



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FABIANO TAKEO KOMAY TSUTSUI

**PROTEÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE FERRIHIDRITA
CONTRA OS EFEITOS DE HERBICIDAS EM RATOS:
METABÓLITOS PLASMÁTICOS E TECIDUAIS**

Londrina
2022

FABIANO TAKEO KOMAY TSUTSUI

**PROTEÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE FERRIHDRITA
CONTRA OS EFEITOS DE HERBICIDAS EM RATOS:
METABÓLITOS PLASMÁTICOS E TECIDUAIS**

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

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

Londrina
2022

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

Tsutsui, Fabiano Takeo Komay.

Proteção da nanopartícula de ferrihidrita contra os efeitos de herbicidas em ratos: metabólitos plasmáticos e teciduais / Fabiano Takeo Komay Tsutsui. - Londrina, 2022.
62 f. : il.

Orientador: Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Ferro - Tese. 2. Glifosato - Tese. 3. Atrazina - Tese. 4. Enzimas hepáticas - Tese. I. Zaia, Cássia Thaís Bussamra Vieira. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

FABIANO TAKEO KOMAY TSUTSUI

**PROTEÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE FERRIHDRITA
CONTRA OS EFEITOS DE HERBICIDAS EM RATOS:
METABÓLITOS PLASMÁTICOS E TECIDUAIS**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Cássia Thaïs
Bussamra Vieira Zaia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss
Universidade Estadual de São Paulo – UNESP-
Botucatu

Londrina, 16 de março de 2022.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia, pelos ensinamentos, reuniões e correções e por todo o tempo, paciência e afinho dedicados a mim e a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Dimas Augusto Morozin Zaia pelo apoio, auxílio, colaboração e aos membros do Laboratório de Química Prebiótica (LQP), especialmente o Rodrigo, que sintetizou a ferrihidrita.

Ao Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa pelo auxílio e por todas as dúvidas que me foram sanadas.

Um agradecimento especial à Profa. Cláudia Bueno dos Reis Martinez por ter cedido a estrutura do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) e ao Dr. Wagner Ezequiel Risso por todo o auxílio para realizar as quantificações de ferro.

Às professoras, Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss e Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, por terem aceito o convite para compor a banca examinadora e, com isso, enriquecer o trabalho como um todo.

Aos colegas que já fizeram ou fazem parte do LaFiNeM: Andressa, Ana, Camila, Larissa, Maria Heloisa, Marcela, Nicole, Polyana, Renato e Rhauany. Gostaria de agradecer especialmente ao Lucas e à Letícia pelo imenso auxílio e apoio na execução deste trabalho.

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

Aos meus pais, Helio Antônio Tsutsui e Mary Emiko Komay Tsutsui, por todo o apoio, suporte e incentivo que sempre me proporcionaram e por toda abdicção e empenho para me fornecer uma educação e uma formação de excelência.

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

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

``Somos como anões aos ombros de gigantes, pois podemos ver mais coisas do que eles e mais distantes, não devido à acuidade da nossa vista ou à altura do nosso corpo, mas porque somos mantidos e elevados pela estatura de gigantes``

Bernardo de Chartres

TSUTSUI, FABIANO TAKEO KOMAY. **Proteção da nanopartícula de ferrihidrita contra os efeitos de herbicidas em ratos:** metabólitos plasmáticos e teciduais. 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A atrazina e o glifosato, cuja principal formulação comercial é o Roundup® são herbicidas muito utilizados, apesar de apresentarem diversos efeitos tóxicos. Neste contexto, as nanopartículas de óxido de ferro, em especial a ferrihidrita, têm se mostrado promissoras como potenciais remediadoras desses herbicidas. Com isso, este trabalho avaliou se as nanopartículas de ferrihidrita são eficazes em evitar os efeitos tóxicos provocados pelo Roundup®, glifosato e atrazina em ratos Wistar machos e fêmeas. Os animais foram distribuídos em 15 grupos/gênero (5 ratos/grupo), sendo que 7 grupos, receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única (grupos D1) de: glifosato (G), Roundup® (R), atrazina (A), ferrihidrita (F) ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA). Outros 7 grupos receberam, via gavagem, dose única diária, por 4 dias (grupos D4) das mesmas composições. O controle recebeu água em 4 doses (1 dose/dia). O delta do peso corpóreo e a ingestão alimentar foram avaliados. Nos encéfalos, foi quantificado ferro e, nos plasmas, a concentração de glicose, colesterol, creatinina e ferro e a atividade das enzimas aspartato e alanina aminotransferase (AST e ALT) e fosfatase alcalina. Encontrou-se que F reduziu a atividade de ALT (fêmeas D1/D4) e da fosfatase (fêmeas D1), alterações que não tem relevância toxicológica. G diminuiu a ingestão (machos/fêmeas D4) e o peso (fêmeas D4), sendo que FG evitou todas essas alterações. R provocou mortalidade de 80% nos machos D4 e de 100% nas fêmeas D4, o que impossibilitou a análise dos parâmetros desses grupos. Além disso, R aumentou glicose (machos D1) e diminuiu peso e fosfatase (fêmeas D1). FR evitou a redução de glicose e peso, além de zerar a mortalidade nas fêmeas, mas não impediu a mortalidade nos machos e a diminuição da fosfatase nas fêmeas. Além disso, FR reduziu peso (machos D1 e fêmeas D4), ingestão e glicose e aumentou ferro plasmático (fêmeas D4). Grupo A promoveu mortalidade de 20% nas fêmeas D4, reduziu o peso (machos D1/D4 e fêmeas D4), ingestão (machos/fêmeas D4) e fosfatase (fêmeas D1) e elevou ferro no encéfalo (fêmeas D1 e D4). FA impediu a perda de peso nos machos D1, mas não evitou a mortalidade nas fêmeas D4, diminuição de peso (machos/fêmeas D4), fosfatase (fêmeas D1) e ingestão (fêmeas D4) e o aumento de ferro no encéfalo. FA apresentou, além disso, mortalidade de 20%, redução da ingestão, aumento de glicose e colesterol (machos D4) e diminuição da fosfatase (fêmeas D4). Desta forma, pode-se sugerir que a ferrihidrita é adequada para ser utilizada, pois a nanopartícula isoladamente não apresentou toxicidade, foi capaz de evitar as alterações provocadas pelo glifosato e, apesar de não proteger os animais contra as alterações provocadas pela atrazina, impediu 100% da mortalidade induzida pelo Roundup®.

Palavras-chave: ferro; glifosato; atrazina; enzimas hepáticas.

TSUTSUI, FABIANO TAKEO KOMAY. **Protection of ferrihydrite nanoparticle against the effects of herbicides in rats: plasma and tissue metabolites.** 2022. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Atrazine and glyphosate, whose main commercial formulation is Roundup[®], are widely used herbicides, despite having several toxic effects. In this context, iron oxide nanoparticles, especially ferrihydrite, have shown promise as potential remediation of these herbicides. Thus, this work evaluated whether ferrihydrite nanoparticles are effective in preventing the toxic effects caused by Roundup[®], glyphosate, and atrazine in male and female Wistar rats. The animals were divided into 15 groups/gender (5 rats/group), and 7 groups received, via gavage, a single dose (1000 mg/kg of body weight) (groups D1) of glyphosate (G), Roundup[®] (R), atrazine (A), ferrihydrite (F) or the combination of the nanoparticle with the herbicides (FG, FR, and FA). Another 7 groups received, via gavage, a single daily dose for 4 days (groups D4) of the same compositions. The control received water in 4 doses (1 dose/day). Delta body weight and food intake were evaluated. In the brain, iron was quantified and, in the plasma, the concentration of glucose, cholesterol, creatinine, and iron and the activity of the enzymes aspartate and alanine aminotransferase (AST and ALT) and alkaline phosphatase. F was found to reduce ALT (D1/D4 females) and phosphatase (D1 females) activity, alterations that have no toxicological relevance. G decreased intake (male/female D4) and weight (female D4), and FG avoided all these changes. R caused 80% mortality in D4 males and 100% in D4 females, which made it impossible to analyze the parameters of these groups. In addition, R increased glucose (D1 males) and decreased weight and phosphatase (D1 females). FR prevented the reduction of glucose and weight, in addition to zero mortality in females, but did not prevent mortality in males and the decrease in phosphatase in females. In addition, FR reduced weight (D1 males and D4 females), intake and glucose, and increased plasma iron (D4 females). Group A promoted 20% mortality in D4 females, reduced weight (D1/D4 males and D4 females), intake (D4 males/females) and phosphatase (D1 females), and increased iron in the brain (D1 and D4 females). FA prevented weight loss in D1 males but did not prevent mortality in D4 females, weight loss (male/female D4), phosphatase (female D1) and ingestion (female D4), and increased iron in the brain. FA presented, in addition, mortality of 20%, reduced intake, increased glucose and cholesterol (D4 males), and decreased phosphatase (D4 females). Thus, it can be suggested that ferrihydrite is suitable to be used because the nanoparticle alone did not show toxicity, it was able to avoid the changes caused by glyphosate and, despite not protecting the animals against the changes caused by atrazine, it prevented 100% of the mortality induced by Roundup[®].

Key words: Iron; glyphosate; atrazine; liver enzymes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Linha temporal do protocolo experimental dos ratos e ratas que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA)23
- Figura 2** - Encéfalo de rato. Os retângulos vermelhos delimitam a área utilizada para homogeneização e quantificação de ferro24
- Figura 3** - □ Peso corpóreo (g) e quantidade de alimento ingerido (g/100 g de peso corpóreo) de ratos que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA). AUC (área sob a curva): quantidade ingerida de alimento durante 4 dias30
- Figura 4** - □ Peso corpóreo (g) e quantidade de alimento ingerido (g/100 g de peso corpóreo) de ratas que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA). AUC (área sob a curva): quantidade ingerida de alimento durante 4 dias31
- Figura 5** - Valores plasmáticos de glicose (mg/dL), colesterol total (mg/dL) e creatinina (mg/dL) de ratos que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA)32

- Figura 6** - Valores plasmáticos de glicose (mg/dL), colesterol total (mg/dL) e creatinina (mg/dL) de ratas que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA)33
- Figura 7** - Valores plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST, U/L), alanina aminotransferase (ALT, U/L) e fosfatase alcalina (U/L) de ratas que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA)34
- Figura 8** - Valores plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST, U/L), alanina aminotransferase (ALT, U/L) e fosfatase alcalina (U/L) de ratas que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA) -.....35
- Figura 9** - Valores plasmáticos de ferro (mg/L) e de ferro no encéfalo (μ g/g de tecido nervoso) de ratas que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA) -.....36
- Figura 10** - Valores plasmáticos de ferro (mg/L) e de ferro no encéfalo (μ g/g de tecido nervoso) de ratas que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou

atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA) -37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados de mortalidade (%) de ratos e ratas.....29
- Tabela 2** - Resultados encontrados dos parâmetros avaliados em ratos Wistar, que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de nanopartícula de ferrihidrita (F); glifosato (G); ferrihidrita com glifosato (FG); Roundup® (R); ferrihidrita com Roundup® (FR); atrazina (A); ferrihidrita com atrazina (FA) ..40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVOS GERAIS	20
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	METODOLOGIA	21
3.1	ANIMAIS	21
3.2	HERBICIDAS	21
3.3	NANOPARTÍCULAS	21
3.4	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	22
3.5	AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO E DA INGESTÃO ALIMENTAR	24
3.6	EUTANÁSIA	24
3.7	DOSAGENS QUÍMICAS	24
3.7.1	Glicose	24
3.7.2	Colesterol Total	25
3.7.3	Aspartato Aminotransferase (AST)	25
3.7.4	Alanina Aminotransferase (ALT)	25
3.7.5	Fosfatase Alcalina	26
3.7.6	Creatinina	26
3.7.7	Ferro	27
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4	RESULTADOS	28
4.1	EFEITO DA NANOPARTÍCULA DE FERRIHDRITA	28
4.2	EFEITO DO GLIFOSATO E DA ASSOCIAÇÃO DE FERRIHDRITA COM GLIFOSATO	28
4.3	EFEITO DO ROUNDUP® E DA ASSOCIAÇÃO DE FERRIHDRITA COM ROUNDUP®	38
4.4	EFEITO DA ATRAZINA E DA ASSOCIAÇÃO DE FERRIHDRITA COM ATRAZINA	38
5	DISCUSSÃO	41

6	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXO.....	63
	ANEXO 1 Aprovação da CEUA.....	63
	ANEXO 2 Aprovação da CEUA.....	64

1 INTRODUÇÃO

1 O presente trabalho vai mostrar que a ferrihidrita, uma nanopartícula de óxido
2 de ferro, tem a capacidade de evitar alguns dos efeitos tóxicos provocados por
3 herbicidas em ratos e ratas.

4 Dados fornecidos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos
5 Naturais Renováveis (IBAMA) mostram que, entre 2000 e 2018, a venda de agrotóxicos
6 no Brasil passou de 162.461,96 t para 552.641,00 t, o que representou um aumento de
7 240% (IBAMA, 2021). Neste mesmo período, por outro lado, a área agrícola cresceu
8 44,8%, indicando um incremento na quantidade de agrotóxicos utilizados por território
9 plantado (IBGE, 2020). Esse expressivo aumento infelizmente fez com que o Brasil
10 conquistasse o primeiro lugar na classificação mundial de consumidores de agrotóxicos
11 (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014), resultando em diversos danos.

12 Neste contexto, Lopes e Albuquerque (2018), realizaram uma revisão
13 sistemática com base em estudos brasileiros que abordaram os impactos ambientais
14 e na saúde humana provocados pelos agrotóxicos. Os autores constataram que as
15 consequências ambientais incluem alterações na composição do solo, contaminação
16 da água e do ar, alteração na morfologia de organismos terrestres e aquáticos e
17 modificação nas funções desses organismos dentro do ecossistema. Com relação
18 aos impactos na saúde humana foram observados, dentre outros, ansiedade,
19 depressão, aumento nas taxas de suicídio, danos ao DNA, malformações
20 congênitas, neoplasias e alterações hormonais. Lara et al. (2019) compilaram dados
21 do Sistema de Agravos e Notificação do Ministério da Saúde entre 2007 e 2016 e
22 constataram que os agrotóxicos foram a segunda maior causa de intoxicação e a
23 principal de óbitos dentre os agentes exógenos (medicamentos, drogas de abuso,
24 dentre outros).

25 Os agrotóxicos são classificados de acordo com a espécie na qual eles
26 atuam. Os inseticidas, por exemplo, atuam sobre os insetos, os fungicidas
27 combatem os fungos, mas a principal e mais utilizada classe de agrotóxicos são os
28 herbicidas, os quais representam cerca de 60,35% do total de agrotóxicos
29 comercializados no Brasil (IBAMA, 2021). Os herbicidas possuem a capacidade de
30 suprimir o crescimento ou mesmo de matar espécies específicas de plantas
31 invasoras. Esse efeito se dá por meio da atuação do ingrediente ativo do herbicida
32 em sítios de ação específicos que são, em sua grande maioria, enzimas essenciais

33 para a manutenção da homeostase e do funcionamento normal da planta invasora
34 (ROMAN et al., 2007). Com isso, por atuarem sobre processos biológicos vitais, os
35 herbicidas provocam, em sua grande maioria, efeitos colaterais inclusive sobre o
36 organismo humano levando, por exemplo, a convulsões, enjoos, dermatites,
37 aumento no metabolismo, inibição de enzimas hepáticas, teratogenicidade,
38 dificuldade respiratória, cânceres, dentre outros (TOWNSON, 1992).

39 De acordo com dados de 2020, fornecidos pelo IBAMA, os ingredientes ativos
40 mais vendidos no país e que fazem parte da formulação de agrotóxicos são: o
41 glifosato, seguido do 2,4-D, do mancozebe e da atrazina (IBAMA, 2021). O glifosato
42 é formulado em conjunto com diversos adjuvantes, dentre eles o surfactante
43 polioxietileno amina (POEA), sendo a principal formulação comercial o herbicida
44 Roundup® (VAN BRUGGEN et al., 2018). O glifosato exerce a sua ação sobre as
45 plantas invasoras pela inibição da enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato-sintase
46 (EPSPS), enzima responsável por converter o shikimato-3-fosfato em 5-enolpiruvil-
47 shikimato-3-fosfato. A EPSPS pertence à via do shikimato, a qual é responsável por
48 produzir uma série de aminoácidos essenciais para a planta, como o triptofano, a
49 fenilalanina e a tirosina (STEINRÜCKEN; AMRHEIN, 1980). Por comprometer a
50 formação dos produtos subsequentes da via, a inibição da EPSPS reduz o controle
51 por retroalimentação negativa resultando em um intenso fluxo de carbono para o
52 shikimato-3-fosfato, o qual é convertido em shikimato. Por fim, a morte da planta
53 invasora ocorre pela insuficiência dos aminoácidos essenciais ou mesmo pelo
54 desvio do carbono para a via do shikimato, resultando em escassez de carbono em
55 outras vias essenciais (DUKE; POWLES, 2008).

56 Uma das maneiras de se mensurar a toxicidade de compostos, como os
57 herbicidas, é por meio da quantificação de parâmetros plasmáticos em animais de
58 experimentação que receberam esses herbicidas. Dentre os parâmetros de
59 importância toxicológica é possível citar a creatinina, o colesterol, a glicose, as
60 enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e
61 fosfatase alcalina, além de metais como o ferro. A creatinina é uma molécula
62 produzida pelo metabolismo muscular sendo utilizada para avaliar a função renal.
63 Isso se dá pois, no caso de comprometimento renal, a filtração renal é afetada e as
64 concentrações de creatinina no sangue se elevam. A ALT, a AST e a fosfatase
65 alcalina são enzimas intracelulares e o aumento da atividade dessas enzimas no
66 soro ou no plasma indica o seu extravasamento e, portanto, a presença de lesão

67 tecidual. O local dessa lesão vai depender do tecido em que essas enzimas são
68 encontradas originalmente. A AST é encontrada no fígado, mas também nas
69 hemácias, rins, músculo esquelético e cardíaco. Com isso, a elevação na atividade
70 plasmática da AST pode indicar lesão celular em quaisquer uma dessas
71 células/tecidos. A ALT, por outro lado, está presente principalmente no citoplasma
72 de células do fígado e dos rins, sendo encontrada em pequenas concentrações no
73 coração e no músculo esquelético. O aumento da atividade plasmática desta enzima
74 é um indicador mais específico de lesão hepática se comparado com a AST, mas
75 ambas são frequentemente utilizadas em conjunto para este fim. A fosfatase alcalina
76 é uma enzima encontrada nas células que constituem a borda dos canálculos
77 biliares e dos sinusóides hepáticos. Está presente, também, na mucosa intestinal,
78 nos osteoblastos, no túbulo proximal dos rins, na placenta e nas glândulas
79 mamárias. Uma das condições que pode resultar em aumento da atividade
80 plasmática desta enzima é a colestase. Em ratos, uma parcela importante da
81 fosfatase circulante é proveniente do intestino, sendo influenciada pela ingestão
82 alimentar (ANADÓN; CASTELLANO; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 2014; DZOYEM;
83 KUETE; ELOFF, 2014; RAMAIAH, 2007).

84 Aplicando esses conceitos no âmbito dos herbicidas, Djaber et al. (2020)
85 demonstraram que ratos Wistar machos tratados com doses de 269,9 mg/kg de
86 Roundup[®], por 30 dias, apresentaram redução dos pesos corpóreo e de órgãos como
87 o fígado e os rins. Além disso, foram observadas alterações bioquímicas como
88 aumento de glicemia, triglicerídeos, colesterol e creatinina somado a um aumento na
89 atividade das enzimas AST, ALT, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase. O
90 Roundup[®] provocou ainda danos hepáticos e renais demonstrados pela infiltração de
91 células inflamatórias, degeneração de hepatócitos, necrose e dano glomerular. Jasper
92 et al. (2012) administrando, via gavagem, doses de 50 ou de 500 mg/kg de Roundup[®]
93 em camundongos Swiss por um período de 15 dias, observaram que o Roundup[®]
94 provocou perda de peso, lipoperoxidação hepática e aumento da atividade das
95 enzimas AST, ALT, demonstrando que o herbicida promoveu danos hepáticos.

96 Além de danos hepáticos e renais, a literatura apresenta comprometimentos
97 no sistema nervoso central (SNC) desencadeados pelo glifosato/Roundup[®]. Neste
98 contexto, Martínez et al. (2018) investigaram os efeitos da administração, via
99 gavagem, de glifosato no sistema monoaminérgico (dopamina, noradrenalina e
100 serotonina) central de ratos Wistar machos, com doses de 35 a 800 mg/kg durante 6

101 dias. Os autores observaram que o herbicida reduziu, de forma dose dependente, a
102 quantidade daqueles neurotransmissores no estriado, hipocampo, córtex pré-frontal,
103 hipotálamo e mesencéfalo. Isso denota que o glifosato é capaz de atravessar a
104 barreira hematoencefálica, se acumular em concentrações significativas e exercer
105 neurotoxicidade. Cattani et al. (2014) avaliaram as ações do Roundup® no SNC de
106 ratos Wistar, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. *In vivo*, os autores administraram o
107 Roundup (1%) em ratas prenhas, do dia gestacional 5 ao dia lactacional 15, sendo a
108 prole dessas ratas utilizadas para avaliar os efeitos do herbicida sobre as células
109 hipocampais. *In vitro*, os autores utilizaram fatias do hipocampo de ratos Wistar com
110 15 dias de idade e as expuseram a diferentes concentrações (0,00005–0,1%) de
111 Roundup® durante 30 min. Os autores observaram que o Roundup® provocou, tanto
112 *in vivo* quanto *in vitro*, um aumento na liberação de glutamato e um
113 comprometimento na metabolização deste neurotransmissor pelas células gliais
114 hipocampais, culminando em maior concentração de glutamato na fenda sináptica.
115 O aumento de glutamato, por sua vez, levou à ativação de receptores NMDA
116 provocando influxo de Ca^{2+} , o qual foi potencializado pela ativação de canais de
117 cálcio voltagem dependentes. O excesso de cálcio, por sua vez, induziu um estado
118 de estresse oxidativo e, por fim, de morte celular.

119 Outro herbicida amplamente empregado no Brasil é a atrazina, que age na
120 planta interrompendo o fluxo de elétrons durante o processo de fotossíntese, o que
121 afeta a produção de glicose. Porém, a interrupção da fotossíntese não é o suficiente
122 para matar a planta. O fator chave é que, com a interrupção do fluxo de elétrons,
123 esses elétrons levam à formação de espécies reativas de oxigênio, os quais
124 provocam a peroxidação de lipídeos das membranas, sendo este o processo
125 determinante para a morte da planta (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008).

126 Da mesma maneira como verificado com o glifosato e com o Roundup®, foi
127 também observada toxicidade provocada pela atrazina em animais. Campos-Pereira et
128 al. (2012) constataram estresse oxidativo, lipoperoxidação e degeneração hepática em
129 fase inicial, após 14 dias de gavagem de 400 mg/kg de atrazina em ratos Wistar. Santa
130 Maria, Moreno e Lopez-Campos (1987), utilizando ratos Wistar machos, administraram
131 atrazina, por meio de goma arábica, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, durante 14
132 dias e 600 mg/kg durante 7 dias. Os autores observaram que a atrazina provocou
133 redução do peso corpóreo e da glicemia e elevação na concentração sérica de lipídeos,
134 além de aumento da atividade plasmática de ALT e de fosfatase alcalina.

135 Chávez-Pichardo et al. (2020), após 14 meses de administração de 1 a 10
136 mg/kg de atrazina, em ratos Sprague Dawley, verificaram aumento nas
137 concentrações de GABA, glutamato e glutamina em várias áreas do SNC (núcleo
138 accumbens, estriado, amígdala e mesencéfalo) com alterações motoras
139 (hiperatividade) e comportamentais (ansiedade). Song et al. (2015) investigaram, *in*
140 *vivo*, as ações da atrazina em neurônios dopaminérgicos. Para isso, os autores
141 utilizaram ratos Wistar machos os quais receberam, via gavagem, 10, 50 ou 100
142 mg/kg deste herbicida durante 3 meses. Foi observado que a atrazina provocou, de
143 forma dose dependente, degeneração de neurônios no estriado e redução de
144 neurônios tirosina hidroxilase positivos no mesencéfalo.

145 Após avaliar todos esses estudos, foi possível observar a amplitude e a
146 extensão dos efeitos tóxicos causados por herbicidas, em especial, pelo glifosato,
147 Roundup® e atrazina constatados por meio de diferentes doses, vias de
148 administração e modelos experimentais. Neste contexto, uma molécula ou um
149 conjunto de moléculas que possa oferecer proteção contra esses efeitos tóxicos
150 assume um papel relevante e que desperta interesse, e é justamente nesses
151 predicados que se enquadram as nanopartículas de óxido de ferro.

152 As nanopartículas de óxido de ferro têm se mostrado promissoras como
153 potenciais remediadoras de contaminantes ambientais, como os herbicidas. Como
154 exemplos dessas nanopartículas podemos citar a ferrihidrita ($\text{Fe}_5\text{OH}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), a
155 hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e a magnetita (Fe_3O_4). Devido ao seu
156 pequeno tamanho, essas nanopartículas possuem alta razão superfície/volume e
157 reatividade, além de elevada capacidade de adsorção para uma série de herbicidas
158 como as imidazolinonas, a atrazina e o glifosato (SCHWANDT et al., 1992; LEONE
159 et al., 2001; PROCÓPIO et al., 2001; GUTIERREZ; DZIUBLA; HILT, 2017; ORCELLI
160 et al., 2018; PEREIRA et al., 2019).

161 As nanopartículas de óxido de ferro tem sido estudadas em uma série de
162 aplicações como transporte de fármacos, ação antimicrobiana, contraste para
163 ressonância magnética e tratamento de doenças (ARIAS et al., 2018; DADFAR et
164 al., 2019). No transporte de fármacos, as nanopartículas têm sido utilizadas no
165 transporte de imunossupressores, anticonvulsivantes, anti-inflamatórios, antibióticos,
166 antifúngicos e antitumorais, com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade e a
167 estabilidade e reduzir efeitos colaterais desses fármacos, dentre outros (HWANG et
168 al., 2016; ROSILLO-DE LA TORRE et al., 2015; SREEJA; NAIR, 2018). A respeito

169 da ação antimicrobiana, ela ocorre por conta de mecanismos como despolarização
170 de membranas com conseqüente comprometimento da integridade celular, produção
171 de espécies reativas de oxigênio com lipoperoxidação e danos ao DNA e liberação
172 de íons metálicos que afetam a homeostase celular (ARIAS et al., 2018). Todos
173 esses mecanismos podem ser utilizados, por exemplo, para aumentar a eficácia de
174 antibióticos ou para revestir a superfície de cateteres e reduzir a formação de
175 biofilmes (BILCU et al., 2014; GRUMEZESCU et al., 2014). Por fim, no que tange o
176 aspecto de tratamento, as nanopartículas de óxido de ferro têm sido empregadas
177 como suplemento de ferro nos casos de anemia, na modulação do fenótipo M2 de
178 macrófagos para M1, o qual apresenta atividade pró-inflamatória e antitumoral, e
179 também na hipertermia por fluido magnético (LASKAR et al., 2013; MAIER-HAUFF
180 et al., 2011; SPINOWITZ et al., 2008). Nesta técnica, um campo magnético externo é
181 incidido sobre as nanopartículas previamente administradas no paciente no local
182 desejado e, como conseqüência, gera-se movimento nas nanopartículas e, portanto,
183 calor. A temperatura do local pode atingir mais de 46 °C levando à desnaturaçã
184 proteica das células do entorno em que a técnica é aplicada, sendo empregada
185 principalmente no tratamento de tumores (KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

186 Todavia, já foi observado que as nanopartículas de óxido de ferro podem cruzar
187 membranas e barreiras biológicas e, dependendo da dose, ocasionar alterações
188 fisiológicas (SINGH et al., 2010). Ao entrar nas células, os lisossomos degradam
189 essas nanopartículas liberando o seu conteúdo de ferro, que pela reação de Fenton
190 pode agir como catalisador na formação de espécies reativas de oxigênio e na gênese
191 do estresse oxidativo (VOLATRON et al., 2017; YARJANLI et al., 2017), que é, para o
192 sistema nervoso central (SNC), especialmente danoso (YARJANLI et al., 2017).

193 Kumari et al. (2012), por exemplo, administrando por 28 dias, via gavagem,
194 30, 300 ou 1000 mg/kg de hematita em ratas Wistar, verificaram que a dose maior
195 provocou redução da ingestão alimentar, entorpecimento e irritação, mas sem
196 mortalidade, e que, no SNC, ocorreu inibição da acetilcolinesterase e da $\text{Na}^+ - \text{K}^+$,
197 Ca^{2+} e Mg^{2+} ATPases, enquanto que no plasma a nanopartícula levou ao aumento
198 de AST, ALT e da lactato desidrogenase. Aumento de ferro, na urina, fezes, rins,
199 pulmões, coração, cérebro, testículos, baço, sangue e fígado também foi encontrado
200 após injeções endovenosas semanais de hematita (7, 15 e 30 mg/kg), sendo a
201 resposta dose dependente (GAHARWAR; MEENA; RAJAMANI, 2019). Wu, Ding e
202 Sun (2013), por instilação nasal em ratos Sprague Dawley de magnetita (1 a 4 doses

203 de 20 mg), observaram acúmulo da nanopartícula principalmente no bulbo olfatório,
204 estriado e hipocampo, constatando-se estresse oxidativo. Foi observado também
205 que a magnetita pode promover depleção de dopamina e aumento da expressão de
206 α -sinucleína, estresse oxidativo e comprometimento da barreira hematoencefálica
207 (IMAM et al., 2015). Por fim, Jain et al. (2008) também encontraram aumento na
208 concentração de ferro no sangue, fígado, baço, cérebro e coração, após 21 dias da
209 administração endovenosa de 10 mg/kg de magnetita, além de aumento plasmático
210 da atividade de AST, ALT e fosfatase alcalina.

211 Por outro lado, uma nanopartícula de óxido de ferro natural que tem
212 despertado especial interesse é a ferrihidrita ($\text{Fe}_5\text{OH}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Ela está presente no
213 meio ambiente como uma nanopartícula, sendo muito abundante, tanto no solo
214 quanto no próprio corpo humano, compondo o núcleo da ferritina, que é a proteína
215 responsável pelo armazenamento de ferro no organismo (CHILOM et al., 2020;
216 SVOBODOVA et al., 2020). Além disso, a sua área superficial (200 a 400 m^2/g) é
217 muito maior que a dos outros óxidos de ferro ($<100 \text{m}^2/\text{g}$), o que confere à ferrihidrita
218 uma excelente capacidade adsorptiva para moléculas orgânicas (PEREIRA et al.,
219 2019). Este fato, somado à sua habilidade de adsorver íons, faz com que este óxido
220 de ferro possua elevado potencial para remediar contaminantes industriais e naturais
221 (WEATHERILL et al., 2016). Em nossas buscas pela literatura, todavia, apesar da
222 importância deste tema, não encontramos estudos avaliando a ação protetora da
223 ferrihidrita sobre os herbicidas em nenhum modelo experimental, *in vitro* ou mesmo
224 em diferentes espécies, como por exemplo, ratos e ratas.

225 Em suma, a literatura relata que os herbicidas Roundup[®], glifosato e atrazina
226 apresentam uma série de efeitos tóxicos sistêmicos. Além disso, foi observado que
227 as nanopartículas de óxido de ferro, em especial a ferrihidrita, apresentam diversas
228 características físico-químicas interessantes e, por conta disso, elas se enquadram
229 como potenciais remediadoras dos herbicidas. Desta forma, para se preencher esta
230 lacuna de conhecimento, torna-se extremamente relevante verificar se a ferrihidrita é
231 capaz de proteger contra a toxicidade do herbicida glifosato e dos formulados
232 Roundup[®] e atrazina. Assim, este trabalho avaliou o papel protetor da ferrihidrita
233 sobre o herbicida glifosato e os produtos formulados Roundup[®] e atrazina. Com isso,
234 espera-se que a ferrihidrita seja capaz de proteger contra os efeitos do herbicida e
235 dos formulados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em ratos e ratas, se a nanopartícula de ferrihidrita é eficaz em evitar os efeitos tóxicos provocados pelos herbicidas Roundup®, glifosato e atrazina.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Por meio da administração dos herbicidas e da ferrihidrita isoladamente ou da associação entre ambos, foram avaliados:

- a) ingestão alimentar e peso corpóreo, para averiguar a saúde e o desenvolvimento do animal;
- b) parâmetros plasmáticos (glicose, colesterol, AST, ALT, fosfatase alcalina, creatinina e ferro) para detectar alterações metabólicas e funcionais;
- c) concentração de ferro no SNC, para determinar alteração na quantidade do metal, pois o seu aumento é prejudicial para a função neural.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

236 Foram utilizados ratos adultos, da linhagem Wistar, sendo 75 machos,
237 pesando entre 270 a 290 g, e 75 fêmeas, pesando entre 240 a 260 g, provenientes
238 do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram
239 mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF), em
240 gaiolas individuais, por 5 dias para ambientação antes dos experimentos, em
241 ambiente controlado de luz (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 °C) e com
242 alimento e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados no LaFiNeM-
243 Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo, do CIF, entre 9 e 11 h a
244 fim de minimizar interferências do ciclo circadiano. Este protocolo foi aprovado pela
245 Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA; protocolo nº. 30861.2014.66,
246 OF.CIRC.CEUA nº 045/2015, Anexo 1, e OF.CIRC.CEUA nº 86/2021, Anexo 2).

3.2 HERBICIDAS

247 Foram adquiridos na ADAMA Brasil (Londrina, PR), o glifosato, na forma de
248 sal puro, e o formulado Roundup® Original (Monsanto do Brasil, LTDA), composto de
249 480 g/L de sal de isopropilamina de glifosato, 360 g/L de equivalente ácido de n-
250 fosfometil-glicina (glifosato) e 684 g/L de ingredientes inertes. O formulado da
251 atrazina (6-chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine), Gesaprim 500
252 CibaGeigy, foi adquirido na Agrotterra Implementos e Defensivos Agrícolas (Ibiporã-
253 PR) possuindo, em sua composição, 500 g/L do princípio ativo atrazina e 600 g/L de
254 ingredientes inertes.

255 Para todas as administrações, foi utilizada cânula de gavagem apropriada
256 para ratos (agulha-cânula de gavagem para roedores, Insight Ltda., SP).

3.3 NANOPARTÍCULAS

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

263 A ferrihidrita, dissolvida em água destilada, foi administrada por gavagem, na
264 dose de 1.000 mg/kg de peso corpóreo tanto isolada quanto associada aos herbicidas.
265 Considerando que o glifosato interage fortemente com a ferrihidrita, que 80% desta
266 interação é como um complexo de esfera interna e que os grupos fosfato e amina
267 estão envolvidos, a dose da nanopartícula foi escolhida baseada nessa capacidade
268 adsorptiva para garantir boa adsorção aos herbicidas (PEREIRA et al., 2019).

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

269 Os animais constituíram 15 grupos para cada gênero (5 ratos/grupo). Entre 9
270 e 11 h, 7 grupos receberam, por um dia (grupos D1), 1 dose de:

- 271 - glifosato (G), 1000 mg/kg de peso corpóreo;
- 272 - formulado a base de glifosato - Roundup® (R), 1000 mg/kg de peso corpóreo;
- 273 - formulado a base de atrazina (A), 1000 mg/kg de peso corpóreo;
- 274 - ferrihidrita (F), 1000 mg/kg de peso corpóreo;
- 275 - ferrihidrita associada ao glifosato (FG), 1000 mg/kg de peso corpóreo de cada
276 substância;
- 277 - ferrihidrita associada ao formulado à base de glifosato - Roundup® (FR), 1000
278 mg/kg de peso corpóreo de cada substância;
- 279 - ferrihidrita associada ao formulado à base de atrazina (FA), 1000 mg/kg de peso
280 corpóreo de cada substância.

281 Outros 7 grupos receberam 4 doses, 1 dose por dia por 4 dias (grupos D4) das
282 mesmas composições. Para o grupo controle, os animais receberam água de
283 torneira em 4 doses, sendo 1 dose por dia.

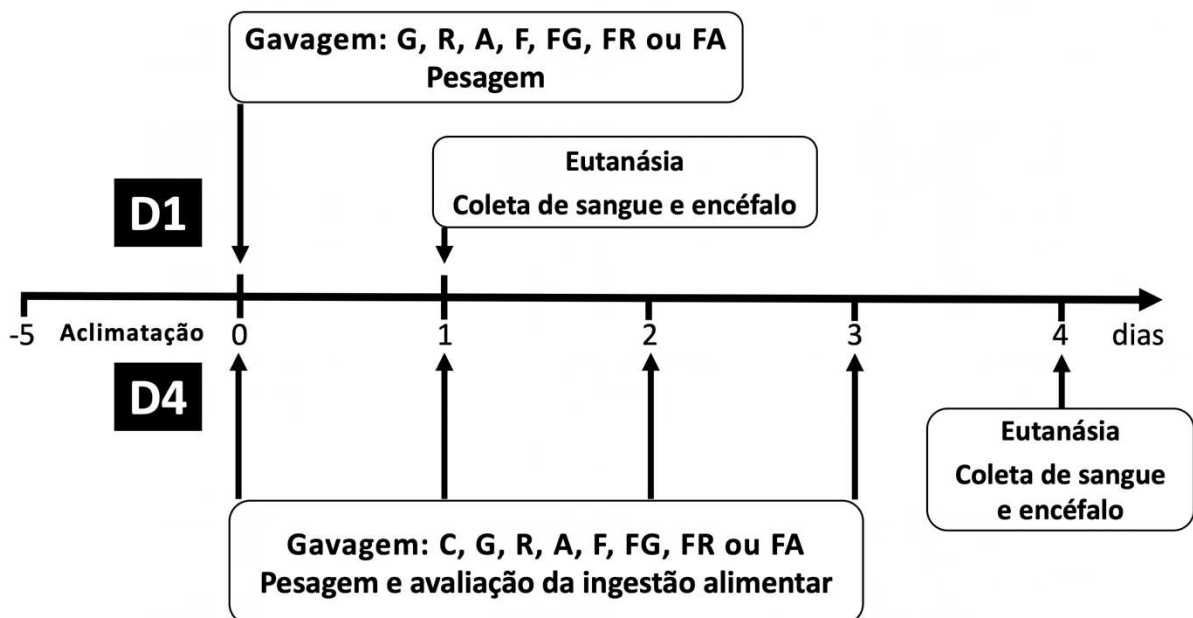
284 As doses dos herbicidas, o número de animais por grupo, a via de
285 administração e o volume administrado (0,4 mL/100 g peso corpóreo) basearam-se
286 nos protocolos de avaliação de toxicidade do *Guideline Test No.423: Acute Oral*
287 *toxicity - Acute Toxic Class Method* elaborado pela *Organisation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

290 Previamente, foram realizados testes piloto com doses menores (100, 300 e
291 600 mg/kg) dos herbicidas, conforme indicado no *guideline* elaborado pela OECD
292 (2001). Porém, não foram observadas alterações significativas em relação ao controle.
293 Como o objetivo do trabalho é averiguar o papel protetor da nanopartícula de
294 ferrihidrita, é necessário, impreterivelmente, que haja alterações provocadas pelo

295 herbicida e pelos formulados a fim de se avaliar esse efeito protetor. Com isso, optou-se
 296 se pela dose de 1000 mg/kg, valor este que consta no *guideline* da EMA (2010) e que
 297 é a metade da dose máxima indicada pela OECD (2001). Além disso, foi usada a
 298 mesma dose entre o herbicida glifosato e os formulados Roundup® e atrazina a fim de
 299 se permitir as comparações entre o herbicida e os formulados. Por fim, outro ponto
 300 observado no piloto é que, após 4 dias, a mortalidade dos grupos era muito elevada
 301 comprometendo a análise estatística do estudo. Assim, as quatro administrações e a
 302 dose foram escolhidas a fim de provocar algum grau de mortalidade entre os animais,
 303 fato este recomendado pelo *guideline* da OECD (2001), e alterar os parâmetros
 304 avaliados neste trabalho.

305 Os grupos D1 foram realizados para determinar se apenas uma exposição ao
 306 herbicida, aos formulados, à nanopartícula e às associações promovem alterações
 307 nos parâmetros analisados.

308 Todos os animais foram pesados diariamente e a quantidade de alimento
 309 ingerido foi quantificada. Os animais foram submetidos à eutanásia, por decapitação,
 310 24 h após a última gavagem, sendo que o sangue foi coletado para as dosagens
 311 químicas e o cérebro retirado para determinação de ferro (figura 2).



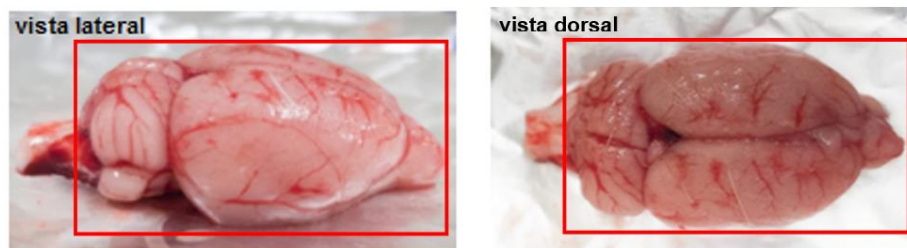
312 **Figura 1.** Linha temporal do protocolo experimental dos ratos e ratas que receberam,
 313 via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1)
 314 ou por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup®
 315 (R), atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA).

3.5 AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO E DA INGESTÃO ALIMENTAR

316 A partir dos valores obtidos do peso corpóreo, foi calculado o delta (Δ) do peso
 317 corpóreo, sendo: $\Delta = [\text{peso final (dia da eutanásia:D1 ou D4)} - \text{peso inicial (primeiro}$
 318 $\text{dia de tratamento:D0})]$. Para o cálculo da ingestão alimentar, foram oferecidos aos
 319 animais 100 g de ração balanceada para roedores (Nuvilab CR1, Nuvital®) e, após 24
 320 h, as sobras foram pesadas. A partir da diferença entre o valor inicial e o final, foi
 321 calculada a quantidade diária de alimento ingerido, sendo expressa em g/100 g de
 322 peso corpóreo. A partir deste valor, a área sob a curva da ingestão alimentar (AUC) ao
 323 longo dos quatro dias de tratamento foi determinada para cada animal.

3.6 EUTANÁSIA

324 Imediatamente após a decapitação, o sangue foi coletado em tubos
 325 heparinizados, que foram centrifugados a 14.000 x g, por 20 min, a 4 °C, e o plasma
 326 obtido foi armazenado em freezer (-20 °C) para posteriores análises químicas.
 327 Foram também retirados os encéfalos, sendo descartada a porção imediatamente
 328 caudal do bulbo após o cerebelo, e armazenados em freezer a -86 °C, para posterior
 329 determinação de ferro.



330 **Figura 2.** Encéfalo de rato. Os retângulos vermelhos delimitam a
 331 área utilizada para homogeneização e quantificação de ferro. Fonte:
 332 próprio autor.

3.7 DOSAGENS QUÍMICAS

3.7.1 Glicose

333 A quantificação de glicose foi realizada por meio de kit comercial enzimático
 334 colorimétrico (Glicose BioLiquid, Laborclin, PR) baseado no método de Trinder
 335 (TRINDER, 1969). Nesta reação, a glicose plasmática é oxidada pela glicose
 336 oxidase formando ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de

337 hidrogênio, por sua vez, reage com a 4-aminoantipirina e com o fenol e, por meio da
338 peroxidase, ocorre a formação da quinoneimina, um complexo de cor vermelha. A
339 absorvância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-Vis
340 1203), sendo que a intensidade da coloração é proporcional à concentração de
341 glicose presente na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL.

3.7.2 Colesterol Total

342 O colesterol total foi quantificado por meio de kit comercial enzimático
343 colorimétrico (Analisa) baseado no método de Allain (ALLAIN et al., 1974). Nesta
344 reação, os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase.
345 Como resultado, ocorre a formação de colesterol livre e de ácidos graxos. Em
346 seguida, o colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase formando colest-4-en-3-
347 ona e peróxido de hidrogênio. Na próxima etapa, o peróxido reage com o fenol e a 4-
348 aminoantipirina e, por meio da enzima peroxidase, ocorre a formação de
349 quinoneimina, um complexo de cor vermelha. A intensidade da coloração é
350 proporcional à concentração de colesterol presente na amostra e a absorvância foi
351 mensurada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-Vis 1203). Os resultados foram
352 expressos em mg/dL.

353

3.7.3 Aspartato Aminotransferase (AST)

354 A atividade plasmática de AST foi determinada por meio de kit comercial
355 colorimétrico (Analisa) baseado no método de Reitman-Frankel (REITMAN;
356 FRANKEL, 1957). Por este método, a AST catalisa a transferência do grupo amina
357 do aminoácido aspartato para o α -cetoglutarato, formando glutamato e oxaloacetato.
358 Em seguida, o oxaloacetato reage com a 2-4-dinitrofenilhidrazina formando a
359 hidrazona, a qual adquire coloração máxima devido à adição de hidróxido de sódio.
360 A intensidade da coloração resultante é proporcional à atividade da AST presente na
361 amostra (MOHUN; COOK, 1957). Por fim, a absorvância foi mensurada em
362 espectrofotômetro (Shimadzu UV-Vis 1203) e os resultados foram expressos em U/L
363 (U= unidade de atividade enzimática).

3.7.4 Alanina Aminotransferase (ALT)

364 A atividade plasmática de ALT foi quantificada utilizando um kit comercial
365 colorimétrico (Analisa) que se baseia no método de Reitman-Frankel (REITMAN;

366 FRANKEL, 1957). A ALT catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o α -
367 cetoglutarato, formando glutamato e piruvato. O piruvato, por sua vez, reage com a 2-
368 4-INITROFENILHIDRAZINA formando a hidrazona, a qual adquire coloração máxima por meio
369 da adição de hidróxido de sódio. A intensidade da coloração resultante é proporcional
370 à atividade da ALT presente na amostra (MOHUN; COOK, 1957). Por fim, a
371 absorvância foi mensurada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-Vis 1203) e os
372 resultados foram expressos em U/L.

3.7.5 Fosfatase Alcalina

373 A atividade plasmática da fosfatase alcalina foi mensurada por meio de kit
374 comercial cinético-colorimétrico (Analisa), o qual utiliza uma modificação da
375 metodologia proposta por Roy (ROY, 1970). Nesta análise, a fosfatase alcalina
376 presente na amostra hidrolisa o substrato de timolftaleína monofosfato, liberando
377 timolftaleína e fosfato inorgânico. Por meio da adição de hidróxido de sódio, a ação
378 enzimática é inibida e a timolftaleína adquire cor azul. A intensidade da coloração
379 resultante é proporcional à atividade da fosfatase alcalina presente na amostra. Por
380 fim, a absorvância foi mensurada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-Vis 1203) e
381 os resultados foram expressos em U/L.

3.7.6 Creatinina

382 A concentração de creatinina foi determinada por meio de kit comercial
383 (Analisa), que utiliza uma modificação da metodologia colorimétrica do picrato-
384 alcalino proposta inicialmente por Jaffe, em 1886 (HEINEGÅRD; TIDERSTRÖM,
385 1973). A creatinina e os interferentes cromogênicos presentes na amostra reagem
386 com o picrato alcalino formando um complexo colorido. Neste momento é realizada
387 a leitura no espectrofotômetro (Shimadzu UV-Vis 1203) para a obtenção da primeira
388 absorvância (A1). A adição de um acidificante reduz o pH da solução para 5,0, o que
389 decompõe o complexo que a creatinina formou com o picrato alcalino (picrato de
390 creatinina), mas deixa inalterada a cor derivada dos interferentes cromogênicos. Com
391 isso, é realizada a segunda leitura no espectrofotômetro para a obtenção da
392 segunda absorvância (A2). A absorvância a ser considerada para a quantificação da
393 creatinina resulta da subtração da primeira com a segunda absorvância (A1 – A2).
394 Isso permite que o cálculo seja realizado apenas em função da creatinina,

395 desconsiderando a absorvância proveniente dos interferentes cromogênios. Por fim,
396 os resultados foram expressos em mg/dL.

3.7.7 Ferro

397 A quantificação de ferro foi realizada tanto nos plasmas quanto nos encéfalos.
398 Os encéfalos foram homogeneizados e os homogenatos foram desidratados à 60 °C.
399 O tecido totalmente seco foi digerido, de acordo com o método de Alves e Wood
400 (2006), com solução de HNO₃ ultrapuro 5 N (1:20, peso/volume) e então mantido à
401 60 °C por 48 horas resultando em uma solução de tecido nervoso digerido. A partir,
402 tanto dessa solução quanto dos plasmas, foi realizada a determinação de ferro em
403 espectrômetro de absorção atômica com atomizador de forno de grafite (AAAnalyst
404 700, Perkin-Elmer). A curva de calibração foi realizada utilizando solução padrão de
405 ferro (Ultra Scientific, USA). Por fim, a concentração de ferro dos encéfalos foi
406 expressa em µg/g de tecido nervoso seco, enquanto que a concentração de ferro
407 nos plasmas foi expressa em mg/L.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

408 Os dados que atenderam os pressupostos de normalidade e de
409 homogeneidade foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA *oneway*. Nos dados
410 em que o ANOVA indicou diferença entre as médias, foi utilizado o pós-teste de
411 Student Newman Keuls (SNK). Os dados submetidos ao teste paramétrico foram
412 expressos em gráficos de barras como média e erro padrão da média. Nos casos em
413 que os pressupostos de normalidade e/ou de homogeneidade não foram atendidos,
414 foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal Wallis seguido do pós teste de Dunn. Os
415 dados submetidos ao teste não paramétrico foram expressos em gráficos de *boxplot*
416 como mediana, primeiro e terceiro quartis. O tamanho de efeito, tanto para as
417 análises paramétricas quanto para as análises não paramétricas, foi calculado pelo
418 eta quadrado (η^2) (TOMCZAK; TOMCZAK, 2014). O nível de significância
419 considerado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA NANOPARTÍCULA DE FERRIHDRITA

420 A nanopartícula de óxido de ferro ferrihidrita isoladamente não provocou
421 mortalidade (tabela 1), não alterou peso corpóreo e nem ingestão alimentar durante
422 os períodos de administração (D1 e D4), tanto em machos (figura 3) como em
423 fêmeas (figura 4). As únicas alterações observadas foram redução plasmática de
424 ALT (figura 8) nos grupos de fêmeas em D1 ($p=0,046$) e em D4 ($p=0,022$) e redução
425 plasmática da fosfatase alcalina ($p=0,028$) nos grupos de fêmeas em D1 (figura 8).

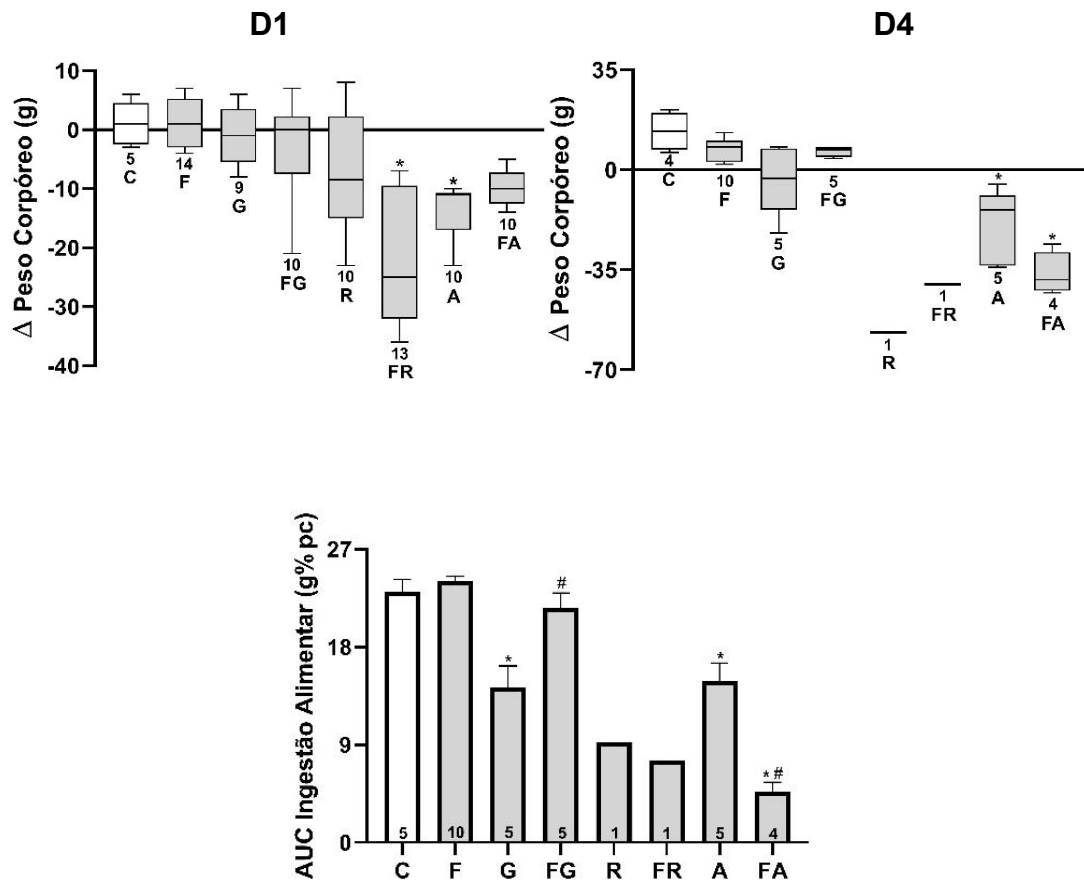
4.2 EFEITO DO GLIFOSATO E DA ASSOCIAÇÃO DE FERRIHDRITA COM GLIFOSATO

426 O glifosato não provocou mortalidade (tabela 1) nos machos ou nas fêmeas,
427 nem a associação da ferrihidrita com o glifosato no período estudado. O glifosato
428 promoveu redução ($p=0,015$) do peso corpóreo (figura 4) nas fêmeas do grupo D4
429 em relação ao controle e redução da ingestão alimentar, durante o período
430 estudado, tanto para os machos ($p<0,001$; figura 3) quanto para as fêmeas
431 ($p=0,033$; figura 4), comparados com os respectivos controles. Por outro lado,
432 quando a ferrihidrita foi administrada com o glifosato, não houve diminuição do peso
433 corpóreo para as fêmeas do grupo D4 (figura 4) e a ingestão de alimentos foi
434 semelhante ao controle tanto para o grupo de machos (figura 3) quanto para o de
435 fêmeas (figura 4) em relação ao controle. Nenhum dos parâmetros plasmáticos
436 (figura 5, figura 6, figura 7, figura 8, figura 9 e figura 10) avaliados ou de ferro no
437 cérebro (figura 9 e figura 10) se alteraram nesses grupos somente com glifosato ou
438 com ferrihidrita mais glifosato nos períodos estudados.

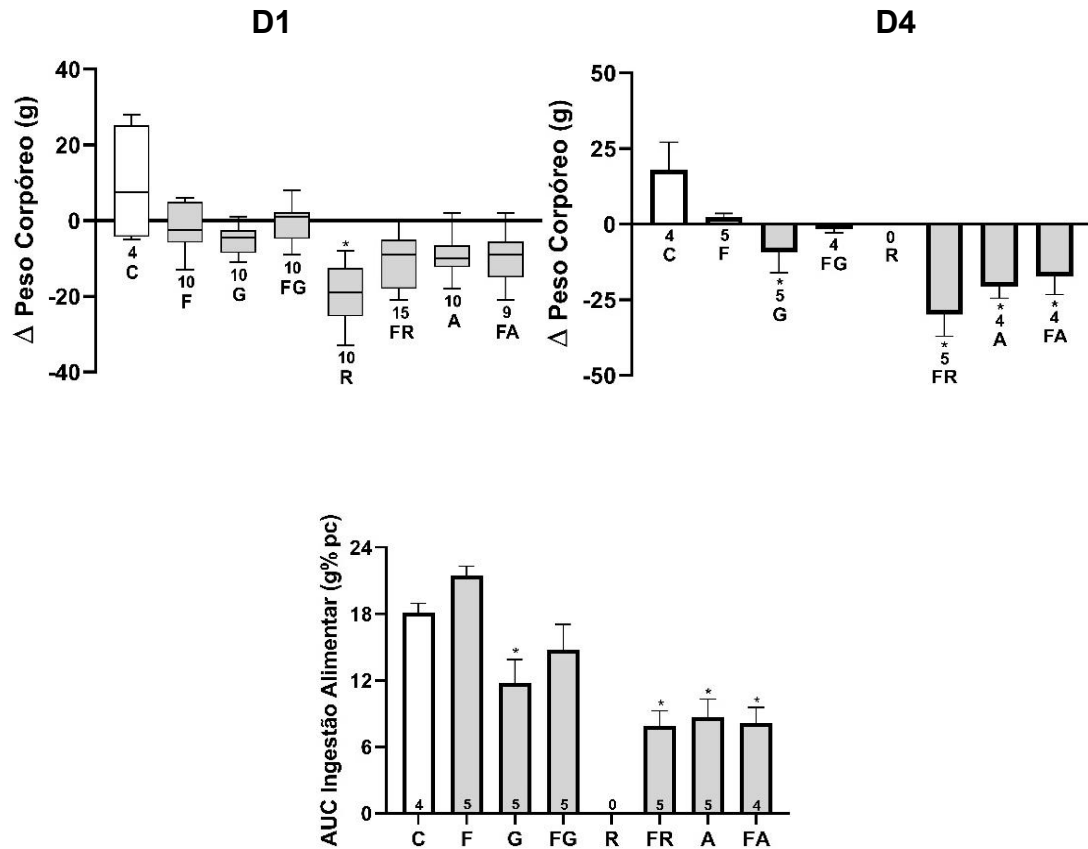
Tabela 1. Dados de mortalidade (%) de ratos e ratas.

		Mortalidade (%)	
		D1	D4
Ratos	grupos		
	C	0	0
	F	0	0
	G	0	0
	FG	0	0
	R	0	80
	FR	0	80
	A	0	0
FA	0	20	
Ratas	grupos		
	C	0	0
	F	0	0
	G	0	0
	FG	0	0
	R	0	100
	FR	0	0
	A	0	20
FA	0	20	

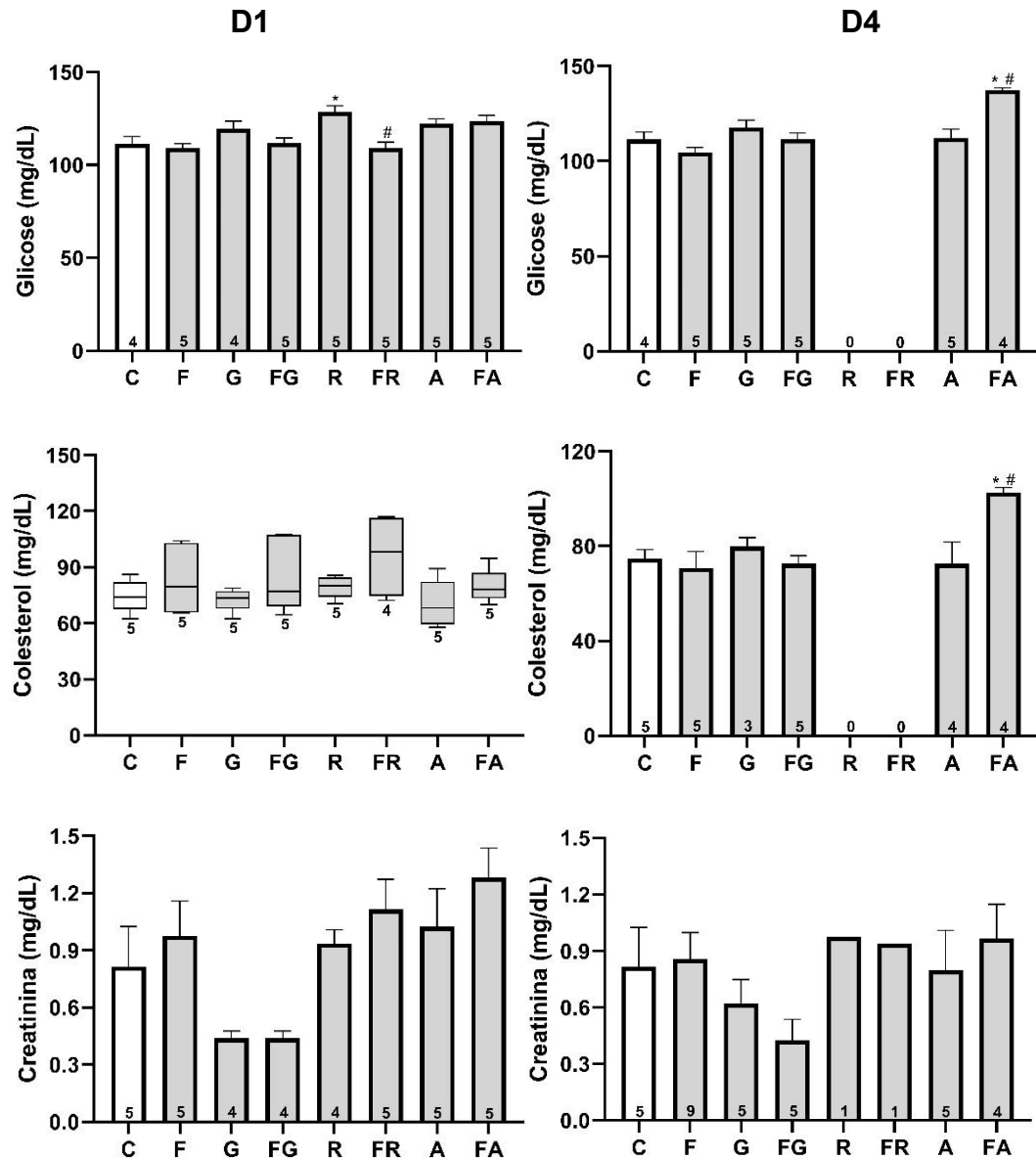
439 Os animais receberam, via gavagem, dose (1000
 440 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia
 441 (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C,
 442 controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R)
 443 ou atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula
 444 com os herbicidas (FG, FR e FA).



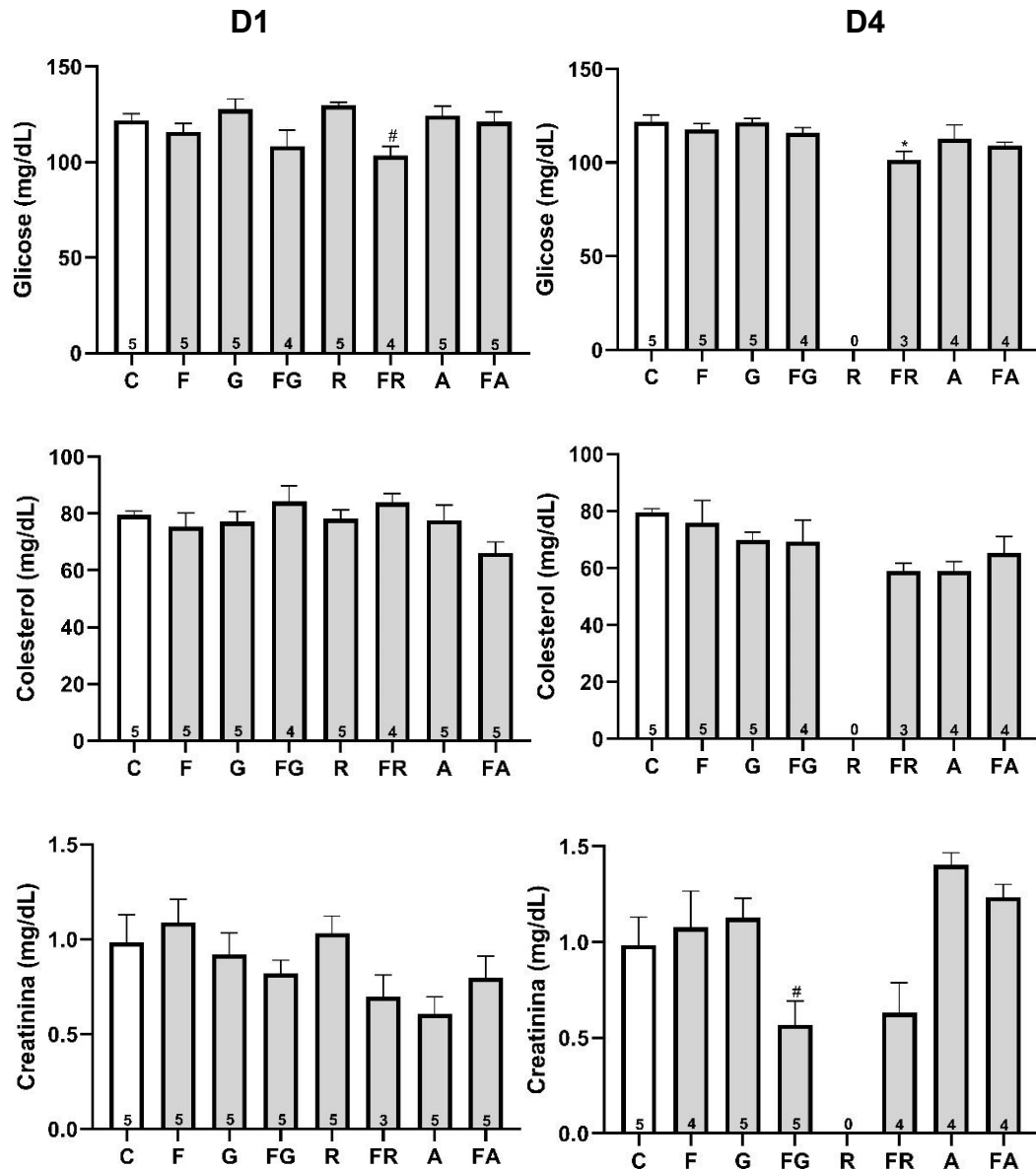
445 **Figura 3.** Δ Peso corpóreo (g) e quantidade de alimento ingerido (g/100 g de peso
 446 corpóreo) de ratos que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso
 447 corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C,
 448 controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a
 449 combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA). AUC (área sob a
 450 curva): quantidade ingerida de alimento durante 4 dias. Peso corpóreo (análise por
 451 Kruskal Wallis), sendo em D1: $H(7)=46,04$; $p<0,001$; $\eta^2=53,48$; e em D4 $H(5)=22,72$;
 452 $p<0,001$; $\eta^2=65,63\%$. AUC (análise por ANOVA *oneway*): $F(5,28)=33,96$; $p<0,001$;
 453 $\eta^2=85,84\%$. Gráficos *boxplot*: mediana, primeiro e terceiro quartis. Gráfico de barras:
 454 média e erro padrão da média. Número de animais do grupo na respectiva barra.
 455 *Diferente do grupo C. #Diferente do respectivo grupo somente com herbicida.



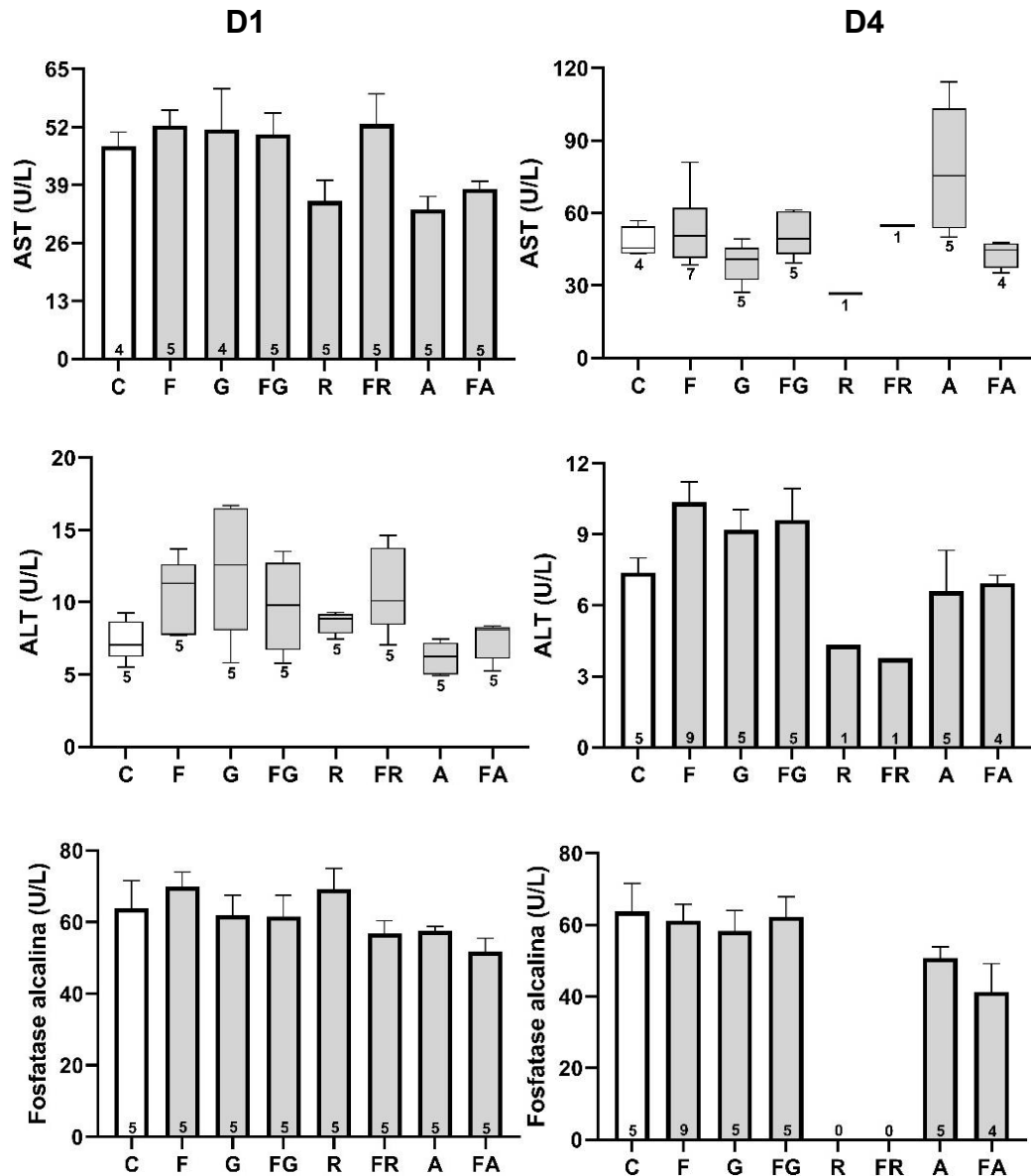
456 **Figura 4.** Δ Peso corpóreo (g) e quantidade de alimento ingerido (g/100 g de peso
 457 corpóreo) de ratas que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso
 458 corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C,
 459 controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a
 460 combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA). AUC (área sob a
 461 curva): quantidade ingerida de alimento durante 4 dias. Peso corpóreo em D1
 462 (análise por Kruskal Wallis): $H(7)=30,30$; $p<0,001$; $\eta^2=44,71\%$. Peso corpóreo em
 463 D4 (análise por ANOVA *oneway*): $F(6,24)=7,51$; $p<0,001$; $\eta^2=65,25\%$. AUC (análise
 464 por ANOVA *oneway*): $F(6,26)=10,59$; $p<0,001$; $\eta^2=70,97\%$. Gráficos *boxplot*:
 465 mediana, primeiro e terceiro quartis. Gráfico de barras: média e erro padrão da
 466 média. Número de animais do grupo na respectiva barra. *Diferente do grupo C.



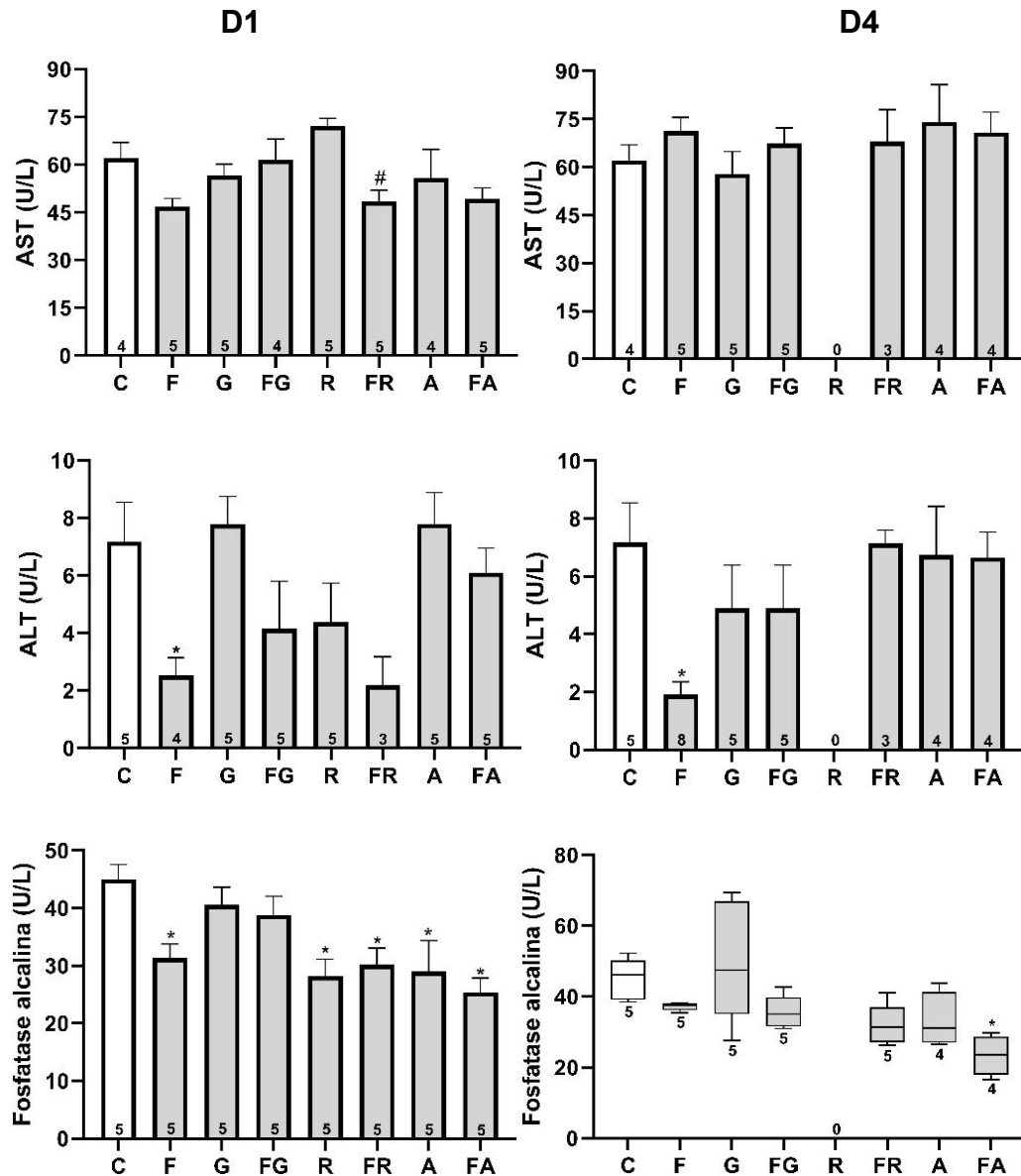
467 **Figura 5.** Valores plasmáticos de glicose (mg/dL), colesterol total (mg/dL) e creatinina
 468 (mg/dL) de ratos que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo)
 469 única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle),
 470 ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a combinação da
 471 nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA). Glicose (análise por ANOVA
 472 *oneway*), sendo em D1: $F(7,30)=5,69$; $p<0,001$; $\eta^2=57,03\%$; e em D4: $F(5,22)=9,67$;
 473 $p<0,001$; $\eta^2=68,73$. Colesterol D1 (análise por Kruskal Wallis): $H(7)=7,42$; $p=0,387$;
 474 $\eta^2=1,34\%$. Colesterol D4 (análise por ANOVA *oneway*): $F(5,20)=4,47$; $p=0,007$;
 475 $\eta^2=52,77\%$. Creatinina (análise por ANOVA *oneway*), sendo em D1: $F(7,29)=3,41$;
 476 $p=0,009$; $\eta^2=45,16\%$; e em D4: $F(5,27)=1,20$; $p=0,334$; $\eta^2=18,21\%$. Gráfico *boxplot*:
 477 mediana, primeiro e terceiro quartis. Gráficos de barras: média e erro padrão da média.
 478 Número de animais do grupo na respectiva barra. *Diferente do grupo C. #Diferente do
 479 respectivo grupo somente com herbicida.



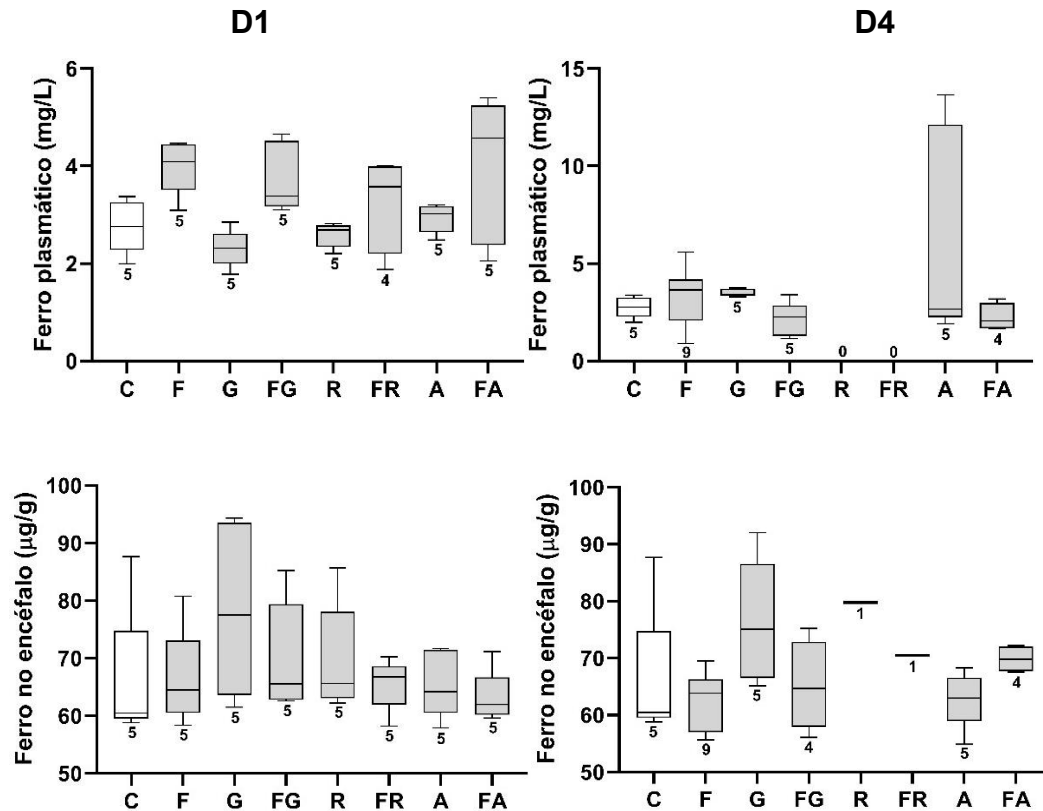
480 **Figura 6.** Valores plasmáticos de glicose (mg/dL), colesterol total (mg/dL) e
 481 creatinina (mg/dL) de ratas que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso
 482 corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C,
 483 controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a
 484 combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA). Glicose (análise por
 485 ANOVA *oneway*), sendo em D1: $F(7,30)=3,33$; $p=0,01$; $\eta^2=43,74\%$; e em D4:
 486 $F(6,23)=3,15$; $p=0,021$; $\eta^2=45,08\%$. Colesterol (análise por ANOVA *oneway*), sendo
 487 em D1: $F(7,30)=1,9$; $p=0,105$; $\eta^2=30,71\%$; e em D4: $F(6,23)=2,22$; $p=0,077$;
 488 $\eta^2=36,72\%$. Creatinina (análise por ANOVA *oneway*), sendo em D1: $F(7,32)=2,33$;
 489 $p=0,048$; $\eta^2=33,80\%$; e em D4: $F(6,24)=5,54$; $p=0,001$; $\eta^2=58,08\%$. Gráfico de
 490 barras: média e erro padrão da média. Número de animais do grupo na respectiva
 491 barra. *Diferente do grupo C. #Diferente do respectivo grupo somente com herbicida.



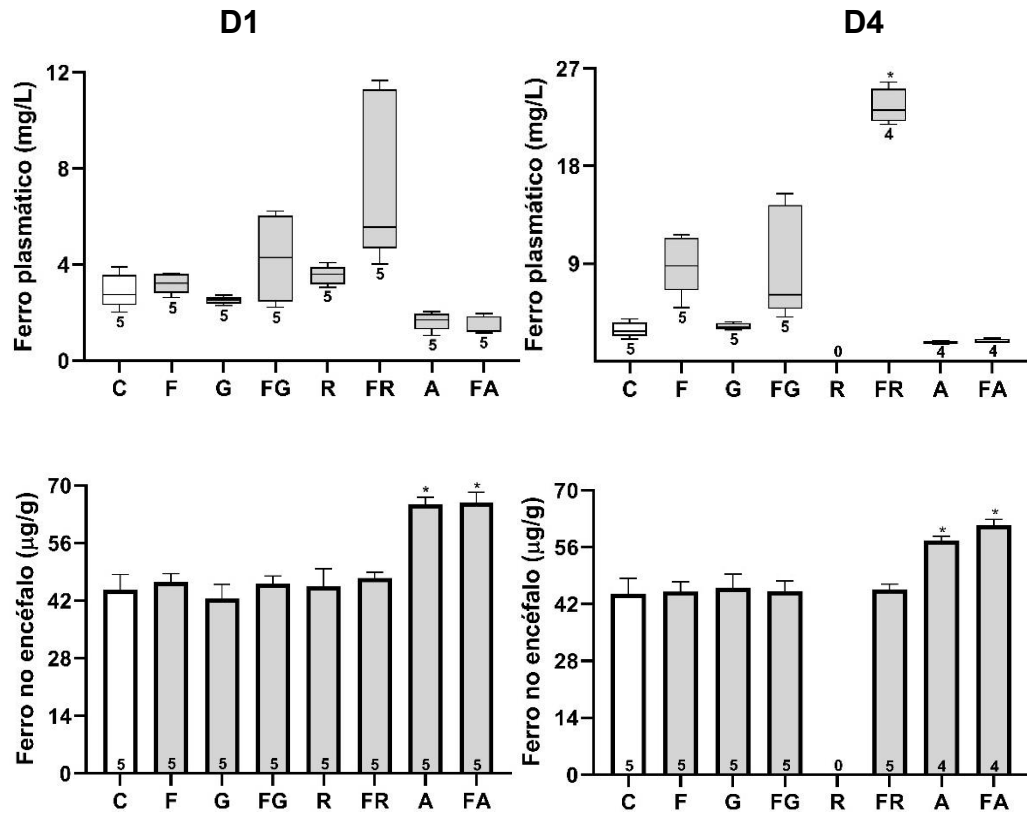
492 **Figura 7.** Valores plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST, U/L), alanina
 493 aminotransferase (ALT, U/L) e fosfatase alcalina (U/L) de ratos que receberam, via
 494 gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou
 495 por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R)
 496 ou atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA).
 497 AST D1 (análise por ANOVA *oneway*): $F(7,30)=2,85$; $p=0,021$; $\eta^2=39,91\%$. AST D4
 498 (análise por Kruskall Wallis): $H(5)=12,65$; $p=0,027$; $\eta^2=31,86\%$. ALT D1 (análise por
 499 Kruskall Wallis): $H(7)=17,35$; $p=0,015$; $\eta^2=32,33\%$. ALT D4 (análise por ANOVA
 500 *oneway*): $F(5,27)=2,30$; $p=0,073$; $\eta^2=29,82\%$. Fosfatase alcalina (análise por ANOVA
 501 *oneway*), sendo em D1: $F(7,32)=1,49$; $p=0,206$; $\eta^2=24,60\%$; e em D4: $F(5,27)=1,88$;
 502 $p=0,132$; $\eta^2=25,80\%$. Gráficos *boxplot*: mediana, primeiro e terceiro quartis. Gráficos de
 503 barras: média e erro padrão da média. Número de animais do grupo na respectiva
 504 barra.



505 **Figura 8.** Valores plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST, U/L), alanina
 506 aminotransferase (ALT, U/L) e fosfatase alcalina (U/L) de ratos que receberam, via
 507 gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou
 508 por 4 dias (grupos D4) de água (C, controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R)
 509 ou atrazina (A), ou a combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA).
 510 AST (análise por ANOVA *oneway*), sendo em D1: $F(7,29)=3,73$; $p=0,005$; $\eta^2=47,39\%$;
 511 e em D4: $F(6,23)=0,68$; $p=0,666$; $\eta^2=15,09\%$. ALT (análise por ANOVA *oneway*), sendo
 512 em D1: $F(7,29)=3,68$; $p=0,006$; $\eta^2=46,19\%$; e em D4: $F(6,27)=3,35$; $p=0,014$; $\eta^2=42,65\%$.
 513 Fosfatase alcalina D1 (análise por ANOVA *oneway*): $F(7,32)=4,55$; $p=0,001$;
 514 $\eta^2=49,87\%$. Fosfatase alcalina D4 (análise por Kruskal Wallis): $H(6)=18,27$; $p=0,006$;
 515 $\eta^2=47,18\%$. Gráfico *boxplot*: mediana, primeiro e terceiro quartis. Gráficos de barras:
 516 média e erro padrão da média. Número de animais do grupo na respectiva barra.
 517 *Diferente do grupo C. #Diferente do respectivo grupo somente com herbicida.



518 **Figura 9.** Valores plasmáticos de ferro (mg/L) e de ferro no encéfalo (µg/g de tecido
519 nervoso) de ratos que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso
520 corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C,
521 controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a
522 combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA). Ferro plasmático
523 (análise por Kruskal Wallis), sendo em D1: $H(7)=17,64$; $p=0,014$; $\eta^2=34,33\%$; e em
524 D4: $H(5)=8,50$; $p=0,131$; $\eta^2=12,97\%$. Ferro no encéfalo (análise por Kruskal Wallis),
525 sendo em D1: $H(7)=7,88$; $p=0,343$; $\eta^2=2,76\%$; e em D4: $H(5)=11,12$; $p=0,049$;
526 $\eta^2=23,55\%$. Gráficos *boxplot*: mediana, primeiro e terceiro quartis. Número de
527 animais do grupo na respectiva barra.



528 **Figura 10.** Valores plasmáticos de ferro (mg/L) e de ferro no encéfalo ($\mu\text{g/g}$ de tecido
 529 nervoso) de ratas que receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso
 530 corpóreo) única diária, por um dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de água (C,
 531 controle), ferrihidrita (F), glifosato (G), Roundup® (R) ou atrazina (A), ou a
 532 combinação da nanopartícula com os herbicidas (FG, FR e FA). Ferro plasmático
 533 (análise por Kruskal Wallis), sendo em D1: $H(7)=30,97$; $p<0,001$; $\eta^2=74,89\%$; e em
 534 D4: $H(6)=28,68$; $p<0,001$; $\eta^2=90,70\%$. Ferro no encéfalo (análise por ANOVA
 535 *oneway*), sendo em D1: $F(7,32)=11,55$; $p<0,001$; $\eta^2=71,65\%$; e em D4: $F(6,26)=6,50$;
 536 $p<0,001$; $\eta^2=59,98\%$. Gráficos *boxplot*: mediana, primeiro e terceiro quartis. Gráficos
 537 de barras: média e erro padrão da média. Número de animais do grupo na
 538 respectiva barra. *Diferente do grupo C.

4.3 EFEITO DO ROUNDUP® E DA ASSOCIAÇÃO DE FERRIHIDRITA COM ROUNDUP®

539 Analisando a tabela 1, verifica-se que apenas uma dose de Roundup® ou de
540 ferrihidrita associada ao Roundup®, nos machos ou nas fêmeas (grupos D1) não
541 provocou mortalidade (tabela 1). Nos grupos de machos D4, verifica-se que tanto o
542 Roundup® sozinho (grupo R) quanto associado à ferrihidrita (grupo FR) provocaram
543 80% de mortalidade nos machos. Por outro lado, no grupo de fêmeas D4, houve
544 mortalidade de 100% quando receberam apenas Roundup®, mas quando a
545 ferrihidrita foi administrada com o Roundup®, a mortalidade desse grupo foi zero
546 (0%). Para os grupos cuja mortalidade foi de 80% ou 100%, não foi possível realizar
547 a análise estatística, em relação aos outros parâmetros avaliados. Os machos que
548 receberam ferrihidrita associado ao Roundup® (figura 3), apresentaram perda de
549 peso ($p < 0,001$) logo no primeiro dia (grupo D1). As fêmeas do grupo D1, que
550 receberam Roundup®, apresentaram redução do peso corpóreo ($p < 0,05$; figura 4)
551 em relação ao controle (grupo C), mas as fêmeas do grupo FR D4, apesar de terem
552 apresentado redução do peso corpóreo ($p < 0,001$) e da ingestão alimentar ($p = 0,003$),
553 sobreviveram até o final do protocolo, ao contrário do grupo R, onde a mortalidade
554 foi de 100% (tabela 1). Com relação aos outros parâmetros avaliados, encontrou-se
555 aumento ($p = 0,011$) da glicemia para os machos R D1 (figura 5) comparado com o
556 grupo controle. Os outros parâmetros não se alteraram (figura 7 e figura 9).
557 Analisando as fêmeas em relação ao respectivo controle, observou-se diminuição
558 ($p = 0,027$) da glicemia (figura 6) para o grupo FR D4, diminuição da fosfatase alcalina
559 (figura 8) para os grupos R D1 ($p = 0,015$) e FR D1 ($p = 0,024$), e aumento da
560 concentração de ferro plasmático (figura 10) para o grupo FR D4 ($p < 0,05$).

4.4 EFEITO DA ATRAZINA E DA ASSOCIAÇÃO DE FERRIHIDRITA COM ATRAZINA

561 Nos animais que receberam uma dose de atrazina, machos ou fêmeas, não
562 foi observada mortalidade (tabela 1). No entanto, 4 doses de atrazina promoveram
563 20% de mortalidade nas fêmeas e 4 doses da associação da ferrihidrita com a
564 atrazina promoveram 20% de mortalidade, tanto nos machos quanto nas fêmeas.
565 Diminuição do peso corpóreo do grupo A (figura 3 e figura 4), em relação aos
566 respectivos controles, foi observado nos machos (D1: $p < 0,05$ e D4: $p < 0,05$) e nas
567 fêmeas (D4: $p = 0,002$), assim como, redução na ingestão alimentar (machos:
568 $p < 0,001$; fêmeas: $p = 0,003$). Com a associação do herbicida à ferrihidrita, verificou-se
569 que nos grupos D4, ocorreu redução do peso corpóreo (machos: $p = 0,004$; fêmeas:

570 $p < 0,05$) e da ingestão alimentar (AUC machos: $p < 0,001$; AUC fêmeas: $p = 0,004$).
571 Vale pontuar que a ingestão alimentar dos machos do grupo FA foi menor do que a
572 ingestão do grupo A ($p < 0,001$). Quando somente atrazina foi administrada, verificou-
573 se nas fêmeas, comparadas com o controle C: diminuição plasmática de fosfatase
574 alcalina (figura 8) no grupo D1 ($p = 0,018$) e aumento de ferro no encéfalo (figura 10)
575 nas fêmeas D1 ($p < 0,001$) e D4 ($p = 0,024$); nos grupos FA, essas alterações
576 permaneceram, isto é, redução da fosfatase alcalina plasmática (D1: $p = 0,004$ e D4:
577 $p < 0,05$) e elevação da concentração de ferro no encéfalo (D1: $p < 0,001$ e D4:
578 $p = 0,003$). Por outro lado, nos machos, a associação da nanopartícula com a atrazina
579 (grupo FA) promoveu, em D4, aumento significativo das concentrações de glicose
580 ($p < 0,001$) e de colesterol ($p = 0,005$), comparados com o grupo C (figura 5) e também
581 comparados ao grupo A (glicose: $p < 0,001$ e colesterol: $p = 0,012$), sendo que o grupo
582 A D4 não diferiu estatisticamente do controle.

583

584 Todos os resultados acima descritos estão agrupados em uma única tabela
585 (tabela 2). Nesta tabela, além dos efeitos dos herbicidas e da nanopartícula isolados
586 ou em associação, podem ser avaliados os efeitos dos herbicidas quanto aos
587 parâmetros analisados em cada grupo de ratos e ratas estudado.

588 **Tabela 2.** Resultados encontrados dos parâmetros avaliados em ratos Wistar, que
 589 receberam, via gavagem, dose (1000 mg/kg de peso corpóreo) única diária, por um
 590 dia (grupos D1) ou por 4 dias (grupos D4) de nanopartícula de ferrihidrita (F);
 591 glifosato (G); ferrihidrita com glifosato (FG); Roundup® (R); ferrihidrita com
 592 Roundup®(FR); atrazina (A); ferrihidrita com atrazina (FA). ♂ machos. ♀: fêmeas. =:
 593 semelhante ao controle. x: parâmetro não se aplica ao grupo em questão. ↑:
 594 aumento em relação ao controle. ↓: redução em relação ao controle.

	Grupos	Mortalidade	Δ do Peso	Ingestão alimentar	Glicose	Colesterol	Creatinina	AST	ALT	Fosfatase alcalina	Ferro plasmático	Ferro no encéfalo
F	♂ D1	0	=	x	=	=	=	=	=	=	=	=
	♂ D4	0	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	♀ D1	0	=	x	=	=	=	=	↓	↓	=	=
	♀ D4	0	=	=	=	=	=	=	↓	=	=	=
G	♂ D1	0	=	x	=	=	=	=	=	=	=	=
	♂ D4	0	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=
	♀ D1	0	=	x	=	=	=	=	=	=	=	=
	♀ D4	0	↓	↓	=	=	=	=	=	=	=	=
FG	♂ D1	0	=	x	=	=	=	=	=	=	=	=
	♂ D4	0	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	♀ D1	0	=	x	=	=	=	=	=	=	=	=
	♀ D4	0	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
R	♂ D1	0	=	x	↑	=	=	=	=	=	=	=
	♂ D4	80%	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	♀ D1	0	↓	x	=	=	=	=	=	↓	=	=
	♀ D4	100%	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
FR	♂ D1	0	↓	x	=	=	=	=	=	=	=	=
	♂ D4	80%	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	♀ D1	0	=	x	=	=	=	=	=	↓	=	=
	♀ D4	0	↓	↓	↓	=	=	=	=	=	↑	=
A	♂ D1	0	↓	x	=	=	=	=	=	=	=	=
	♂ D4	0	↓	↓	=	=	=	=	=	=	=	=
	♀ D1	0	=	x	=	=	=	=	=	↓	=	↑
	♀ D4	20%	↓	↓	=	=	=	=	=	=	=	↑
FA	♂ D1	0	=	x	=	=	=	=	=	=	=	=
	♂ D4	20%	↓	↓	↑	↑	=	=	=	=	=	=
	♀ D1	0	=	x	=	=	=	=	=	↓	=	↑
	♀ D4	20%	↓	↓	=	=	=	=	=	↓	=	↑

5 DISCUSSÃO

595 O presente protocolo, com uma e quatro administrações, permitiu verificar os
596 efeitos tóxicos do herbicida e dos formulados além do papel protetor da ferrihidrita.
597 Constatou-se que a nanopartícula não protegeu das alterações provocadas pela
598 atrazina, mas impediu as alterações provocados pelo glifosato e a elevada mortalidade
599 causada pelo Roundup® nas fêmeas.

600 A nanopartícula isolada não provocou alteração da grande maioria dos
601 parâmetros avaliados, sendo que as únicas mudanças constatadas foram redução da
602 atividade plasmática de ALT e da fosfatase alcalina nas fêmeas. Neste contexto,
603 alguns autores afirmam que reduções das atividades plasmáticas de enzimas, como
604 a ALT e a fosfatase, constatadas neste estudo, não tem importância toxicológica
605 (KURTZ; TRAVLOS, 2017; WILLARD; TWEDT, 2012), o que nos permite dizer, que
606 a nanopartícula de ferrihidrita não apresentou toxicidade na dose e tempos utilizados
607 neste estudo.

608 Buscando dados da literatura é possível constatar que, dependendo do óxido
609 de ferro, dose e via de administração utilizados o resultado pode variar. Askri et al.
610 (2019) administraram dose única, via gavagem, de 100 ou 200 mg/kg de magnetita
611 em ratos Wistar. Da mesma forma como no presente trabalho, os autores não
612 observaram alterações no peso corpóreo, glicose, colesterol, creatinina e na
613 atividade plasmática de AST e da fosfatase alcalina; todavia, constataram aumento
614 da atividade de ALT na dose de 200 mg/kg, o que contrasta com os nossos
615 achados. Attaran et al. (2018) administraram nanopartículas de hematita (200 mg/kg)
616 em ratos Wistar machos, por via intraperitoneal, durante três dias, observando que
617 as atividades plasmáticas de ALT e de fosfatase alcalina não se alteraram, enquanto
618 que a atividade da AST aumentou, o que também contrasta com os nossos
619 resultados. Por fim, Gaharwar, Meena e Rajamani (2019) avaliaram a nanopartícula de
620 hematita em ratos Wistar, por meio de 4 administrações intravenosas, uma por semana,
621 de três doses diferentes (7, 15 e 30 mg/kg). Não foi observada mortalidade ou
622 alterações no peso corpóreo. No entanto, a dose maior promoveu diminuição da
623 ingestão alimentar nos primeiros dias de tratamento e elevação nas concentrações de
624 ferro no sangue e no cérebro, o que contrasta com os nossos resultados em que não
625 houve alteração desses parâmetros.

626 Com relação ao glifosato, constatamos apenas diminuição do peso corpóreo e
627 da ingestão alimentar, tanto em machos quanto em fêmeas. No que diz respeito a
628 essas alterações, Gad e Chengelis (1997), afirmaram que o peso corpóreo e a
629 ingestão alimentar são frequentemente utilizados como parâmetros de avaliação
630 toxicológica. Além disso, a habilidade do animal de ganhar ou de manter o peso
631 pode ser considerada um indicador sensível, mas não específico, da sua saúde. A
632 partir dessas informações é factível dizer que o glifosato, em 4 doses, exerceu
633 toxicidade nos animais. Alguns estudos da literatura também encontraram alterações
634 promovidas pelo glifosato. Benedetti et al. (2004) administraram, via gavagem,
635 glifosato em três doses diferentes (4,87; 48,7 e 487 mg/kg) a cada 2 dias durante 75
636 dias em ratos Wistar machos. Foi observado que as três doses levaram ao aumento da
637 atividade plasmática de ALT, enquanto que somente as doses média e máxima
638 elevaram a atividade de AST. Soudani et al. (2019) verificaram que o glifosato (50
639 mg/kg) administrado intraperitonealmente a cada dois dias durante 15 dias provocou
640 aumento da atividade plasmática de AST e de ALT e redução da atividade da fosfatase
641 alcalina. Tizhe et al. (2014), ao administrarem 375 mg/kg de glifosato, por via oral,
642 durante 8 semanas, não observaram alterações na atividade plasmática de AST e de
643 ALT, assim como ocorreu no nosso trabalho.

644 As alterações no peso corpóreo e ingestão alimentar provocadas pelo
645 glifosato foram evitadas quando associamos o glifosato com a nanopartícula de
646 ferrihidrita; observamos aqui um cenário de proteção contra as alterações
647 provocadas pelo herbicida isoladamente. Somado a isso, a associação da
648 nanopartícula com o herbicida não provocou nenhuma outra alteração nos
649 parâmetros avaliados. Com isso, pode-se afirmar que a nanopartícula apresentou
650 um papel benéfico quando associada ao glifosato, visto que protegeu contra as
651 alterações provocadas pelo herbicida e esta associação, além disso, não provocou
652 nenhuma outra alteração adicional. Todos esses fatos estão em consonância com a
653 hipótese elaborada no início da execução deste trabalho.

654 Apesar de não haver estudos que avaliaram a ação de nanopartículas de
655 óxido de ferro contra as ações do glifosato em mamíferos, encontramos um trabalho
656 que fez essa avaliação *in vitro*. Silva et al. (2020) utilizaram 3 concentrações de
657 goethita (1, 10 e 100 mg/L), uma de glifosato (3,6 mg/L), uma de Roundup® (10
658 mg/L), além das diferentes combinações da goethita com glifosato e com Roundup®
659 em linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (zebrafish). Os autores

660 observaram que, conforme a concentração do óxido de ferro aumentava, tanto
661 isoladamente quanto em conjunto com os herbicidas, aumentava também a
662 concentração de ferro em solução. Foi constatado, dentre outras ações, que a
663 goethita isolada provocou redução da atividade mitocondrial e da integridade dos
664 lisossomos além de genotoxicidade, enquanto que o glifosato sozinho ou em
665 conjunto com a goethita não alterou esses parâmetros. Com isso, quando associado
666 ao glifosato, os efeitos tóxicos da goethita desapareceram. Apesar de os parâmetros
667 avaliados e o modelo experimental do presente trabalho e do estudo de Silva e
668 colaboradores serem completamente distintos, ambos utilizaram óxidos de ferro. No
669 entanto, enquanto a ferrihidrita sozinha ou associada não apresentou toxicidade,
670 promovendo, inclusive, efeito protetor contra este herbicida, a goethita se mostrou
671 tóxica e a associação como o glifosato mitigou essa resposta tóxica, demonstrando
672 mais uma vez que cada óxido de ferro apresenta um efeito diferente que está
673 associado à dose, tempo de estudo e protocolos *in vitro* ou *in vivo*.

674 Com relação ao Roundup® observou-se que o produto formulado provocou
675 maior toxicidade em relação ao seu princípio ativo glifosato, fato este evidenciado
676 pela elevada mortalidade constatada tanto nos machos quanto nas fêmeas.

677 Com relação ao que a literatura aponta, Çağlar e Kolankaya (2008), utilizando
678 ratos Wistar machos e fêmeas, administraram Roundup® em duas doses (56 e 560
679 mg/kg) durante dois períodos diferentes (5 e 13 semanas). Não houve alteração de
680 creatinina e da atividade plasmática de AST e de ALT, como observamos no presente
681 trabalho. Todavia, não foram observadas alterações no peso corpóreo, o que se
682 contrapõe ao nosso estudo. Owagboriaye et al. (2019) administraram, via gavagem,
683 Roundup® ou glifosato em 3 doses (3,6, 50,4 ou 248,4 mg/kg) durante 12 semanas
684 em ratos Wistar machos. Foi visto que o Roundup® provocou aumento dose
685 dependente de corticosterona, enquanto que o glifosato não alterou este parâmetro.
686 Está bem estabelecido que a corticosterona, o glicocorticoide presente nos ratos,
687 promove aumento da glicemia por uma série de mecanismos de ação e foi
688 justamente isso o que os autores constataram. Foi observado que o Roundup®, na
689 dose mais alta, provocou aumento de glicose, enquanto que o glifosato não, ou seja,
690 um perfil de resposta semelhante ao encontrado no nosso estudo, corroborando o
691 fato de o herbicida formulado provocar mais alterações que apenas o ingrediente
692 ativo. Com isso, podemos sugerir que o aumento de glicose provocado pelo

693 Roundup® no nosso estudo pode ter sido causado por elevação nas concentrações
694 de corticosterona.

695 Outro ponto a ser esclarecido é com relação à atividade reduzida da fosfatase
696 alcalina que foi observada nas fêmeas após uma dose de Roundup®. Como foi dito
697 anteriormente, alguns autores afirmam que reduções das atividades plasmáticas de
698 enzimas, como a fosfatase, não tem importância toxicológica (KURTZ; TRAVLOS,
699 2017; WILLARD; TWEDT, 2012). Todavia, vale esclarecer que, em ratos, a
700 fosfatase alcalina circulante é oriunda, predominantemente, do intestino e também
701 dos ossos. Com isso, o aumento da ingestão alimentar pode elevar a atividade
702 plasmática da fosfatase, enquanto que a redução no consumo de alimentos pode
703 diminuir a atividade desta enzima (BOONE et al., 2005; KURTZ; TRAVLOS, 2017).
704 No presente estudo, a AUC dos animais que receberam o Roundup® não foi
705 calculada, por conta da elevada mortalidade, mas foi possível constatar que antes
706 dos animais morrerem, a sua ingestão alimentar (dados não apresentados) estava
707 muito reduzida em comparação com a do controle. Com isso, a menor atividade da
708 fosfatase alcalina observada neste estudo pode ter relação com essa ingestão
709 alimentar diminuída.

710 Reforçando a ideia de maior toxicidade do Roundup®, Dedeker et al. (2018)
711 administraram, via gavagem, glifosato ou Roundup® em 3 doses (3,6, 50,4 ou 248,4
712 mg/kg) durante 12 semanas em ratos Wistar machos. Os autores observaram que o
713 Roundup® induziu dano renal severo, distorções na histoarquitetura do córtex renal,
714 expansão do espaço urinário e necrose tubular. Além disso, o Roundup® provocou
715 redução de enzimas ligadas à membrana nos rins, aumento de ureia e de creatinina
716 e distúrbios na cistatina-C plasmática (marcador de funcionamento renal) e no NGAL
717 (lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; indicador de doença renal). Por
718 último, os autores afirmam que a toxicidade renal observada não pode ser creditada
719 ao ingrediente ativo, visto que o glifosato sozinho não provocou nenhum dano aos
720 rins.

721 Um dos motivos que explicam esse perfil de resposta tão distinto em relação
722 ao glifosato é que o Roundup® e outros formulados a base de glifosato, além de
723 possuírem o ingrediente ativo (glifosato) na sua formulação, apresentam outros
724 ingredientes denominados de inertes, os quais são utilizados para aumentar a
725 eficácia do ingrediente ativo. Porém, é preciso interpretar com cautela o termo inerte,
726 visto que ele é referente apenas ao modo de ação do herbicida sobre a planta

727 invasora e não ao fato dele não provocar nenhuma toxicidade. Um ponto importante
728 a ser salientado é que os ingredientes inertes são enquadrados como segredo
729 industrial e a composição exata deles não é divulgada pelos fabricantes, o que
730 dificulta o acesso a essa informação. Somado a isso, as companhias utilizam um
731 nome comercial, como Roundup® original ou Roundup® ultra, que não reflete a
732 composição da formulação do herbicida. Isso permite a alteração dessa formulação,
733 mas sem alterar o nome comercial. Como consequência, diferentes estudos que
734 utilizaram herbicidas com o mesmo nome comercial podem apresentar resultados
735 diferentes por conta dessa diferença de formulação, causando problemas de
736 reprodutibilidade (MESNAGE; BENBROOK; ANTONIOU, 2019; WEINHOLD, 2010).

737 Dentre os ingredientes inertes das formulações de glifosato, os maiores
738 constituintes são os surfactantes, sendo os mais comuns as aminas etoxiladas,
739 também conhecidas como POEAs. POEA é o acrônimo para polioxietileno amina e
740 engloba uma classe de surfactantes com uma estrutura química em comum (van Os,
741 1998). O POEA utilizado como adjuvante no Roundup® original (MON 2139), o
742 formulado empregado neste estudo, contém uma mistura de surfactantes
743 denominados de MON 0818 (OWAGBORIAYE et al., 2019). Entre os constituintes
744 presentes no MON 0818, está o surfactante POE (*tallowamine*) 15 que é de 5 a 50
745 vezes mais tóxico que o glifosato em mamíferos ou organismos aquáticos
746 (MESNAGE; BENBROOK; ANTONIOU, 2019), o que contribui para a explicação do
747 porquê do Roundup® ter apresentado maiores efeitos tóxicos em comparação com
748 aqueles apresentados apenas pelo ingrediente ativo glifosato.

749 Quando se associou o Roundup® com a nanopartícula de ferrihidrita,
750 observamos três cenários distintos. A proteção contra os efeitos do herbicida, no
751 impedimento da mortalidade das fêmeas; a não interferência da nanopartícula, onde
752 as fêmeas apresentaram diminuição da fosfatase alcalina e os machos
753 apresentaram 80% de mortalidade tanto no herbicida isolado quanto na associação
754 com a nanopartícula; e a interferência da nanopartícula onde verificamos a perda de
755 peso, diminuição da ingestão e o aumento de ferro no plasma nas fêmeas com a
756 associação do herbicida à ferrihidrita.

757 Dentre esses achados, o ponto mais importante a ser salientado é que todas
758 as fêmeas com 4 doses da associação da nanopartícula com o Roundup®
759 sobreviveram, ao contrário das ratas que receberam somente o formulado, em que
760 todas morreram, o que representa um elevado grau de proteção fornecido pela

761 nanopartícula. Isso reforça a hipótese proposta inicialmente neste trabalho. Outro
762 ponto que se destaca é a diferença de resposta entre as fêmeas e os machos, visto
763 que nos machos a ferrihidrita não conseguiu reduzir a mortalidade provocada pelo
764 Roundup®.

765 Sabe-se que a solubilidade da ferrihidrita diminui em pHs alcalinos e aumenta
766 em pHs ácidos. Como o pH do estômago é por volta de 3, a ferrihidrita tem sua
767 solubilidade aumentada, o que resulta na liberação espécies de ferro (Fe^{3+} , FeOH^{2+} ,
768 $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$) no estômago (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003). Esse ferro pode
769 então ser absorvido nas porções mais distais do trato gastrointestinal. Neste
770 contexto, Ning et al. (2018), estudando a possibilidade de eliminar estradiol do
771 ambiente, utilizaram um complexo de nanopartícula contendo ferro e manganês
772 adornados com carboximetilcelulose e verificaram elevada adsorção do estradiol.
773 Assim, uma possibilidade a ser levantada, é que o ferro oriundo da ferrihidrita
774 poderia estar se complexando ao estradiol, o que tornaria a sua excreção mais lenta
775 e explicaria o aumento de ferro plasmático, observado no grupo fêmeas com a
776 associação do herbicida à ferrihidrita. Além disso, pode-se pressupor, que o ferro
777 juntamente com o estradiol poderia estar se complexando com o Roundup® (ou
778 mesmo com o POEA, que apresenta grupos hidroxil que se ligam ao Fe^{3+}) e
779 reduzindo a sua toxicidade, o que explicaria a menor mortalidade nas fêmeas e não
780 nos machos. Outros estudos se mostram necessários para confirmar estas
781 hipóteses, mas, de qualquer forma, a ferrihidrita demonstrou ter um excelente papel
782 protetor impedindo a elevada mortalidade provocada pelo Roundup®.

783 Assim como observamos com o glifosato, o cenário de escassez de estudos
784 avaliando o papel protetor das nanopartículas de óxido de ferro também se repete
785 aqui com o Roundup®. Por conta disso, será abordado novamente o trabalho de
786 Silva et al. (2020), que avaliou a goethita em hepatócitos de *zebrafish*, mas agora
787 com o foco no Roundup®. Como resultado desse trabalho, foi observado que o
788 Roundup® isolado provocou efeitos citotóxicos e genotóxicos sendo que a
789 combinação deste herbicida com a goethita provocou um efeito sinérgico
790 intensificando a toxicidade, o que difere da resposta do glifosato que não alterou os
791 parâmetros avaliados nem isolado e nem associado com a goethita. Por fim, os
792 autores pontuam a possibilidade da presença de outras substâncias na formulação
793 do Roundup®, como os surfactantes, de serem um dos fatores dessa maior
794 toxicidade observada no produto formulado, o que reforça a ideia proposta

795 anteriormente. Trigueiro et al. (2021) avaliaram a genotoxicidade e a mutagenicidade
796 da co-exposição de nanopartícula de óxido de ferro maghemita e do Roundup® em
797 peixes *Poecilia reticulata* machos. A nanopartícula de maghemita (0,3 mg/L) foi
798 administrada isolada ou associada a duas concentrações diferentes de Roundup®
799 (0,18 ou 0,36 µg/L) durante dois períodos de tempo (14 e 21 dias). A co-exposição
800 da nanopartícula com o herbicida provocou mais danos ao DNA em relação à
801 nanopartícula sozinha ou em relação ao controle, indicando um efeito sinérgico.
802 Todavia o estudo não avaliou grupos Roundup® isolados e, com isso, não é possível
803 averiguar se esse efeito tóxico observado nas associações é maior ou menor do que
804 os efeitos que seriam provocados pelo herbicida isoladamente. Faria et al. (2021)
805 investigaram os efeitos da nanopartícula de óxido de ferro maghemita revestida com
806 citrato isolada ou em associação com o glifosato ou com o Roundup® sobre
807 parâmetros hepáticos bioquímicos e histológicos em peixes *Poecilia reticulata*
808 fêmeas. A maghemita (0,3 mg/L) foi administrada isolada ou associada ao Roundup®
809 original (0,65 ou 1,3 mg/L) ou ao glifosato (65 mg/L) durante 3 períodos de tempo (7,
810 14 ou 21 dias). Foi constatado que as associações da nanopartícula com o glifosato
811 ou com o Roundup® provocaram toxicidade no tecido hepático, principalmente em
812 decorrência de respostas inflamatórias. Além disso, foi observado novamente um
813 padrão de maior toxicidade do Roundup® em comparação com o glifosato. Todavia,
814 assim como ocorreu no trabalho de Trigueiro et al. (2021), os grupos contendo
815 apenas os formulados isolados não foram contemplados. Esses três estudos
816 demonstraram que as nanopartículas utilizadas não desempenharam um papel
817 benéfico contra o Roundup®. Isso difere dos nossos resultados que, apesar de terem
818 mostrado algumas alterações pontuais e, em outros casos a nanopartícula não ter
819 oferecido proteção contra o Roundup®, mostraram que a ferrihidrita foi capaz de
820 reduzir a zero a mortalidade provocada por este herbicida nas fêmeas.

821 Por fim, o terceiro herbicida avaliado foi a atrazina que promoveu diminuição
822 do peso corpóreo, da ingestão alimentar e da atividade da fosfatase alcalina. Como
823 foi mencionado anteriormente, a redução da atividade da fosfatase alcalina não tem
824 relevância toxicológica, mas pode estar associada à menor ingestão alimentar
825 (BOONE et al., 2005; KURTZ; TRAVLOS, 2017).

826 Com relação ao que a literatura apresenta, Gojmerac et al. (1995),
827 investigaram os efeitos hepáticos da administração de atrazina em porcas. Para
828 isso, a atrazina foi administrada, por meio da alimentação, na dose de 2 mg/kg

829 durante 19 dias. Eles não observaram alteração da atividade da plasmática de AST
830 e ALT, assim como no nosso trabalho. Porém, a atividade da fosfatase alcalina
831 também não sofreu alteração, o que diverge dos nossos resultados. Campos-Pereira
832 et al. (2012) administraram, via gavagem, 400 mg/kg de atrazina em ratos Wistar
833 machos durante 14 dias e observaram que o herbicida provocou redução do peso
834 corpóreo, mas sem alterar a atividade plasmática de ALT. Ambos os achados estão
835 de acordo com o que observamos nos nossos animais. Santa Maria, Moreno e
836 Lopez-Campos (1987) administraram atrazina, via gavagem, em ratos Wistar
837 machos em 4 doses (100, 200, 400 e 600 mg/kg). As três primeiras doses foram
838 administradas durante 14 dias e a última foi administrada por 7 dias. Foi observado
839 redução dose dependente do peso corpóreo, da mesma forma como ocorreu em
840 nosso trabalho. Por outro lado, esses autores viram redução de glicose e aumento
841 da atividade plasmática de ALT e da fosfatase alcalina em todos as concentrações,
842 o que difere dos nossos resultados.

843 Um aspecto a ser pontuado é que o presente estudo utilizou uma formulação
844 comercial da atrazina (Gesaprim 500 Ciba Geigy) que contém, além do ingrediente
845 ativo, adjuvantes. Os 3 únicos componentes que fazem parte dos adjuvantes do
846 Gesaprim e que são divulgados pelo fabricante são o alquilenoglicol, sal de
847 trietanolamina alquil benzeno sulfonato e a amônia. O restante dos constituintes é
848 considerado segredo industrial (ZELJEZIC; GARAJ-VRHOVAC, PERKOVIC, 2006).
849 Complementando esta ideia, Zeljezic, Garaj-Vrhovac ePerkovic (2006), utilizando
850 linfócitos humanos, avaliaram a genotoxicidade da atrazina como ingrediente puro,
851 do Gesaprim como herbicida formulado e da mistura de adjuvantes presentes no
852 Gesaprim. As células foram expostas, em períodos de até 8h, a 3 concentrações das
853 substâncias (0,047, 0,47 e 4,7 µg/mL). Tanto o Gesaprim quanto os seus adjuvantes
854 levaram a dano no DNA e apoptose, enquanto que a atrazina sozinha não alterou
855 nenhum parâmetro. Os resultados desse trabalho apresentam um perfil de resposta
856 que lembra o que foi visto com o glifosato e com o Roundup®, onde o ingrediente
857 ativo provoca poucas alterações ao contrário do produto formulado, principalmente
858 por conta dos adjuvantes presentes neste último.

859 O ponto que precisa ser melhor esclarecido sobre a atrazina é com relação ao
860 aumento de ferro no encéfalo provocado por este herbicida. Mas antes disso é
861 preciso ter uma visão geral do metabolismo do ferro e de como que este metal é
862 capaz de entrar no SNC. O ferro é transportado no sangue acoplado, principalmente,

863 à transferrina. Nas células endoteliais que compõem a barreira hematoencefálica,
864 existem receptores para a transferrina. Com isso, a transferrina se liga a esses
865 receptores e é endocitada. No pH ácido do endossomo, o ferro se separa da
866 transferrina liberando Fe^{3+} , o qual é reduzido formando Fe^{2+} e o Fe^{2+} vai para o
867 citoplasma por meio do transportador de metal divalente-1 (DMT-1). Em seguida, o
868 Fe^{2+} é liberado da célula endotelial por meio da ferroportina e, uma vez fora da
869 célula, ele pode ser oxidado pela hefaestina expressa nos astrócitos formando Fe^{3+} ,
870 o qual é capturado pela transferrina presente no líquido cefalorraquidiano. O ferro
871 então entra nos neurônios por meio do DMT-1 na forma de Fe^{2+} ou via receptor de
872 transferrina, recomeçando o mesmo processo descrito para as células endoteliais.
873 Dentro dos neurônios, o ferro normalmente fica armazenado acoplado à ferritina. Por
874 fim, este metal pode ser exportado das células por meio da ferroportina com o
875 auxílio da hefaestina (HARE et al., 2013; SINGH et al., 2014).

876 Feito este panorama, é possível aprofundarmos nas possíveis razões pelas
877 quais a atrazina provocou o aumento de ferro no encéfalo. Neste âmbito, Li et al.
878 (2021) realizaram um estudo interessante onde foi investigado os efeitos da
879 exposição à atrazina sobre a concentração de ferro no mesencéfalo e sobre
880 mecanismos de transporte do ferro nessa região. Para isso, ratos Sprague Dawley
881 machos foram expostos a concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg de atrazina
882 durante 90 dias. Os autores viram que a atrazina provocou acúmulo de ferro no
883 mesencéfalo de forma dose dependente. A dose menor provocou aumento de
884 25,5%, a dose intermediária provocou elevação de 47% e a dose maior levou ao
885 aumento de 160,1% na concentração deste metal. Vale ressaltar que a análise da
886 concentração de ferro foi feita de forma bem semelhante ao nosso estudo utilizando
887 digestão do tecido nervoso com ácido nítrico e leitura em espectrômetro de absorção
888 atômica com atomizador por forno de grafite. Além disso, a partir de um pool do
889 mesencéfalo, foi observado aumento na expressão de RNAm de DMT-1 e do
890 receptor de transferrina, além de redução na expressão de ferroportina e de
891 hefaestina. Por fim, complementando os achados anteriores, ocorreu elevação nas
892 concentrações proteicas de DMT-1 e do receptor de transferrina e redução na
893 concentração de ferroportina e de hefaestina. Esses resultados sugerem que a
894 atrazina estimulou a expressão de proteínas relacionadas à captura de ferro e
895 diminuiu as que promovem a saída de ferro, levando à maior concentração de ferro
896 observada no mesencéfalo. Utilizando os achados de Li et al. (2021), podemos

897 propor que o aumento de ferro encefálico observado no nosso estudo pode ter sido
898 ocasionado por alterações nas expressões dessas quatro proteínas relacionadas à
899 homeostase do ferro. Todavia, o motivo pelo qual esse aumento ocorreu somente
900 nas fêmeas e não nos machos, o que se contrapõe ao trabalho de Li et al. (2021),
901 ainda precisa ser esclarecido.

902 A associação da atrazina com a nanopartícula de ferrihidrita resultou em 4
903 cenários distintos. Um de proteção, outro de semelhança de resposta entre o
904 herbicida isolado e a associação com a nanopartícula, um de piora e, por fim, um
905 cenário de alterações que só ocorreram na associação e não no herbicida isolado. O
906 cenário de proteção ocorreu pontualmente nos machos D1, onde a associação da
907 ferrihidrita à atrazina (grupo FA) impediu a perda de peso provocada pela atrazina.
908 No cenário de semelhança de resposta, observamos que, da mesma forma como
909 ocorreu com o herbicida isolado, a associação levou a mortalidade de 20% nas
910 fêmeas D4, redução do peso corpóreo (machos e fêmeas D4), da ingestão alimentar
911 (fêmeas) e da atividade da fosfatase alcalina (fêmeas D1), além de elevação da
912 concentração de ferro no encéfalo (fêmeas D1 e D4). No cenário de piora, o grupo
913 FA provocou 20% de mortalidade nos machos D4, enquanto que a atrazina não
914 provocou mortalidade. Ainda nos machos, a redução da ingestão alimentar
915 provocada pela associação foi mais intensa se comparada com a redução da
916 ingestão provocada pelo grupo que recebeu o herbicida isoladamente. Por fim o
917 cenário de alterações que só ocorreram na associação tivemos a redução da
918 fosfatase nas fêmeas D4 e o aumento de glicose e de colesterol nos machos D4.
919 Com base nesses resultados encontrados, a associação da nanopartícula com a
920 atrazina foi a principal contribuinte para a hipótese deste trabalho ter sido
921 parcialmente refutada, sobretudo pela incapacidade da ferrihidrita de evitar as
922 alterações do formulado e de inclusive ter, em muitos casos, agravado essas
923 alterações.

924 A quantidade de estudos que fizeram a avaliação de nanopartículas de óxido
925 de ferro em combinação com a atrazina é mínima. De acordo com as nossas
926 buscas, apenas Zilli (2017), que fez parte do grupo de pesquisa do laboratório,
927 realizou essa investigação. Zilli, nesse estudo, utilizou ratos Wistar machos e fêmeas
928 para averiguar se a goethita era capaz de proteger contra os efeitos dos herbicidas
929 Roundup® e atrazina por meio da análise de parâmetros plasmáticos e histológicos.
930 Os herbicidas e a goethita foram administrados em doses de 1000 ou 2000 mg/kg de

931 cada componente durante 1, 2, 3, 4 ou 5 dias via gavagem. O autor observou que a
932 goethita isolada não provocou nenhuma alteração plasmática ou histológica.
933 Observou-se também aumento de colesterol (machos) e de creatinina (machos e
934 fêmeas) sendo que a goethita não conseguiu impedir esse aumento. Além disso,
935 constatou-se aumento da atividade plasmática de ALT e de AST (machos e fêmeas)
936 nos animais que receberam Roundup® e atrazina, sendo que a goethita protegeu
937 contra essas alterações. Por fim, foi observada menor mortalidade nos animais que
938 receberam a associação da nanopartícula com o herbicida em relação aos animais
939 que receberam o herbicida isoladamente.

940 Como mencionado anteriormente, não há outros estudos que avaliaram a
941 associação de nanopartículas de óxido de ferro com a atrazina, o que dificulta no
942 processo de explicação das alterações apresentadas pelo grupo FA. Com base nos
943 resultados desse grupo, é possível notar que a ação protetora da nanopartícula de
944 ferrihidrita foi menor com a atrazina em relação aos demais herbicidas, somado ao
945 fato da associação ter provocado uma série de alterações que não foram
946 observadas no herbicida isoladamente. Isso demonstra que a nanopartícula de
947 ferrihidrita não é adequada para proteger contra os efeitos provocados pela atrazina
948 e que, além disso, essa associação se mostrou mais tóxica do que o herbicida
949 isoladamente.

950 Para a finalização deste trabalho é preciso reaver o seu objetivo, que foi
951 avaliar se as nanopartículas de ferrihidrita são eficazes em evitar os efeitos tóxicos
952 provocados pelos herbicidas Roundup®, glifosato e atrazina. Para tal foram
953 analisados a nanopartícula de ferrihidrita e os herbicidas glifosato, Roundup® e
954 atrazina separadamente e as associações entre a nanopartícula e os herbicidas.

955 Primeiramente, a nanopartícula de ferrihidrita em si alterou apenas alguns
956 aspectos pontuais, considerados de não relevância toxicológica, e, portanto, se mostrou
957 segura na dose e tempo utilizados neste trabalho. Outro aspecto observado foi que os
958 herbicidas apresentaram diferentes padrões de alteração dos parâmetros avaliados,
959 sendo o glifosato o que apresentou menos alterações, a atrazina a intermediária e o
960 Roundup® o que apresentou a maior toxicidade evidenciada, principalmente, pela
961 elevada mortalidade dos animais desse grupo. Um aspecto que foi possível observar a
962 partir disso foi a grande disparidade entre o Roundup® em relação ao seu princípio ativo
963 glifosato, possivelmente por conta da presença dos adjuvantes ou ingredientes inertes
964 presentes no formulado.

965 Por fim, com relação às associações, a nanopartícula de ferrihidrita não se
966 mostrou eficaz em proteger contra as alterações provocadas pela atrazina, sendo que
967 neste caso a associação provocou mais alterações se comparado com o herbicida
968 isoladamente. Todavia, ao contrário do que observamos com a atrazina, a ferrihidrita se
969 mostrou eficaz em proteger contra as alterações provocadas pelo glifosato, visto que
970 impediu mudanças no peso corpóreo e na ingestão alimentar, e principalmente em
971 relação ao Roundup®, ao evitar a mortalidade provocada por este herbicida nas fêmeas.

6 CONCLUSÃO

972 Com este trabalho conseguimos provar que a ferrihidrita isoladamente não
973 alterou os parâmetros avaliados e se mostrou viável em proteger contra os efeitos
974 tóxicos do glifosato e do Roundup®. Esses achados são importantes, pois foram obtidos
975 a partir de modelo experimental não antes utilizado. Além disso, este trabalho abre
976 portas para futuros estudos que avaliem a aplicação da ferrihidrita em situações de
977 contaminação e de intoxicação, considerando os seus efeitos protetores contra as
978 alterações de parâmetros bioquímicos e metabólicos provocados pelo glifosato e pelo
979 Roundup®.

REFERÊNCIAS

- ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 470–475, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.4.470>
- ALVES, L. C.; WOOD, C. M. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 3, p. 217–232, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.005>
- ANADÓN, A.; CASTELLANO, V.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, R. M. Biomarkers in drug safety evaluation. Biomarkers in Toxicology, chapter 55, p. 923-945, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00055-5>
- ARIAS, L. S.; PESSAN, J. P.; VIEIRA, A. P. M.; DE LIMA, T. M. T.; DELBEM, A. C. B.; MONTEIRO, D. R. Iron oxide nanoparticles for biomedical applications: a perspective on synthesis, drugs, antimicrobial activity, and toxicity. **Antibiotics**, v. 7, n. 2, art. 46, p. 1–32, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020046>.
- ASKRI, D.; OUNI, S.; GALAI, S.; CHOVELON, B.; ARNAUD, J.; STURM, N.; LEHMANN, S. G.; SAKLY, M.; AMARA, S.; SÈVE, M. Nanoparticles in foods? A multiscale physiopathological investigation of iron oxide nanoparticle effects on rats after an acute oral exposure: Trace element biodistribution and cognitive capacities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 127, p. 173–181, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.006>
- ATTARAN, H. R.; FATEMI, F.; RASOOLI, A.; DADKHAH, A.; MALAYERI, M. R. M.; DINI, S. *Zataria multiflora* essential oil prevent iron oxide nanoparticles-induced liver toxicity in rat model. **Journal of Medicinal Plants and By-products**, v. 1, p. 15–24, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.22092/JMPB.2018.116724>
- BENEDETTI, A. L.; VITURI, C. D. L.; TRENTIN, A. G.; DOMINGUES, M. A. C.; ALVAREZ-SILVA, M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb®. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 2, p. 227–232, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.008>
- BILCU, M.; GRUMEZESCU, A. M.; OPREA, A. E.; POPESCU, R. C.; MOGOȘANU, G. D.; HRISTU, R.; STANCIU, G. A.; MIHAILESCU, D. F.; LAZAR, V.; BEZIRTZOGLU, E.; CHIFIRIUC, M. C. Efficiency of vanilla, patchouli and ylang ylang essential oils stabilized by iron oxide@C₁₄ nanostructures against bacterial adherence and biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17943–17956, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules191117943>
- BOONE, L.; MEYER, D.; CUSICK, P.; ENNULAT, D.; PROVENCHER BOLLIGER, A.; EVERDS, N.; MEADOR, V.; ELLIOTT, G.; HONOR, D.; BOUNOUS, D.; JORDAN, H. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in

preclinical studies. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 3, p. 182–188, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00041.x>

ÇAĞLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 57–62, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.08.011>

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

CANHISARES-FILHO, J. E.; CARNEIRO, C. E. A.; DE SANTANA, H.; URBANO, A.; DA COSTA, A. C. S.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Characterization of the adsorption of nucleic acid bases onto ferrihydrite via Fourier transform infrared and surface-enhanced Raman spectroscopy and X-ray diffractometry. **Astrobiology**, v. 15, n. 9, p. 728–738, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1309>

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

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

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

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

DADFAR, S. M.; ROEMHILD, K.; DRUDE, N. I.; VON STILLFRIED, S.; KNÜCHEL, R.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. Iron oxide nanoparticles: diagnostic, therapeutic and theranostic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 138, p. 302–325, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.005>

DEDEKE, G. A.; OWAGBORIAYE, F. O.; ADEMOLU, K. O.; OLUJIMI, O. O.; ALADESIDA, A. A. Comparative assessment on mechanism underlying renal toxicity of commercial formulation of roundup herbicide and glyphosate alone in male albino

rat. **International Journal of Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 285–295, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/1091581818779553>

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

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

DZOYEM, J. P.; KUETE, V.; ELOFF, J. N. **Biochemical parameters in toxicological studies in Africa**: significance, principle of methods, data interpretation, and use in plant screenings. [S. l.]: Elsevier Inc., 2014, p. 659-715. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00023-6>

EMA. **Guideline on repeated dose toxicity**, 2010. European Medicines Agency. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-guideline-repeated-dose-toxicity-revision-1_en.pdf. Acesso em: 08 mar. 2022

FARIA, J. M. L.; GUIMARÃES, L. N.; SILVA, V. C.; LIMA, E. C. O.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Recovery trend to co-exposure of iron oxide nanoparticles (γ -Fe₂O₃) and glyphosate in liver tissue of the fish *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, v. 282, p. 130993, 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130993

GAD, S. C.; CHENGELIS, C. P. **Acute toxicology testing**. 2nd ed. Massachusetts: Academic Press, 1997. eBook ISBN: 9780080525921

GAHARWAR, U. S.; MEENA, R.; RAJAMANI, P. Biodistribution, clearance and morphological alterations of intravenously administered iron oxide nanoparticles in male Wistar rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 9677–9692, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S223142>

GOJMERAC, T.; KARTAL, B.; ŽURIĆ, M.; ĆURIĆ, S.; MITAK, M. Serum biochemical and histopathological changes related to the hepatic function in pigs following atrazine treatment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 233–236, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.2550150315>

GRUMEZESCU, A. M.; GESTAL, M. C.; HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, V.; VASILE, B. S.; MOGOANTĂ, L.; IORDACHE, F.; BLEOTU, C.; MOGOȘANU, G. D. Biocompatible Fe₃O₄ increases the efficacy of amoxicillin delivery against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 5013–5027, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules19045013>

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

HARE, D.; AYTON, S.; BUSH, A.; LEI, P. A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 5, p. 1–19, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00034>

HEINEGÅRD, D.; TIDERSTRÖM, G. Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, v. 43, n. 3, p. 305–310, 1973. DOI: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(73\)90466-X](https://doi.org/10.1016/0009-8981(73)90466-X)

HWANG, J.; LEE, E.; KIM, J.; SEO, Y.; LEE, K. H.; HONG, J. W.; GILAD, A. A.; PARK, H.; CHOI, J. Effective delivery of immunosuppressive drug molecules by silica coated iron oxide nanoparticles. **Colloids and surfaces. B: Biointerfaces**, v. 142, p. 290–296, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.040>

IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), Ministério do Meio Ambiente**, 2021. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 08 mar. 2022.

IBGE. Área agrícola cresce em dois anos e ocupa 7,6% do território nacional. **Cobertura e uso da terra. Agência IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2020. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/27207-area-agricola-cresce-em-dois-anos-e-ocupa-7-6-do-territorio-nacional#:~:text=Desde%20o%20in%C3%ADcio%20da%20s%C3%A9rie,terrestre%20e%20mar%C3%ADtima%20do%20pa%C3%ADs>>. Acesso em: 08 mar. 2022.

IMAM, S. Z.; LANTZ-MCPEAK, S. M.; CUEVAS, E.; ROSAS-HERNANDEZ, H.; LIACHENKO, S.; ZHANG, Y.; SARKAR, S.; RAMU, J.; ROBINSON, B. L.; JONES, Y.; GOUGH, B.; PAULE, M. G.; ALI, S. F.; BINIENDA, Z. K. Iron oxide nanoparticles induce dopaminergic damage: in vitro pathways and in vivo imaging reveals mechanism of neuronal damage. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 2, p. 913–926, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9259-2>

JAIN, T. K.; REDDY, M. K.; MORALES, M. A.; LESLIE-PELECKY, D. L.; LABHASETWAR, V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 316–327, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/mp7001285>

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

KUMAR, C. S. S. R.; MOHAMMAD, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 9, p. 789–808, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.008>

KUMARI, M.; RAJAK, S.; SINGH, S. P.; KUMARI, S. I.; KUMAR, P. U.; MURTY, U. S. N.; MAHBOOB, M.; GROVER, P.; RAHMAN, M. F. Repeated oral dose toxicity of iron oxide nanoparticles: biochemical and histopathological alterations in different

tissues of rats. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 2149–2159, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5796>

KURTZ, D. M.; TRAVLOS, G. S. **The Clinical Chemistry of Laboratory Animals**. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2017.

LARA, S. S.; PIGNATI, W. A.; PIGNATTI, M. G.; LEÃO, L. H. C.; MACHADO, J. M. H. A agricultura do agronegócio e sua relação com a intoxicação aguda por agrotóxicos no Brasil. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, n. 32, p. 1–19, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14393/Hygeia153246822>

LASKAR, A.; EILERTSEN, J.; LI, W.; YUAN, X.-M. SPION primes THP1 derived M2 macrophages towards M1-like macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, n. 4, p. 737–742, 2013. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.115>

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

LI, B.; JIANG, Y.; WANG, T.; HE, X.; MA, L.; LI, B.; LI, Y. Effect of atrazine on accumulation of iron via the iron transport proteins in the midbrain of SD rats. **Science of the Total Environment**, v. 780, art. 146666, p. 1–9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146666>

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

MAIER-HAUFF, K.; ULRICH, F.; NESTLER, D.; NIEHOFF, H.; WUST, P.; THIESEN, B.; ORAWA, H.; BUDACH, V.; JORDAN, A. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 103, n. 2, p. 317–324, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0389-0>

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.

MARTÍNEZ, M. A.; ARES, I.; RODRÍGUEZ, J. L.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; ANADÓN, A. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. **Environmental Research**, v. 161, p. 212–219, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.10.051>

MESNAGE, R.; BENBROOK, C.; ANTONIOU, M. N. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, p. 137–145, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053>

MOHUN, A. F.; COOK, I. J. Y. Simple methods for measuring serum levels of the glutamic-oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases in routine laboratories. **Journal of Clinical Pathology**, v. 10, p. 394–399, 1957. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.10.4.394>

NING, Q.; YIN, Z.; LIU, Y.; TAN, X.; ZENG, G.; JIANG, L.; LIU, S.; TIAN, S.; LIU, N.; WANG, X. Fabrication of stabilized Fe-Mn binary oxide nanoparticles: effective adsorption of 17 β -estradiol and influencing factors. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 10, art. 2218, p. 1–17, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph15102218>.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4**. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, 2001. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en>. Acesso em: 08 mar. 2022.

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

OWAGBORIAYE, F.; DEDEKE, G.; ADEMOLU, K.; OLUJIMI, O.; ALADESIDA, A.; ADELEKE, M. Comparative studies on endogenous stress hormones, antioxidant, biochemical and hematological status of metabolic disturbance in albino rat exposed to roundup herbicide and its active ingredient glyphosate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n.14, p. 14502–14512, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04759-1>

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

PROCÓPIO, S. O.; PIRES, F. R.; WERLANG, R. C.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; MENDONÇA, E. S.; SANTOS, J. B.; EGREJA FILHO, F. B. Sorção do herbicida atrazine em complexos organominerais. **Planta Daninha**, v. 19, n. 3, p. 391–400, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-8358200100030001> (<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/13619>)

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1551-1557, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.007>

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 28, n. 1, p. 56–63, 1957. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1360–1362, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-311XPE020714>

ROMAN, E. S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M. A.; HALL, L.; BECKIE, H.; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2007. 152 p. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/documents/1355291/12492345/Como+funcionam+os+herbicidas/954b0416-031d-4764-a703-14d9b28b178e?version=1.0>>. Acesso em: 08 mar. 2022.

ROSILLO-DE LA TORRE, A.; ZURITA-OLVERA, L.; OROZCO-SUÁREZ, S.; CASILLAS, P. E. G.; SALGADO-CEBALLOS, H.; LUNA-BÁRCENAS, G.; ROCHA, L. Phenytoin carried by silica core iron oxide nanoparticles reduces the expression of fármaco resistant seizures in rats. **Nanomedicine**, v. 10, n. 24, p. 3563–3577, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2217/nnm.15.173>

ROY, A. V. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. **Clinical Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 431–436, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1093/clinchem/16.5.431>.

SANTA MARIA, C.; MORENO, J.; LOPEZ-CAMPOS, J. L. Hepatotoxicity induced by the herbicide atrazine in the rat. **Journal of Applied Toxicology**, v. 7, n. 6, p. 373–378, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.2550070605>

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

SILVA, N. D. G.; CARNEIRO, C. E. A.; CAMPOS, E. V. R.; DE OLIVEIRA, J. L.; RISSO, W. E.; FRACETO, L. F.; ZAIA, D. A. M.; MARTINEZ, C. B. R. Interference of goethite in the effects of glyphosate and Roundup® on ZFL cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 65, p. 104755, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104755>

SINGH, N.; HALDAR, S.; TRIPATHI, A. K.; HORBACK, K.; WONG, J.; SHARMA, D.; BESERRA, A.; SUDA, S.; ANBALAGAN, C.; DEV, S.; MUKHOPADHYAY, C. K.; SINGH, A. Brain Iron Homeostasis: From molecular mechanisms to clinical significance and therapeutic opportunities. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 8, p. 1324–1363, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4931>

SINGH, N.; JENKINS, G. J. S.; ASADI, R.; DOAK, S. H. Potential toxicity of super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). **Nano Reviews**, v. 1, n.1, art. 5358, p. 1–15, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358> (<https://www.tandfonline.com/loi/zano19>)

SONG, X. Y.; LI, J. N.; WU, Y. P.; ZHANG, B.; LI, B. X. Atrazine causes autophagy- and apoptosis-related neurodegenerative effects in dopaminergic neurons in the rat nigrostriatal dopaminergic system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 13490–13506, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms160613490>

SOUDANI, N.; CHAËBANE, M.; GHORBEL, I.; ELWEJ, A.; BOUDAWARA, T.; ZEGHAL, N. Glyphosate disrupts redox status and up-regulates metallothionein I and II genes expression in the liver of adult rats. Alleviation by quercetin. **General Physiology and Biophysics**, v. 38, n. 2, p. 123–134, 2019. DOI: [10.4149/gpb_2018043](https://doi.org/10.4149/gpb_2018043)

SPINOWITZ, B. S.; KAUSZ, A. T.; BAPTISTA, J.; NOBLE, S. D.; SOTHINATHAN, R.; BERNARDO, M. V.; BRENNER, L.; PEREIRA, B. J. G. Ferumoxytol for treating

iron deficiency anemia in CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, n. 8, p. 1599–1605, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1681/ASN.2007101156>

SREEJA, S.; NAIR, C. K. K. Tumor control by hypoxia-specific chemotargeting of iron-oxide nanoparticle - Berberine complexes in a mouse model. **Life Sciences**, v. 195, p. 71–80, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.036>

STEINRÜCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 94, n. 4, p. 1207–12, 1980. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)90547-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)90547-1) 10.1016/0006-291x(80)90547-1

SVOBODOVA, H.; KOSNÁČ, D.; TANILA, H.; WAGNER, A.; TRNKA, M.; VITOVÍČ, P.; HLINKOVA, J.; VAVRINSKY, E.; EHRlich, H.; POLÁK; KOPANI, M. Iron-oxide minerals in the human tissues. **Biometals**, v. 33, n. 1, p. 1–13, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10534-020-00232-6> v. 67, n. 1, p. 96–101

TIZHE, E. V.; IBRAHIM, N. D. G.; FATIHU, M. Y.; IGBOKWE, I. O.; GEORGE, B. D. J.; AMBALI, S. F.; SHALLANGWA, J. M. Serum biochemical assessment of hepatic and renal functions of rats during oral exposure to glyphosate with zinc. **Comparative Clinical Pathology**, v. 23, n. 4, p. 1043–1050, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1740-6>

TOMCZAK, M.; TOMCZAK, E. The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size. **TRENDS in Sport Sciences**, v. 1, n. 21, p. 19–25, 2014

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

TRIGUEIRO, N. S. S.; GONÇALVES, B. B.; DIAS, F. C.; DE OLIVEIRA LIMA, E. C.; ROCHA, T. L.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Co-exposure of iron oxide nanoparticles and glyphosate-based herbicide induces DNA damage and mutagenic effects in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 81, art. 103521, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103521>

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p. 158–161, 1969. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.22.2.158>

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

VAN OS, N. M. **Nonionic Surfactants**: organic chemistry. New York: CRC Press, 1998.

VOLATRON, J.; CARN, F.; KOLOSNAJ-TABI, J.; JAVED, Y.; VUONG, Q. L.; GOSSUIN, Y.; MÉNAGER, C.; LUCIANI, N.; CHARRON, G.; HÉMADI, M.; ALLOYEAU, D.; GAZEAU, F. Ferritin protein regulates the degradation of iron oxide

nanoparticles. **Small**, v. 13, n. 2, p. 1–13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/smll.201602030>

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

WEINHOLD, B. Mystery in a bottle: will the EPA require public disclosure of inert pesticide ingredients? **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 4, p. A168–A171, 2010. DOI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20359978>

WILLARD, M. D.; TWEDT, D. C. Gastrointestinal, pancreatic, and hepatic disorders. Chap. 9. In: WILLARD, M. D.; TWEDT, D. C. eds. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. New York: Elsevier, 2012. p. 191–225. DOI: 10.1016/B978-1-4377-0657-4.00009-0 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781437706574000090>

WU, J.; DING, T.; SUN, J. Neurotoxic potential of iron oxide nanoparticles in the rat brain striatum and hippocampus. **NeuroToxicology**, v. 34, p. 243–253, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.09.006>

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

ZELJEZIC, D.; GARAJ-VRHOVAC, V.; PERKOVIC, P. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 6, p. 923–935, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.01.017>

ZILLI, R. M. **Efeitos de Roundup® e atrazina, na ausência e presença de goethita, em parâmetros metabólicos e histológicos em ratos machos e fêmeas**. 2017. 85 p. Tese (Doutorado pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) –Universidade Estadual de Londrina, PR.

ANEXO

ANEXO 1 Aprovação da CEUA.



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 045/2015

Londrina, 10 de Abril de 2015.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 31 de Março de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Nanopartículas de ferro e herbicidas sobre alguns parâmetros metabólicos, comportamentais e histológicos em ratos**", registrado sob o processo CEUA nº **30861.2014.66**, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 124 ratos machos e 124 fêmeas (totalizando 248 ratos), adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 220-250g e 200-230 g, respectivamente, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. O projeto tem como objetivo estudar os efeitos comportamentais, metabólicos e histológicos da administração de glifosato, Roundup®, POEA e atrazina e de nanopartículas de ferro como protetoras da ação dos herbicidas em ratos machos e fêmeas. Para tanto, serão tratados com: • nanopartículas de Fe seguido da administração de glifosato, Roundup®, POEA e atrazina verificando alterações comportamentais por 15 dias; glifosato, Roundup®, POEA e atrazina durante 5 dias avaliando parâmetros metabólicos e alterações histológicas; nanopartículas de Fe seguido da administração de glifosato, Roundup®, POEA e atrazina durante 5 dias avaliando parâmetros metabólicos e alterações histológicas. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão de execução em 12 meses.

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

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

Waldiceu Aparecido Verri Junior

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Prof. Dra. Cássia Thais Bussamra Vieira Zaia

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DPP/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

ANEXO 2 Aprovação da CEUA.



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 86/2021

Londrina, 16 de setembro de 2021.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que a solicitação referente ao uso de plasma congelado oriundo do projeto intitulado "Nanopartículas de ferro e herbicidas sobre alguns parâmetros metabólicos, comportamentais e histológicos em ratos" protocolo CEUA n° 30861.2014.66 (OF.CIRC. CEUA No 45/2015) coordenado pela Prof. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL) em reunião do dia 14/09/2021.

Serão realizadas análises plasmáticas que eram previstas no projeto original mas não foram executadas anteriormente, sendo: ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), AP (fosfatase alcalina) e proteínas totais, além da análise de ferro no plasma que não foi prevista no protocolo inicial.

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

Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
CEUA/UEL - 1471-3371-3454

Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UDEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a), Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia
Responsável pelo projeto
C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Fisiológicas/ CCB
C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/ CCB