Borggaard, L.K. e Gimsing, A.L., 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Manag. Sci.* 64, 441 – 456.
- Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C., Loréal, O., 2012. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 403 – 410.
- Carneiro, C.E.A., Ivashita, F.F., Junior, I.G.S., de Souza, C.M.D., Paesano Jr, A., da Costa, A.C.S., di Mauro, E., Santana, H., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2013. Synthesis og goethite in solutions of artificial seawater anda mino acids: a prebiotic chemistry study. *International Journal of Astrobiology* 12, 149 – 160.
- Castaño, A., 2003. The use of fish cells in Ecotoxicology. *Fish cells in Ecotoxicology. ATLA* 31, 317– 351.
- Cavalcante, D.G.S.M., Silva, N.D.G., Marcarini, J.C., Mantovani, M.S., Marin-Morales, M.A., Martinez, C.B.R., 2014. Cytotoxic, biochemical and genotoxic effects of biodiesel produced by different routes on ZFL cell line. *Toxicol. In Vitro* 28, 1117 – 1125.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup[®] on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41 - 46.
- Chan, K.M., Ku, L.L., Chan, P.C.-Y. , Cheuk, W.K., 2006. Metallothionein gene expression in zebrafish embryo–larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. *Mar. Environ. Res.* 62, 83 –87.
- Chen, D.S. e Chan, K.M., 2011. Differentially expressed proteins in zebrafish liver cells exposed to copper. *Aquat. Toxicol.* 104, 270 –277.
- Chen, D., Zhang, D., Yu, J.C., Chan, K.M., 2011. Effects of Cu₂O nanoparticle and CuCl₂ on zebrafish larvae and a liver cell-line. *Aquat. Toxicol.* 105, 344 – 354.
- Cho, E.C., Au, L., Zhang, Q., Xia, Y., 2010. The effects of size, shape, and surface functional group old nanoparticles on their adsorption and internalization by cells. *Small* 6, 517–522.
- Cho, E.C., Zhang, Q., Xia, Y., 2011. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology*.
- Cho, W.S., Duffin, R., Thielbeer, F. Bradley, M., Megson, I.L., MacNee, W., Poland, C.A., Tran, C.L., Donaldson, K., 2012. Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal-oxide nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 12, 1 – 31.
- Choi, M.R., Stanton-Maxey, K.J., Stanley, J.K., Levin, C.S., Bardhan, R., Akin, D., Badve, S., Sturgis, J., Robinson, J.P., Bashir, R., Halas, N.J., Clare, S., 2007. A cellular Trojan horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. *Nano Letters* 7, 3759 – 3765.

- Christen, V., Capelle, M., Fent, K., 2013. Silver nanoparticles induce endoplasmatic reticulum stress response in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharm.*
- Cornell, R.M. e Schwertmann, U., 2003. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses. Second edition: Wiley.
- Costa, C.L.A., Chaves, I.S., Ventura-Lima, J., Ferreira, J.L.R., Ferraz, L., Carvalho, L.M., Monserrat, J.M., 2012. *In vitro* evaluation of co-exposure of arsenium and an inorganic nanomaterial (fullerene, C₆₀) in zebrafish hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 155, 206 – 212.
- Fent, K., 2007. Permanent fish cell cultures as important tools in ecotoxicology. Completed Projects. ALTEX 24, Special Issue.
- Frenzilli, G., Scarcelli, V., Barga, I., Nigro, M., Forlin, L., Bolognesi, C., Sturve, J., 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbor. *Mutat. Res.* 187 – 195.
- Fröhlich, E., 2013. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. *Curr. Drug Metab.* 14, 976 - 988.
- Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.C., Séralini, G.E., 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262, 184 – 191.
- Ge, Y., Zhang, Y., Xia, J., Ma, M., He, S., Nie, F., Gu, N., 2009. Effect of surface charge and agglomerate degree of magnetic iron oxide nanoparticles on KB cellular uptake *in vitro*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73, 294 – 301.
- Ghisi, N.C. e Cestari, M.M., 2013. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. *Environ. Monit. Assess.* 185, 3201 - 3207.
- Ghosh, C., Zhou, Y. L., Collodi, P., 1994. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 167 – 176.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. T.* 167, 35 – 120.
- Guilherme, S., Santos, M.A., Gaivão, I., Barroso, C., Pacheco, M., 2012. Differential genotoxicity of Roundup formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology* 21, 1381 – 1390.
- Gupta, A.K. e Gupta, M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995 – 4021.
- Gupta, A.K., Gupta, M., Yarwood, S.J., Curtis, A.S.G., 2004. Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organization of human fibroblasts. *J. Control. Release* 95, 197 – 207.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, D.B., Helbing, C.C., Werr, K., Veldhoen, N., 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1928 – 1938.
- Huefner, A., Septiadi, D., Wilts, B.D., Patel, I.I., Kuan, W.L., Fragniere, A., Barker, R.A., Mahajan, S., 2014. Gold nanoparticles explore cells: cellular uptake and their use as intracellular probes. *Methods*.
- Jonsson, C.M. e Castro, V.L., 2005. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde ambiente. EMBRAPA.

- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Möller, L., 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1726 – 1732.
- Kharisov, B.I., Dias, H.V.R., Kharissova, O.V., Jiménez-Pérez, V.M., Pérez, B.O., Flores, B.M., 2012. Iron-containing nanomaterials: synthesis, properties and environmental applications. *Royal Society of Chemistry* 2, 9325 – 9358.
- Kier, L.D. e Kirkland, D.J., 2013. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. *Crit. Rev. Toxicol.* 43, 283 – 315.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T., 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Communication* 3, 103 – 115.
- Levi, S. e Rovida, E., 2009. The role of iron in mitochondrial function. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 629 - 636.
- Limbach, L.K., Wick, P., Manser, P., Grass, R.N., Bruinink, A., Stark, W.J., 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4158 – 4163.
- Liu, H., Chen, T., Frost, R.L., 2014. An overview of the role of goethite surfaces in the environment. *Chemosphere* 103, 1 – 11.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76, 932 – 937.
- Mak, I.T. e Weglicki, W.B., 1985. Characterization of iron-mediated peroxidative injury in isolated hepatic lysosomes. *J. Clin. Invest.* 75, 58 – 63.
- Marques, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2014. Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla Anguilla*) upon exposure and post-exposure periods – Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 166, 126 - 133.
- Modesto, K.A. e Martinez, C.B.R., 2010a. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781-787.
- Modesto, K.A. e Martinez, C.B.R., 2010b. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294 – 299.
- Monserrat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiology* 146, 221–234.
- Monserrat, J.M., Geracitano, L.A., Bianchini, A., 2003. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *J. Toxicol.* 9, 255 – 269.
- Moreno, N.C., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R., 2014. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environ. Toxicol. Pharm.* 37, 448 – 454.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods* 65, 55 – 63.

- Navarro, C.D.C. e Martinez, C.B.R., 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Phys. Part C* 165, 83 – 90.
- Nel A., Xia, T., Madler, L., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622 – 627.
- O'Carroll, D., Sleep, B., Krol, M., Boparai, H., Kocur, C., 2012. Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation. *Adv. WaterResour.*
- Park, J.H. e Park, E., 2011. Influence of iron-overload on DNA damage and its repair in human leukocytes in vitro. *Mutat. Res-Gen Tox. En.* 718, 56 - 61.
- Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61, 115 – 1122.
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156, 61 – 66.
- Pessagno, P.C., Sánchez, R.M.T., dos Santos Afonso, M., 2008. Glyphosate behavior at soil and mineral – water interfaces. *Environ. Pollut.* 153, 53 – 59.
- Queiroz, G.M.P., Silva, M.R., Bianco, R.J.F., Pinheiro, A., Kaufmann, V., 2011. Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. *Química Nova* 34, 190 – 195.
- Rees, P., 2014. Uptake and Toxicology of Nanoparticles. In: Lead, J.R. e Valsami-Jones, E. *Frontiers of Nanoscience: Nanoscience and the Environment*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 7, 123 - 138.
- Ruyra, A., Torrealba, D., Morera, D., Tort, L., MacKenzie, S., Roher, N., 2015. Zebrafish liver (ZFL) cells are able to mount an anti-viral response after stimulation with Poly (I:C). *Comp. Biochem. Phys. Part B* 182, 55 – 63.
- Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F., 2009. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquat. Toxicol.* 95, 285 – 291.
- Schirmer, K., 2014. Mechanisms of Nanotoxicity. In: Lead, J.R. e Valsami-Jones, E. *Frontiers of Nanoscience: Nanoscience and the Environment*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 7, 195 - 221.
- Schwertmann, U. e Cornell, R.M., 2000. Iron oxides in the laboratory. Preparation and characterization. Second edition: Wiley.
- Sheals, J., Sjöberg, S., Persson, P., 2002. Adsorption of glyphosate on goethite: molecular characterization of surface complexes. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3090 – 3095.
- Silva, M.D., Peralba, M.C.R., Mattos, M.L.T., 2003. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. *Pesticidas: R. Ecotox. Meio Ambiente* 13, 19 – 28.
- Singh, N., Jenkins, G.J.S., Asadi, R., Doak, S.H., 2010. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano reviews* 1, 5358 – 5373.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184 – 191.
- Solomon, K.R. e Thompson, D.G., 2003. Ecological risk assessment for aquatic organisms

- from over-water uses of glyphosate. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B* 6, 289 – 324.
- Tang, S., Allagadda, V., Chibli, H., Nadeau, J.L., Mayer, G.D., 2013. Comparison of cytotoxicity and expression of metal regulatory genes in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells exposed to cadmium sulfate, zinc sulfate and quantum dots. *Metallomics* 5, 1411 – 1422.
- Tang, T., Boëne, W., Desmet, N., Seuntjens, P., Bronders, J., Griensven, A.V., 2015. Quantification and characterization of glyphosate use and loss in a residential area. *Sci. Total Environ.* 517, 207-214.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206 – 221.
- Tosco, T., Papini, M.P., Vigghi, C.C., Sethi, R., 2014. Nanoscale zerovalent iron particles for groundwater remediation: a review. *Journal of Cleaner Production* 1 – 12.
- Tsui, M.T.K. e Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52, 1189 – 1197.
- Valko, M., Morris, H. e Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161 – 1208.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57 – 149.
- WHO, 1994. Glyphosate. Environmental Health Criteria No. 159. World Health Organization, Geneva.
- Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharm.* 31, 117 – 165.
- Wu, Y.L., Putcha, N., Ng, K.W., Leong, D.T., Lim, C.T., Loo, S.C.J., Chen, X., 2013. Biophysical responses upon the interaction of nanomaterials with cellular interfaces. *Acc. Chem. Res.* 46, 782 - 791.
- Wu, Y.L., Putcha, N., Ng, K.W., Leong, D.T., Lim, C.T., Loo, S.C.J., Chen, X., 2013. Biophysical responses upon the interaction of nanomaterials with cellular interfaces. *Acc. Chem. Res.* 46, 782 – 791.
- Xia, T., Kovoichich, M., Liang, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J.I., Zink, J.I., Nel, A.E., 2008. Comparison of the mechanisms of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* 2, 2121 - 2134.
- Ying, E. e Hwang, H.M., 2010. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings and different sizes in A3 human T lymphocytes. *Sci of the Total Environ.* 408, 4475 – 4481.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições utilizadas, as nanopartículas (NPs) de goethita na concentração de 100 mg L⁻¹ tanto isolada (N₁₀₀) quanto em associação ao Roundup[®] (RD N₁₀₀) e glifosato (Gli N₁₀₀) se aglomeraram e sedimentaram no meio de cultura, provocando alteração na morfologia e na adesão celular. Apesar desses resultados, nenhuma alteração na membrana plasmática foi observada, obtendo valores de viabilidade celular acima de 90% para todos os tratamentos experimentais. Além disso, as nanopartículas de goethita isoladas nas concentrações de 1 e 10 mg L⁻¹ promoveram efeitos citotóxicos tanto na viabilidade mitocondrial quanto lisossomal para as células ZFL após 6 h de exposição. Essas mesmas concentrações tiveram potencial genotóxico detectado pelo ensaio do cometa versão alcalina para o tempo de 1 h e as concentrações de 10 e 100 mg L⁻¹ promoveram danos significativos na molécula de DNA para a linhagem ZFL no tempo de 6 h.

Com relação aos resultados obtidos para o Roundup[®], foi possível verificar o seu potencial citotóxico na viabilidade mitocondrial para o tempo de 6 h e, seu potencial genotóxico, foi verificado tanto em 1 h quanto em 6 h quando as células ZFL foram expostas à concentração de 10 mg L⁻¹ deste herbicida. Em associação com NPs de goethita, os efeitos produzidos pelo produto formulado não foram revertidos. Na verdade, a presença das diferentes concentrações de NPs de goethita influenciou e intensificou a citotoxicidade e a genotoxicidade desta associação, inclusive para o maior tempo de exposição. Quanto ao glifosato, a concentração de 3,6 mg L⁻¹ não teve efeitos tóxicos em nenhum dos parâmetros analisados, bem como em associação com as diferentes concentrações de NPs de goethita.

Por fim, quando a toxicidade do glifosato e do produto formulado Roundup[®] para a linhagem celular ZFL foi comparado, foi possível sugerir que a presença do surfactante POEA na composição do produto formulado pode favorecer a toxicidade deste herbicida quando comparado com o ingrediente ativo glifosato.

Considerando a complexidade desses nanomateriais, a avaliação da sua toxicidade requer estratégias que incluem uma caracterização físico-química detalhada para cada tipo de nanopartícula bem como um conjunto de testes que permitem avaliar os seus reais efeitos nas células. Visto que são poucos os trabalhos que avaliam respostas toxicológicas, principalmente em organismos aquáticos, estudos como esse são de extrema importância, pois buscam compreender os mecanismos de ação das nanopartículas de óxido de ferro *in vitro*, bem como o potencial desses nanomateriais na utilização em programas de remediação ambiental.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Maryland, USA: American Fisheries Society Bethesda, 2002.
- Alves, E. A. e Guimarães, A. C. R. Cultivo celular. In: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Fundação Oswaldo Cruz 2, 215 – 253, 2009. Disponível em: www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo_5_vol2.pdf
- Amado, L. L.; Garcia, M. L.; Ramos, P. B.; Freitas, R. F.; Zafalorf, B.; Ferreira, L. R.; Yunes, J. S.; Monserrat, J. M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment* 407, 2115 - 2123, 2009.
- Amarante, O. P. J.; Santos, T. C. R.; Brito, N. M.; Ribeiro, M. L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova* 25, 589 - 593, 2002.
- ANVISA e UFPR. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. Anvisa, Brasília, 11 de abril de 2012. Disponível em: www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-2012/rap-09-de-maio-de-2012-anvisa-agenor
- Armas, E. D.; Monteiro, R. T. R.; Antunes, P. M.; Santos, M. A. P. F.; Camargo, P. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. *Química Nova* 30, 1119 – 1127, 2007.
- Asati, A.; Santra, S.; Kaittanis, C.; Perez, J. M. Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano* 4, 5321 – 5331, 2010.
- Auffan, M.; Decome, L.; Rose, J.; Orsiere, T.; Meo, M.; Briois, V.; Chaneac, C.; Olivi, L.; Berge-Lefranc, J.; Botta, A.; Wiesner, M.; Bottero, J. *In vitro* interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physicochemical and cytogenotoxicological study. *Environmental Science and Technology* 20, 4367 – 4373, 2006.
- Barja, B. C.; dos Santos Afonso, M. Aminomethylphosphonic acid and glyphosate onto goethite: a comparative study. *Environmental Science and Technology* 39, 585 – 592, 2005.
- Bhaskara, B. L. e Nagaraja, P. Direct sensitive spectrophotometric determination of glyphosate by using ninhydrin as a chromogenic reagent in formulations and environmental water samples. *Helvetica Chimica Acta* 89, 2686 – 2693, 2006.

- Bhattacharya, K.; Hoffmann, E.; Schins, R. F. P.; Boertz, J.; Prantl, E.; Alink, G. M.; Byrne, H. J.; Kuhlbusch, T. A. J.; Rahman, Q.; Wiggers, H.; Schulz, C.; Dopp, E. Comparison of micro- and nanoscale Fe⁺³-containing (hematite) particles for their toxicological properties in human lung cells in vitro. *Toxicological Sciences* 126, 173 – 182, 2012.
- Bickham, J. W.; Sandhu, S.; Heber, P. D. N; Chikhi, L; Anthwal, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* 33-51, 2000.
- Binelli, A.; Cogni, D.; Parolini, M.; Riva, C.; Provini, A. Cytotoxic and genotoxic effects of *in vitro* exposures to triclosan and trimethoprimon on zebra mussel (*D. polymorpha*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 150, 50 – 56, 2009.
- Biswas, P. e Wu, C. Nanoparticles and the environment. *Journal of the Air and Waste Management Association* 55, 708 – 746, 2005.
- Bols, N. C.; Dayeh, V. R.; Lee, L. E. J.; Schirmer, K. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 6, 42, 2005.
- Bopp, S. K. e Lettieri, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BioMed Central Pharmacology* 1 – 11, 2008.
- Bopp, S. K. e Lettieri, T. Gene expression profile assessment in zebrafish (*Danio rerio*). Joint Research Centre: Scientific and Technical Reports. Institute for Environment and Sustainability. Itália, 2007.
- Bopp, S. K.; Minuzzo, M.; Lettieri, T. The zebrafish (*Danio rerio*): an emerging model organism in the environmental field. Joint Research Centre: Scientific and Technical Reports. Institute for Environment and Sustainability. Itália, 2006.
- Borggaard, L. K. e Gimsing, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science* 64, 441 – 456, 2008.
- Brasil, Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA. Resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: www.mma.gov.br/port/conama
- Brissot, P.; Ropert, M.; Le Lan, C.; Loréal, O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820, 403 – 410, 2012.
- Cajaraville, M. P.; Bebianno, M. J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C.; Viarengo, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian

- Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* 247, 295 – 311, 2000.
- Carneiro, C. E. A.; Ivashita, F. F.; Junior, I. G. S.; de Souza, C. M. D.; Paesano Jr, A.; da Costa, A. C. S.; di Mauro, E.; Santana, H.; 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* 12, 149 – 160, 2013.
- Castaño, A. The use of fish cells in ecotoxicology. *Fish cells in ecotoxicology*. *ATLA* 31, 317– 351, 2003.
- Cavalcante, D. G. S. M.; Martinez, C. B. R.; Sofia, S. H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research* 655, 41 – 46, 2008.
- Cavalcante, D. G. S. M.; Silva, N. D. G.; Marcarini, J. C.; Mantovani, M. S.; Marin-Morales, M. A.; Martinez, C. B. R. Cytotoxic, biochemical and genotoxic effects of biodiesel produced by different routes on ZFL cell line. *Toxicology in vitro* 28, 1117 – 1125, 2014.
- Chan, K. M.; Ku, L. L.; Chan, P. C.-Y. ; Cheuk, W. K. Metallothionein gene expression in zebrafish embryo–larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. *Marine Environmental Research* 62, 83 - 87, 2006.
- Chen, D. S. e Chan, K. M. Differentially expressed proteins in zebrafish liver cells exposed to copper. *Aquatic Toxicology* 104, 270 - 277, 2011.
- Chen, D.; Zhang, D.; Yu, J. C.; Chan, K. M. Effects of Cu₂O nanoparticle and CuCl₂ on zebrafish larvae and a liver cell-line. *Aquatic Toxicology* 105, 344 - 354, 2011.
- Cho, E. C.; Au, L.; Zhang, Q.; Xia, Y. The effects of size, shape, and surface functional group of nanoparticles on their adsorption and internalization by cells. *Small* 6, 517–522, 2010.
- Cho, E. C.; Zhang, Q.; Xia, Y. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 2011.
- Cho, W. S.; Duffin, R.; Thielbeer, F. Bradley, M.; Megson, I. L.; MacNee, W.; Poland, C. A.; Tran, C. L.; Donaldson, K. Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal-oxide nanoparticles. *Toxicological Science* 12, 1 – 31, 2012.
- Choi, M. R.; Stanton-Maxey, K. J.; Stanley, J. K.; Levin, C. S.; Bardhan, R.; Akin, D.; Badve, S.; Sturgis, J.; Robinson, J. P.; Bashir, R.; Halas, N. J.; Clare, S. A cellular Trojan horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. *Nano Letters* 7, 3759 – 3765, 2007.
- Christen, V.; Capelle, M.; Fent, K. Silver nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress response in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013.

- Cornell, R. M. e Schwertmann, U. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses. Second edition: Wiley, 2003.
- Costa, C. L. A.; Chaves, I. S.; Ventura-Lima, J.; Ferreira, J. L. R.; Ferraz, L.; Carvalho, L. M.; Monserrat, J. M. *In vitro* evaluation of co-exposure of arsenium and an inorganic nanomaterial (fullerene, C₆₀) in zebrafish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 155, 206 – 212, 2012.
- Costa, C. R.; Olivi, P.; Botta, C. M. R.; Espindola, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química nova* 31, 1820 – 1830, 2008.
- Coutinho, C. F. B. e Mazo, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. *Química Nova* 28, 1038 – 1045, 2005.
- Davila, J. C.; Rodriguez, R. J.; Melchert, R. B.; Jr, D. A. Predictive value of *in vitro* model systems in toxicology. In: *In vitro* toxicology models. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 38, 63 – 96, 1998.
- EC – (European Commission), 2002. Report for the Active Substance Glyphosate. Directive 6511/VI/99, Jan.21. International Programme on Chemical Safety. Glyphosate. Disponível em: www.europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pro/eva/existing/list1_glyphosate_en.pdf
- EPA (United States Environmental Protection Agency), 1993. Registration eligibility decision: glyphosate. Disponível em: www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/old_reds/glyphosate.pdf
- Fent, K. Permanent fish cell cultures as important tools in ecotoxicology. Completed Projects. *ALTEX* 24, Special Issue, 2007.
- Ferrari, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer* 5, 161 – 171, 2005.
- Fontainhas-Fernandes, A. The use of biomarkers in aquatic toxicology studies. *Revista Portuguesa de Zootecnia* 12, 67 – 86, 2005.
- Franchi, L. P.; Santos, R. A.; Matsubara, E. Y.; Lima, J. C.; Rosolen, J. M.; Takahashi, C. S. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. *Química Nova* 35, 571 – 580, 2012.
- Freire, M. M.; Santos, V. G.; Ginuino, I. S.; Ferreira; Arias, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis* 12, 347 – 354, 2008.
- Frenzilli, G.; Scarcelli, V.; Barga, I.; Nigro, M.; Forlin, L.; Bolognesi, C.; Sturve, J. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbor. *Mutation Research* 187 - 195, 2004.

- Fröhlich, E. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. *Current Drug Metabolism* 14, 976 – 988, 2013.
- Gasnier, C.; Dumont, C.; Benachour, N.; Clair, E.; Chagnon, M. C.; Séralini, G. E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262, 184 – 191, 2009.
- Ge, Y.; Zhang, Y.; Xia, J.; Ma, M.; He, S.; Nie, F.; Gu, N. Effect of surface charge and agglomerate degree of magnetic iron oxide nanoparticles on KB cellular uptake *in vitro*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73, 294 – 301, 2009.
- Ghisi, N. de C. e Cestari, M.M. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. *Environmental Monitoring Assessment* 185, 3201 – 3207, 2013.
- Ghosh, C.; Zhou, Y. L.; Collodi, P. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. *Cell Biology and Toxicology* 10, 167 – 176, 1994.
- Giesy, J. P.; Dobson, S.; Solomon, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167, 35 - 120, 2000.
- Guilherme, S.; Santos, M. A.; Gaivão, I.; Barroso, C.; Pacheco, M. Differential genotoxicity of Roundup formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology* 21, 1381 – 1390, 2012.
- Gupta, A. K. e Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995 – 4021, 2005.
- Gupta, A. K.; Gupta, M.; Yarwood, S. J.; Curtis, A. S. G. Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organization of human fibroblasts. *Journal of Controlled Release* 95, 197 – 207, 2004.
- Howe, C. M.; Berrill, M.; Pauli, D. B.; Helbing, C. C.; Werr, K.; Veldhoen, N. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1928 - 1938, 2004.
- Hoyt, V. W. e Mason, E. Nanotechnology: emerging health issues. *Journal of Chemical Health and Safety* 15, 10 – 15, 2008.
- Huefner, A.; Septiadi, D.; Wilts, B. D.; Patel, I. I.; Kuan, W. L.; Fragniere, A.; Barker, R. A. Mahajan, S. Gold nanoparticles explore cells: cellular uptake and their use as intracellular probes. *Methods*, 2014.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos – Boletim de Produção, Importação,

- Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil em 2013. Disponível em: www.ibama.gov.br
- Jaworski, E. G. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20, 1195 - 1198, 1972.
- Jesus, T. B. e Carvalho, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliensis* 12, 680 - 693, 2008.
- Jha, A. N. Genotoxic studies in aquatic organisms: overview. *Mutation Research* 1 – 17, 2004.
- Jonsson, C. M. e Castro, V. L. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde ambiente. EMBRAPA, 2005.
- Jonsson, C. M.; Persson, P.; Sjöberg, S.; Loring, J. S. Adsorption of glyphosate on goethite (α -FeOOH): Surface complexation modeling combining spectroscopic and adsorption data. *Environmental Science and Technology* 42, 2464 – 2469, 2008.
- Karlsson, H. L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J.; Möller, L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology* 21, 1726 – 1732, 2008.
- Kharisov, B. I.; Dias, H. V. R.; Kharissova, O. V.; Jiménez-Pérez, V. M.; Pérez, B. O.; Flores, B. M. Iron-containing nanomaterials: synthesis, properties and environmental applications. *Royal Society of Chemistry* 2, 9325 – 9358, 2012.
- Kier, L. D. e Kirkland, D. J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. *Critical Reviews Toxicology* 43, 283 – 315, 2013.
- Kobayashi, H.; Sugiyama, C.; Morikawa, Y.; Hayashi, M.; Sofuni, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MM Communication* 3, 103 – 115, 1995.
- Levi, S. e Roviada, E. The role of iron in mitochondrial function. *Biochimica Biophysica Acta* 1790, 629 – 636, 2009.
- Li, X.; Elliott, D. W.; Zhang, W. Zero-valent iron nanoparticles for abatement of environmental pollutants: materials and engineering aspects. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* 31, 111 – 122, 2006.
- Limbach, L. K.; Wick, P.; Manser, P.; Grass, R. N.; Bruinink, A.; Stark, W. J. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental Science Technology* 41, 4158 – 4163, 2007.

- Liu, H.; Chen, T.; Frost, R. L. An overview of the role of goethite surfaces in the environment. *Chemosphere* 103, 1 – 11, 2014.
- 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* 76, 932 - 937, 2009.
- Lushchak, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13 – 30, 2011.
- Lyons, B. P.; Harvey, J. S.; Parry, J. M. An initial assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in the intertidal teleost *Lipophrys pholis*. *Mutation Research* 263-268, 1997.
- Mak, I. T.; Weglicki, W. B. Characterization of iron-mediated peroxidative injury in isolated hepatic lysosomes. *Journal of Clinical Investigation* 75, 58 – 63, 1985.
- Manduzio, H.; Rocher, B.; Durand, F.; Galap, C.; Leboulenger, F. The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal* 2, 91 – 104, 2005.
- Marques, A.; Guilherme, S.; Gaivão, I.; Santos, M. A.; Pacheco, M. Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla Anguilla*) upon exposure and post-exposure periods – Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 166, 126 – 133, 2014.
- Martinez, C. B. R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Silva-Souza, A. T. Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Editora Maringá: ABRAPOA, 2006, 43 – 62.
- McConnel, J. S.; Hossner, L. R. pH-dependent adsorption isotherms of glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 1075 - 1078, 1985.
- Modesto, K. A. e Martinez, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781-787, 2010a.
- Modesto, K. A. e Martinez, C. B. R. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294 – 299, 2010b.
- Monserrat, J. M.; Geracitano, L. A.; Bianchini, A. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comments on Toxicology* 9, 255 – 269, 2003.
- Monserrat, J. M.; Martinez, P. E.; Geracitano, L. A.; Amado, L. L.; Martins, C. M. G.; Pinho, G. L. L.; Chaves, I. S.; Ferreira-Cravo, M.; Ventura-lima, J.; Bianchini, A. Pollution

- biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146, 221–234, 2007.
- Moreno, N. C.; Sofia, S. H.; Martinez, C. B. R. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb[®] and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37, 448 – 454, 2014.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal of Immunological Methods* 65, 55 – 63, 1983.
- Navarro, C. D. C. e Martinez, C. B. R. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 165, 83 – 90, 2014.
- Nel A.; Xia, T.; Madler, L. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622 – 627, 2006.
- Nigro, M.; Falleni, A.; Barga, I. D.; Scarcelli, V.; Lucchesi, P.; Regoli, F.; Frenzilli, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology* 77, 339 – 347, 2006.
- NRC, National Research Council. *Small Wonders, Endless Frontiers: A Review of the National Nanotechnology Initiative*, p. 12, 2002. Washington, DC, National Academy Press. Disponível em: www.nano.gov
- O'Carroll, D.; Sleep, B.; Krol, M.; Boparai, H.; Kocur, C. Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation. *Advances in Water Resources*, 2012.
- Park, J. H. e Park, E. Influence of iron-overload on DNA damage and its repair in human leukocytes in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology Environmental* 718, 56 – 61, 2011.
- Paschoalino, M. P.; Marccone, G. P. S.; Jardim, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova* 33, 421 – 430, 2010.
- Peixoto, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61, 115 – 1122, 2005.
- Peruzzo, P. J.; Porta, A. A.; Ronco, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156, 61 – 66, 2008.
- Pessagno, P. C.; Sánchez, R. M. T.; dos Santos Afonso, M. Glyphosate behavior at soil and mineral – water interfaces. *Environmental Pollution* 153, 53 – 59, 2008.

- Queiroz, G. M. P.; Silva, M. R.; Bianco, R. J. F.; Pinheiro, A.; Kaufmann, V. Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. *Química Nova* 34, 190 – 195, 2011.
- Quina, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. *Química Nova* 27, 1028 – 1029, 2004.
- Rees, P. Uptake and Toxicology of Nanoparticles. In: Lead, J.R. e Valsami-Jones, E. *Frontiers of Nanoscience: Nanoscience and the Environment*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2014, 7, 123 - 138.
- Repetto, G.; Peso, A.; Zurita, J. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/citotoxicity. *Nature Protocols* 3, 1125 – 1131, 2008.
- Ribeiro, L. R.; Salvadori D. M. F.; Marques, E. K. *Mutagênese ambiental*. Canoas: Ulbra, p. 215, 2003.
- Roco, M. C. Broader Societal Issues of Nanotechnology. *Journal of Nanoparticle Research* 5, 181 – 189, 2003.
- Ruyra, A.; Torrealba, D.; Morera, D.; Tort, L.; MacKenzie, S.; Roher, N. Zebrafish liver (ZFL) cells are able to mount an anti-viral response after stimulation with Poly (I:C). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 182, 55 – 63, 2015.
- Sandrini, J. Z.; Bianchini, A.; Trindade, G. S.; Nery, L. E. M.; Marins, L. F. F. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquatic Toxicology* 95, 285 – 291, 2009.
- Schirmer, K. Mechanisms of Nanotoxicity. In: Lead, J. R. e Valsami-Jones, E. *Frontiers of Nanoscience: Nanoscience and the Environment*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2014, 7, 195 - 221.
- Schwertmann, U. e Cornell, R. M. *Iron oxides in the laboratory. Preparation and characterization*. Second edition: Wiley, 2000.
- Sheals, J.; Sjöberg, S.; Persson, P. Adsorption of glyphosate on goethite: molecular characterization of surface complexes. *Environmental Science and Technology* 36, 3090 - 3095, 2002.
- Silva, M. D.; Peralba, M. C. R.; Mattos, M. L. T. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 13, 19 – 28, 2003.
- Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184 – 191, 1988.

- Singh, N.; Jenkins, G. J. S.; Asadi, R.; Doak, S. H. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano reviews* 1, 5358 – 5373, 2010.
- Solomon, K. R. e Thompson, D. G. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B* 6, 289 – 324, 2003.
- Svendsen, C.; Spurgeon, D. J.; Hankard, P. K.; Weeks, J. M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 20 - 29, 2004.
- Tang, S.; Allagadda, V.; Chibli, H.; Nadeau, J. L.; Mayer, G. D. Comparison of cytotoxicity and expression of metal regulatory genes in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells exposed to cadmium sulfate, zinc sulfate and quantum dots. *Metallomics* 5, 1411 – 1422, 2013.
- Tang, T.; Boëne, W.; Desmet, N.; Seuntjens, P.; Bronders, J.; Griensven, A. V. Quantification and characterization of glyphosate use and loss in a residential area. *Sci. Total Environ.* 517, 207-214, 2015.
- Tice, R. R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J. C.; Sasaki, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206 – 221, 2000.
- Tiwari, D. K.; Behari, J.; Sen, P. Application of nanoparticles in waste water treatment. *World Applied Sciences Journal* 3, 417 – 433, 2008.
- Toni, L. R. M.; Santana, H. e Zaia, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Química Nova* 29, 829 – 833, 2006.
- Tosco, T.; Papini, M. P.; Vigghi, C. C.; Sethi, R. Nanoscale zerovalent iron particles for groundwater remediation: a review. *Journal of Cleaner Production* 1 – 12, 2014.
- Tsui, M. T. K. e Chu, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52, 1189 - 1197, 2003.
- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12, 1161 – 1208, 2005.
- Van Der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57 – 149, 2003.
- WHO. Glyphosate. Environmental Health Criteria No. 159. World Health Organization, Geneva, 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* 31, 117 - 165, 2000.
- Wu, Y. L.; Putcha, N.; Ng, K. W.; Leong, D. T.; Lim, C. T.; Loo, S. C. J.; Chen, X. Biophysical responses upon the interaction of nanomaterials with cellular interfaces. *Accounts Chemical Research* 46, 782 – 791, 2013.
- Xia, T.; Kovichich, M.; Liong, M.; Mädler, L.; Gilbert, B.; Shi, H.; Yeh, J. I.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Comparison of the mechanisms of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* 2, 2121 – 2134, 2008.
- Yamada, T. e Castro, P. R. C. Efeito do glifosato nas plantas: Implicações fisiológicas e agrônômicas. International Plant Nutrition Institute. *Informações Agrônômicas*. Nº 199, 2007.
- Ying, E. e Hwang, H. M. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings and different sizes in A3 human T lymphocytes. *Science of the Total Environment* 408, 4475 – 4481, 2010.
- Zablotowicz, R. M. e Reddy, K. N. Impact of glyphosate and *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. *Journal of Environmental Quality* 33, 825 - 831, 2004.
- Zagatto, P. A. *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações* – São Carlos: Editora Rima, 2006.
- Zagatto, P. A. Significado dos estudos de validação de testes de toxicidade: resultados publicados. In: *Congresso de Ecotoxicologia*. Itajaí-SC, 1998.