



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL

JOÃO MARCOS DE LIMA FARIA

**Bioacumulação e biomarcadores celulares e teciduais  
investigados no fígado do peixe *Poecilia reticulata*  
(Peters, 1859) expostos e pós-expostos a íons ferro e  
nanopartículas de óxido de ferro ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) associadas a  
glifosato e Roundup®**

GOIÂNIA  
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFMG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFMG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese

#### 2. Nome completo do autor

João Marcos de Lima Faria

#### 3. Título do trabalho

BIOACUMULAÇÃO E BIOMARCADORES CELULARES E TECIDUAIS INVESTIGADOS NO FÍGADO DO PEIXE *Poecilia reticulata* (PETERS, 1859) EXPOSTOS E PÓS- EXPOSTOS A ÍONS FERRO E NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO ( $\gamma$ - $Fe_2O_3$ ) ASSOCIADAS A GLIFOSATO E ROUNDUP®

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO\*

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
  - novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**

---

Documento assinado eletronicamente por **Simone Maria Teixeira De Sabóia Morais, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2021, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no

21/12/2021 18:29

SEI/UGF - 2528373 - Termo de Ciência e de Autorização (TECA)



§ 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por JOAO MARCOS DE LIMA FARIA, Discente, em 29/11/2021, às 17:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2528373 e o código CRC 1F9B94DF.

Referência: Processo nº 23070.053799/2021-41

SEI nº 2528373



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese     Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

#### 2. Nome completo do autor

João Marcos de Lima Faria

#### 3. Título do trabalho

**BIOACUMULAÇÃO E BIOMARCADORES CELULARES E TECIDUAIS INVESTIGADOS NO FÍGADO DO PEIXE *Poecilia reticulata* (PETERS, 1859) EXPOSTOS E PÓS- EXPOSTOS A ÍONS FERRO E NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO ( $\gamma$ - $Fe_2O_3$ ) ASSOCIADAS A GLIFOSATO E ROUNDUP®**

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **João Marcos De Lima Faria, Discente**, em 06/04/2023, às 19:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3655003** e o código CRC **F4640332**.

Referência: Processo nº 23070.053799/2021-41

SEI nº 3655003

JOÃO MARCOS DE LIMA FARIA

**Bioacumulação e biomarcadores celulares e teciduais investigados no fígado do peixe *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) expostos e pós-expostos a íons ferro e nanopartículas de óxido de ferro ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) associadas a glifosato e Roundup®**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Animal.

Área de concentração: Biodiversidade Animal

Linha de pesquisa: Morfologia e Fisiologia Animal

Orientadora: Professora Doutora Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais

Coorientador: Professor Doutor Welinton Ribamar Lopes

GOIÂNIA  
2021

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

Faria, João Marcos de Lima

Bioacumulação e biomarcadores celulares e teciduais investigados no fígado do peixe *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) expostos e pós expostos a íons ferro e nanopartículas de óxido de ferro ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) associadas a glifosato e Roundup® [manuscrito] / João Marcos de Lima Faria. - 2021.

CLVI, 156 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais; co orientador Dr. Welinton Ribamar Lopes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Goiânia, 2021.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Recuperação. 2. *Poecilia reticulata*. 3. Remediação. 4. Saúde Ambiental. I. Morais, Simone Maria Teixeira de Sabóia, orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 049 da sessão de Defesa de Dissertação de João Marcos de Lima Faria, que confere o título de Mestre em Biodiversidade Animal, na área de concentração em Biodiversidade Animal.

Ao/s vinte e dois dias do mês de outubro de dois mil e vinte e um (22/10/2021), a partir das 14h30min, por videoconferência, seguindo portaria CAPES no. 36 de 16 de março de 2020 e recomendação da UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "BIOACUMULAÇÃO E BIOMARCADORES CELULARES E TECIDUAIS INVESTIGADOS NO FÍGADO DO PEIXE *Poecilia reticulata* (PETERS, 1859) EXPOSTOS E PÓS- EXPOSTOS A ÍONS FERRO E NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO ( $\gamma$ - $Fe_2O_3$ ) ASSOCIADAS A GLIFOSATO E ROUNDUP®". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais (DMORF/ICB/UFG), com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez (LNNano/CNPEM), membro titular externo; Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato aprovado pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) vinte e dois dias do mês de outubro de dois mil e vinte e um (22/10/2021).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por Simone Maria Teixeira De Sabóia Morais, Professor do Magistério Superior, em 29/11/2021, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Diego Stéfani Teodoro Martinez, Usuário Externo, em 29/11/2021, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Gisele Augusto Rodrigues De Oliveira, Professor do Magistério Superior, em 21/12/2021, às 17:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2528316 e o código CRC AE05E488.

# COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA

## MEMBROS EFETIVOS E SUPLENTES

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais  
Orientadora junto ao PPGBAN e presidente da banca

---

Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez  
Laboratório Nacional de Nanotecnologia  
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira  
Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal de Goiás

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Daniela de Melo e Silva (suplente)  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Goiás

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço ao casal de jovens que se casaram em um dezembro chuvoso de 1993 com o objetivo de construir uma família feliz e de sucesso, meus genitores e amigos Ari Antônio de Faria e Édina Lúcia de Lima Faria, que se foram para a aventura seguinte juntos em junho de 2021 em decorrência de uma pandemia mal administrada e ignorada, durante o desenvolvimento desta dissertação. Jamais vou esquecer da felicidade que vocês tinham em me ver evoluir, na euforia de saber que meu primeiro artigo foi publicado e no apoio às minhas iniciativas. Meu agradecimento a vocês é pelo exemplo de vida e por isto reforço meu compromisso em honrar a proposta de plenitude e de sucesso que vocês desejavam para mim. Vou ser mestre, doutor, professor e viajar o mundo levando vocês comigo, porque como já dizia Albus Dumbledore “Para a mente bem estruturada, a morte é apenas a aventura seguinte”. Estou terminando esta aventura chamada mestrado e no futuro nos vemos juntos em outra aventura. Amo vocês.

Aos meus irmãos, Douglas Matheus de Lima Faria e Maria Clara de Lima Faria, por serem companheiros de jornada, dispostos a enfrentar os percalços e reorganizar a vida. Obrigado por serem pontos de referência afetiva, lógica e moral durante os processos da vida. Amo vocês.

Aos meus avós, Ambrosina Francisca de Lima, Joaquim Prudêncio Neto, Ilda Maria de Faria e Antônio José de Faria (*in memoriam*), que personificam os anciãos da nossa família, me ensinando a buscar o equilíbrio entre o esforço e o sofrimento. Os ensinamentos de vida de vocês, com certeza colaboraram para o desenvolvimento pacífico e de sucesso desta dissertação.

Nesta oportunidade, realizo meus agradecimentos às instituições que abrigaram a realização desta dissertação: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas e Programa De Pós-Graduação Em Biodiversidade Animal. O papel institucional destes órgãos como construções coletivas da sociedade foi fundamental na obtenção dos resultados e formação de recursos humanos envolvidos nesta temporada de mestrado.

Desde os primeiros planejamentos deste trabalho, foi preconizada a construção e reforço de parcerias institucionais e por isto faço meus agradecimentos ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução, ao Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação e a Central Analítica do Instituto de Química da UFG. Sem a estrutura de altíssima qualidade, focada na prestação de serviços de qualidade, com equipamentos exclusivos e de alto desempenho não seria possível sonhar e realizar tantas análises que fazem parte desta dissertação. Agradeço imensamente a disponibilidade e paciência em me apoiar nas investigações – muitas vezes ousadas – deste trabalho.

Além dos centros multiusuários citados acima, a composição deste trabalho passa pela integração de laboratórios de pesquisa que participaram ativamente na síntese de materiais, armazenamento e gerenciamento de amostras e obtenção de imagens. Neste sentido, agradeço: ao laboratório de pesquisa em morfologia humana e animal na pessoa da professora Karina Simões; ao laboratório de bioquímica e engenharia genética na pessoa do professor Luiz Artur Mendes Bataus; e ao laboratório de coloides e materiais

nanoestruturados na pessoa da professora Emília Celma de Oliveira Lima que se tornou uma amiga e parceira da vida.

Agradeço também aos professores Daniela de Melo e Silva, Paulo De Marco Júnior, Marisa Narciso Fernandes, Iara Costa Souza e Diego Stéfani Teodoro Martinez, que de um modo ou de outro participaram na leitura e avaliação deste trabalho desde suas formas de relatório e qualificação, até a defesa da dissertação. Nesta oportunidade, agradeço ainda o professor Welinton Ribamar Lopes que co-orientou este trabalho, permanecendo disponível durante todo este período.

Na sequência dos atos de gratidão, agradeço as pessoas que foram amigas durante esta jornada e que participaram direta ou indiretamente nos desafios acadêmicos do mestrado, dividindo a bancada, a casa, o coração e as angústias próprias desta fase da vida. Saibam que reconheço cada um e que sempre terão espaço e suporte no que eu puder fazer por vocês.

Meu reconhecimento profundo ao Laboratório de Comportamento Celular, que foi a casa das ideias projetadas e realizadas nesta dissertação. Obrigado a equipe primorosa que sempre prezou pela união e desenvolvimento coletivo dos projetos de cada um, buscando explorar a estrutura que o laboratório e a universidade nos oferece, para desenvolver trabalhos de excelência na área.

Meus agradecimentos as entidades financiadoras que avaliaram e deram crédito às nossas propostas de pesquisa. Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG pelo financiamento a partir do programa de pesquisa para o SUS (Edital 04/17 – Proj. 201710267001261 – FAPEG/SES-

GO/CNPq/MS-DECIT/2017 – PPSUS-GO) e da parceria FAPEG com a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Edital 04/19 – Proj. 2019011000085). Além destes financiamentos, o presente trabalho foi realizado com apoio (bolsa de demanda social) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88882.386522/2019-01.

Por fim, quero finalizar esta seção agradecendo a professora Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais, que tem me mostrado as possibilidades pelos caminhos tortuosos da vida. Obrigado pela parceria e zelo pelo nosso desenvolvimento pessoal e profissional. Sou muito grato por acreditar no potencial de produzir ciência de qualidade sem abandonar o caráter humanístico fundamental nos processos de aprendizado, inclusive na pós graduação. Imensamente, obrigado.

A todos que irão acessar e ler os produtos deste mestrado. Obrigado e façam bom proveito!

*Mischief Managed!*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	16
ABSTRACT .....	18
LISTA DE FIGURAS .....	20
LISTA DE TABELAS .....	24
LISTA DE ABREVIACES.....	25
CAPÍTULO 1 .....	26
CONTAMINAO NO AMBIENTE AQUÁTICO, AVALIAES UTILIZANDO PEIXES COMO MODELO E O PROPÓSITO DA APLICAO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA REMEDIAO AMBIENTAL. ....	26
INTRODUO.....	27
OBJETIVOS.....	30
Objetivos gerais .....	30
Objetivos específicos .....	30
Bibliografia .....	30
CAPÍTULO 2 .....	34
RECOVERY TREND TO CO-EXPOSURE OF IRON OXIDE NANOPARTICLES ( $\gamma$ - $Fe_2O_3$ ) AND GLYPHOSATE IN LIVER TISSUE OF THE FISH <i>Poecilia reticulata</i> .....	34
Abstract.....	37
Keywords.....	37
1.    Introduction .....	38
2.    Material and methods.....	40
2.1.    IONP synthesis and characterization.....	40
2.2.    Experimental design .....	41
2.3.    Histological evaluation and histopathological index.....	42

	14
2.4. Biometric analysis and histopathological index.....	43
2.5. Ultrastructural evaluation .....	44
2.6. Statistical argumentation .....	44
3. Results and discussion.....	45
3.1. Nanoparticles characterization.....	45
3.2. Histological analysis and Histopathological index (Hi) .....	47
3.3. Ultrastructural analysis .....	60
3.4. Biometric analysis.....	65
4. Conclusion .....	66
5. Declaration of Competing Interest.....	66
6. Author contributions .....	66
7. Acknowledgments .....	67
8. Bibliography .....	67
CAPÍTULO 3 .....	80
TOXICIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE IONP E GLIFOSATO EM <i>POECILIA</i>	
<i>RETICULATA</i> DURANTE ACUMULAÇÃO E ELIMINAÇÃO DE FERRO APÓS	
EXPOSIÇÃO E PÓS-EXPOSIÇÃO À ASSOCIAÇÃO DE IONP E GLIFOSATO	
80	
Resumo .....	81
Abstract.....	82
Introdução.....	83
Materials and Methods .....	86
Design experimental .....	86
Análises ultraestruturais e histológicas .....	87
Análise de distribuição e quantificação de gotículas de lipídeo.....	88
Quantificação de ferro por ICP-OES .....	89
Design estatístico .....	89
Resultados e discussão .....	90

	15
Acumulação de ferro .....	90
Integridade tecidual.....	94
Distribuição lipídeo.....	100
Conclusão.....	103
Agradecimentos.....	104
Bibliografia.....	104
CAPÍTULO 4 .....	117
EVALUATION OF THE DISTRIBUTION AND ORGANIZATION OF LIPIDS IN HEPATIC TISSUE BY LIGHT MICROSCOPY AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY.....	117
ABSTRACT.....	118
SPECIFICATIONS TABLE.....	119
Method details .....	119
Background.....	119
Methodology description .....	119
Methods validation.....	126
Acknowledgements:.....	126
Declaration of interests: .....	126
CAPÍTULO 5 .....	128
CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO .....	128
Sobre os dados obtidos e resultados apresentados.....	129
Sobre a formação de recursos humanos.....	132
Bibliografia geral.....	134

## RESUMO

Os avanços na elaboração dos nanomateriais os qualificaram como elementos de solução para diversas áreas, dentre elas a remediação com aplicações em segurança e saúde ambiental. No presente estudo as nanopartículas de ferro (IONP) foram sintetizadas com tamanho de 2,9 nm e funcionalizadas com citrato. Os experimentos foram realizados com peixes fêmeas e machos de *Poecilia reticulata* (guppy) expostos às IONP (0,3 mgFe/L), bem como a íons ferro (0,3 mg/L) (IFe) e às associações de IONP+GLY (0,65 mg/L) e IONP + GBH (0,65 e 1,30 mgGLY/L) por 7, 14 e 21 dias, seguidos por períodos de pós-exposição em água reconstituída por 7, 14 e 21 dias para avaliação da capacidade de recuperação de danos causados às células e tecidos hepáticos. Desta maneira, foram avaliados os biomarcadores: a) histológicos, com análise da integridade tecidual e cálculo de índice histopatológico; b) ultraestruturais, com avaliação das células hepáticas avaliação e quantificação da distribuição de lipídeos; c) biométricos, com avaliação do fator de condição e índice hepatossomático; d) de bioacumulação, com quantificação de ferro no corpo dos peixes. Averiguou-se que a forma nanoparticulada do ferro causa menos danos teciduais, porém maior bioacumulação em relação ao tratamento com a forma iônica do ferro (IFe), além disto, os resultados indicaram que os tratamentos com IONP+GBH têm maior toxicidade nos biomarcadores ultraestruturais e histológicos quando comparados a IONP+GLY. Para além da avaliação dos danos oriundos da exposição, os dados obtidos indicaram tendência de recuperação da toxicidade causada por todos os

tratamentos em períodos de pós exposição iguais ou superiores a 21 dias, para reversão total do dano. Assim, os dados obtidos elucidaram como se deu os efeitos tóxicos da associação de IONP+GLY, abrindo novas perspectivas para estudos sobre os mecanismos de toxicidade das IONP, bem como sua possibilidade de aplicação para a remediação ambiental.

Palavras-chave: recuperação, *Poecilia reticulata*, remediação, saúde ambiental.

## ABSTRACT

Advances in the development of nanomaterials have qualified them as essential elements for several areas, including remediation with applications in safety and environmental health. In the present study, iron nanoparticles (IONP) were synthesized with a size of 2.9 nm and functionalized with citrate. The experiments were carried out with female and male fishes of *Poecilia reticulata* (guppy) exposed to IONP (0.3 mgFe/L), as to iron ions (0.3 mg/L) (IFe) and to IONP+GLY associations (0.65 mg/L) and IONP + GBH (0.65 and 1.30 mgGLY/L) for 7, 14 and 21 days, followed by post-exposure periods in reconstituted water for 7, 14 and 21 days for evaluation of the ability to recover from damage caused to liver cells and tissues. Thus, the following biomarkers were evaluated: a) histological, with tissue integrity analysis and histopathological index calculation; b) ultrastructural, with evaluation of liver cells, evaluation and quantification of lipid distribution; c) biometrics, with assessment of the condition factor and hepatosomatic index; d) bioaccumulation, with quantification of iron in the fish body. It was found that the nanoparticulate form of iron causes less tissue damage, but greater bioaccumulation compared to the treatment with the ionic form of iron (IFe), in addition, the results indicated that treatments with IONP+GBH have greater toxicity in ultrastructural and histological biomarkers when compared to IONP+GLY. In addition to the assessment of damage from exposure, the data obtained indicated a trend towards recovery of the toxicity caused by all treatments in post-exposure periods equal to or greater than 21 days, for total reversal of the damage. Thus, the data described elucidated how the toxic effects of the association of IONP+GLY occurred, opening new

perspectives for studies on the mechanisms of toxicity of IONPs, as well as their possibility of application for environmental remediation.

Keywords: recovery, *Poecilia reticulata*, remediation, environmental health.

## LISTA DE FIGURAS

Figure 1: Characterization graphs of IONPs. (A) IONPs transmission electron micrography; (B) Isolated IONP; (C) Histogram of frequency of individual size distribution; (D) Distribution of hydrodynamic diameter; (E) Absorption of the UV-Vis spectrum ; (F) X-ray diffraction IONPs profile..... 46

Figure 2: Histological section of liver of *Poecilia reticulata* from Control group and groups IFe and IONP+GBH1. (A) Control group with regular hepatocytes and arranged in cords; (B) IFe treatment, presenting the fatty metamorphosis in hepatocytes, an indicative of oxidative stress and lipid peroxidation; (C and D) IFe treatment, showing necrotic areas with action of melanomacrophages indicating a process of detoxification of compromised tissue; (E) IONPs + GBH1 treatment with high inflammatory response, including melanomacrophage sites throughout the tissue, with progression to necrotic areas over time; (F) IONPs + GBH1 treatment with leukocyte infiltration throughout the tissue. Red arrowhead: dilated sinudoid; Yellow arrowhead: Leukocyte infiltration; Black arrowhead: Hyperemia / congestion of vessels; Orange arrowhead: bile duct; Red arrowhead: dilated sinudoid; Yellow arrowhead: Leukocyte infiltration; Black arrowhead: Hyperemia / congestion of vessels; Orange arrowhead: bile duct; Dotted black contour: melanomacrophages sites; Dotted red circle: necrotic zones..... 49

Figure 3: Histological section of liver of *Poecilia reticulata* from IONP+GBH2 and IONP+GLY. (A) IONP+GBH2 treatment showing hydropic degeneration, result of the accumulation of liquid, indicative of cell death processes, exudate resulting from the leakage of liquids in the inflammation process; (B) IONP+GBH2 treatment with melanomacrophage sites dispersed and associated with the vessel, with leukocyte infiltration throughout the tissue; (C) IONPs + GBH2 treatment indicating necrotic zones with the presence of melanomacrophages; (D) IONPs + GLY showing large leukocyte infiltrate close to an over-dilated vessel, which confirms the relationship between circulatory disorders and the inflammatory response; (E) IONPs + GLY treatment with hydropic degeneration and dispersed melanomacrophage sites; (F) ) IONPs + GLY treatment presenting steatosis with high extension in the tissue and melanomacrophages associated with hepatopancreas and bile ducts Red arrowhead: dilated sinudoid; Yellow

arrowhead: Leukocyte infiltration; Black arrowhead: Hyperemia / congestion of vessels; Orange arrowhead: bile duct; Red arrowhead: dilated sinusoid; Yellow arrowhead: Leukocyte infiltration; Black arrowhead: Hyperemia / congestion of vessels; Orange arrowhead: bile duct; Dotted black contour: melanomacrophages sites; Dotted red circle: necrotic zones; Red rhombuses: exudate. .... 50

Figure 4: Stacked graph and linear regression of histopathological indices (Hi). (A-E) Histopathological index of circulatory disorders ( $Hi_{Rp1}$ ); (B-F) Histopathological index of regressive changes ( $Hi_{Rp2}$ ); (C-G) Histopathological index for inflammatory response ( $Hi_{Rp3}$ ); (D-H) Total histopathological index of the liver ( $Hi_{liv}$ )..... 57

Figure 5: Ultrastructure of hepatocytes of *Poecilia reticulata*. (A1 and A2) Unexposed group, intact hepatocytes, preserved Disse space, small and dispersed lipid droplets; (B1, B2 and B3) Group exposed to IFe: (B1) Necrotic zone (dotted square) and lipofuscin zones (arrows); (B2) Large lipid droplets associated with ER; (B3) Large lipid droplets associated with the disorganized endoplasmic reticulum. (C1, C2 and C3) Group exposed to IONP + GBH1: (C1) Lipid droplets (triangle), proliferation of mitochondria and disorganized ER; (C2) Smooth endoplasmic reticulum (dashed); (C3) Disorganized endoplasmic reticulum, bile duct (arrow). (D1, D2 and D3) Group exposed to IONP + GBH2: (D1) Large lipid droplets (triangles); (D2) Proliferation of mitochondria and elongated dysmorphic mitochondria (stippling); (D3) Congested cell of lipid droplets (triangle). (E1, E2 and E3) Group exposed to IONP + GLY: (E1) Proliferation of lipid droplets in hepatocytes (triangles); (E2) Formation of vesicles and disordered ER; (E3) Proliferation of mitochondrias. N: nucleus; M: Mitochondria; Ls: lysosome; RER: Rough endoplasmic reticulum. .... 62

Figure 6: Stacked graphic of biometric analyses. (A) Hepassomatic index (HSI); (B) Fulton's condition factor ( $K_{Fulton}$ ). .... 65

Figure 7: Gráficos de acumulação de ferro em peixes *Poecilia reticulata*. A) gráfico empilado com apresentação dos desvios padrões. B) Gráfico de linhas, mostrando o decréscimo do acúmulo de ferro durante a pós exposição. .... 91

Figure 8: Tecido hepático de *Poecilia reticulata* pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e corado com azul de toluidina. (A) Controle ; (B) IFe – 14 dias de exposição; (C) IONP – 21 dias de pós-exposição; (D) IONP+GBH1 – 14 dias de exposição; (E) IONP+GBH2 – 21 dias de exposição; (F) IONP+GLY – 14 dias de pós-exposição ..... 95

Figure 9: Tecido hepático de *Poecilia reticulata* submetido a reação de ácido periódico de Schiff e corado com azul de toluidina. Os pontos em roxo indicam os grupamentos de glicoconjugados. (A) IFe – 14 dias de exposição; (B) IONP+GBH1 – 21 dias de exposição; (C) IONP+GBH2 – 14 dias de pós-exposição; (D) IONP+GLY – 21 dias de pós-exposição..... 96

Figure 10: Tecido hepático de *Poecilia reticulata* pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e corado com hematoxilina de Meyer. (A) IONP – 7 dias de exposição; (B) IFe – 7 dias de exposição; (C) IONP+GBH2 – 7 dias de pós exposição; (D) IONP+GLY – 14 dias de pós-exposição..... 98

Figure 11: Eletronmicrografias de varredura por elétrons retro espalhados de fígado de *Poecilia reticulata*. As zonas de maior brilho indicam elementos de maior número atômico, neste caso, as gotículas de lipídeo aparecem com maior brilho já que o ósmio tem afinidade por lipídeos e um alto número atômico. (A) Controle – 7 dias de exposição; (B) IFe – 14 dias de exposição; (C) IONP+GBH2 – 14 dias de exposição; (D) IONP+GLY – 21 dias de exposição. .... 100

Figure 12: (A) Gráfico de área total ocupada por lipídeos; (B) Gráfico de curvas gaussianas com a distribuição da área total ocupada por lipídeos. .... 102

Figure 13: *Poecilia reticulata* liver tissue post-fixed with osmium before (A) and after (B) Mayer's hematoxylin staining. Without hematoxylin staining (A), it is not possible to locate the droplets in the cells, while in stained tissue (B) it is possible to visualize the nuclei (red arrows), as well as other structures such as blood vessels (dotted). ..... 121

Figure 14: Toluidine blue staining of *Poecilia reticulata* liver tissue without osmium (A,C) and post-fixed with 1% osmium (B,D). Toluidine blue staining alone traditionally marks most of the structural components of cells, with greater intensity in nuclei (red arrows), and also marks melanomacrophage sites (red rounded) in lighter shades of blue and does not stain erythrocytes with intensity.

On the other hand, when toluidine blue staining is applied to post osmium-fixed tissue it is possible to note the increased delimitation of cells by the intensity of membrane staining (B,D). Because of the blue+osmium combination the red blood cells are highlighted in the vessels (star) and in the melanomacrophage sites it is possible to identify the areas of lipofuscin pigment arranged in light brown droplets in the sites (D)..... 122

Figure 15: Scanning electron microscopy of the liver tissue of *Poecilia reticulata* with images obtained by secondary electron detection (A) and backscattered electron detection (B). Secondary electron detection (A) provides images of the topography of the sample, so in this case it is an image with low contrast between the elements. On the other hand, backscattered electron detection (B) provides elementary information, with brightness proportional to the atomic number of the materials. Because of the osmium affinity with lipids and its high atomic number in relation to the other elements in the sample, it is possible to observe that both macro steatosis (triangles) and micro steatosis (asterisks) are highlighted with high brightness, allowing an analysis with greater definition of the distribution of lipids in the tissue. .... 124

Figure 16: SEM-BEC image processing in Image J Fiji software. The original image is opened in the program and the scale is set (A); after the scale is set, the threshold area is defined to identify only the lipid droplets (B); the areas with artifacts and objects that are not of interest are cleaned and the threshold is applied (C); the minimum detection size is set in the particle analysis and measurements of the quantity and area of the lipid droplets are performed (D). .... 125

Figure 17: Elemental analysis by energy dispersive Xray spectroscopy (EDS) in liver tissue of *Poecilia reticulata*. The spectrums corresponds to highlited zones in electronmicrography and it is possible to note the osmium presence (bulk arrow) in lipid droplets. .... 126

## LISTA DE TABELAS

Table 1: Reference values for calculating the histopathological index. W = importance factor; Sv = score value.. <sup>a</sup> Bernet et al., 1999; <sup>b</sup> Bonifacio and Hued, 2019; <sup>c</sup> Qualhato et al., 2018; <sup>d</sup> This work. ....	44
Table 2: Image processing Step-by-step to realize threshold and obtain data of area and quantity of lipid droplets on software Image J Fiji.....	124

## LISTA DE ABREVIÇÕES

- AMPA:** ácido amino metil fosfônico
- APHA** American public health association
- CAPES:** Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal do Ensino superior
- CRTI:** Centro Regional para o desenvolvimento tecnológico e inovação
- DLS:** Dynamic light scattering
- DRX:** X-ray diffraction
- EDS:** Energy dispersive spectroscopy
- ELS:** Electrodynamic light scattering
- FAPEG:** Fundação de amparo a pesquisa do estado de Goiás
- FAPESP:** Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo
- GBH:** Glyphosate-based herbicide
- GLY:** Glyphosate/Glifosato
- HI:** Histopathological index
- HI<sub>LIV</sub>:** Histopathological index of liver
- HIS:** Hepatosomatic index
- ICB:** Instituto de Ciências Biológicas
- ICP-OES:** Espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado
- IFe:** Íons ferro
- IONP:** Iron oxide nanoparticles/nanopartículas de óxido de ferro
- LabCOMN:** Laboratório de colóides e materiais nanoestruturados
- LabMic:** Laboratório multiusuário de microscopia de alta resolução
- OECD:** Organization for economic and Co-operation development
- POEA:** Polioxietilenamida
- PPGBAN:** Programa de pós graduação em biodiversidade animal
- ROS:** Reactive oxygen species
- SEM:** Scanning electron microscopy
- SEM-BEC:** Scanning electron microscopy by backscattered electrons
- TEM:** Transmission electron microscopy
- UFG:** Universidade Federal de Goiás

## **CAPÍTULO 1**

### **CONTAMINAÇÃO NO AMBIENTE AQUÁTICO, AVALIAÇÕES UTILIZANDO PEIXES COMO MODELO E O PROPÓSITO DA APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA REMEDIAÇÃO AMBIENTAL.**

Este capítulo realiza uma breve revisão que embasou o delineamento deste trabalho

## INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos quando contaminados propiciam consideráveis danos à saúde animal, tendo em vista que os organismos que nele vivem podem absorver, acumular e/ou transferir os contaminantes ao longo da cadeia alimentar ou mesmo aos seus descendentes, o que se torna potencial perigo para o equilíbrio ecológico e a saúde ambiental, suscitando alerta para monitoramento das condições de impacto as quais os ambientes estão sujeitos. Dentre os grupos de animais, os peixes são possíveis biomonitores da exposição a agentes tóxicos. Uma vez que, a via de absorção orgânica pode ocorrer por múltiplas rotas, tais como: a) contato direto da água com as brânquias; b) contato com a pele; c) contato por ingestão de água ou alimentos, e por fim d) contato com os sedimentos (SÖFFKER; TYLER, 2012).

Neste sentido, é possível investigar e monitorar biomarcadores de vários níveis (Fig. 1), conseqüentemente abrangendo o espectro de complexidade com respostas mais sólidas e a possibilidade de relações entre si, o que é denominado análises de múltiplos biomarcadores (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008). Tendo em vista a diversidade de respostas biológicas e a gama de avaliações a poluentes químicos, tais como os agrotóxicos – comumente denominados “defensivos agrícolas” – e sua presença no meio, faz-se justificável que sejam conhecidos seus efeitos nos organismos e investigados métodos de remediação ambiental.

Entre os agrotóxicos, os organofosforados tem amplo espectro de uso e são estudados na ecotoxicologia, nesta perspectiva, experimentos avaliaram individualmente a ação de *Roundup*®, denominado na literatura como herbicida baseado em glifosato (GBH) (HARAYASHIKI et al., 2013; MA et al., 2019; SANTOS et al., 2017), e nanopartículas de óxido de ferro (IONP) em peixes (PEREIRA et al., 2020; QUALHATO et al., 2017, 2018; SHEEL et al., 2020), realizando abordagens com biomarcadores múltiplos, entre eles biomarcadores histológicos, ultraestruturais, bioquímicos e moleculares que se mostram como ferramentas eficientes para a detecção e caracterização de parâmetros toxicológicos.

A partir da perspectiva de avaliação de múltiplos biomarcadores , observações do comportamento e reações de nanopartículas de óxido de ferro (IONP) têm indicado como promissoras ferramentas a serem usadas na remediação ambiental, sobretudo, por sua característica de adsorção de variadas substâncias, inclusive o glifosato (FIORILLI et al., 2017; RIVOIRA et al., 2016).

Neste estudo serão investigados efeitos de associações de IONP com glifosato e GBH, justificando a necessidade de compreensão da ação das IONP. Desta forma, biomarcadores histológicos em guppies (*Poecilia reticulata*) expostos a IONP, diagnosticaram lesões no tecido hepático co-relacionadas com o estresse oxidativo no surgimento de alterações em curto e médio prazo de exposição bem como com a concentração do contaminante, portanto, são diagnosticadas como temporal e dose-dependentes (QUALHATO et al., 2017, 2018). Em paralelo, as avaliações histológicas podem ser complementadas a partir da exploração da ultraestrutura, a fim de fornecer respostas complexas do comportamento celular no que diz respeito a mecanismos de resposta imune e detoxificação.

Para além das IONP, as alterações promovidas por organofosforados, dentre eles os herbicidas a base de glifosato são de especial interesse no que se refere a detecção e biorremediação, por não serem seletivos e terem aplicação no combate a ervas daninhas em cultivos extensivos como de soja, milho e algodão (DUKE, 2018), fazendo dele o herbicida mais comercializado no mundo e o único capaz de inibir a síntese da enzima 5-enolpiruvil-3-shikimato fosfato (EPSPS) na via do Shikimato (DUKE, 2018), o que resulta na falha de produção dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina nos vegetais (JAWORSKI, 1972). Além das questões econômico-financeiras, o GBH é o agrotóxico alvo em casos periciais e jurídicos, já que estudos o indicam como responsável por cânceres, inclusive entre agricultores (ROOS et al., 2005; SOLOMON, 2020; THONGPRAKAI SANG et al., 2013).

As diversas formulações de GBH consistem em uma mistura do ingrediente ativo, o sal de isopropilamina glifosato, com surfactantes, dentre eles o POEA (poliethoxilato de talo amina), aminas e outros compostos não

discriminados pelo seu fabricante Monsanto. Estas substâncias penetram o solo e podem acabar em águas de profundezas e de superfície (BORGGAARD; GIMSING, 2008), deste modo, peixes expostos a GBH já demonstraram estresse oxidativo no fígado e inibição da acetilcolinesterase (MODESTO; MARTINEZ, 2010), para além de alterações histopatológicas e mudanças na expressão gênica em fígado e brânquias de guppies (ROCHA et al., 2015b; SANTOS et al., 2017). Tendo em vista os efeitos, as contradições de uso e a presença no cotidiano da agricultura é necessário se formular alternativas que indiquem possibilidade de manejo e remediação ambiental do GBH, o que atualmente está sendo proposto por meio do emprego de IONP que o adsorvam.

Para que o processo de remediação seja efetivo, a biodisponibilidade e biodegradabilidade de IONP não devem promover alterações teciduais ou moleculares compatíveis com reações tóxicas em animais expostos a ambientes em que a remediação seja realizada. Desta forma, as avaliações da toxicidade da maghemita e das substâncias por ela adsorvidas devem ser realizadas.

Além da exposição, períodos pós-exposição em ambientes descontaminados são importantes para investigar a possível recuperação de danos causados levando em conta a possibilidade de que peixes submetidos a estresse por contaminação ambiental, migrem, tenham ciclos de vida dependentes da sazonalidade ou que habitem ambientes lóticos onde o fluxo da água e das substâncias dissolvidas é contínuo, de modo que o período de exposição a contaminantes não seja permanente, seguido por períodos em áreas não contaminadas. Neste caminho, animais expostos a metais pesados como mercúrio inorgânico mostraram lentidão na eliminação do metal nos tecidos (PEREIRA et al., 2015), para além disto, já foi mostrado que biomarcadores de genotoxicidade e mutagênese em peixes expostos a GBH têm aumento da capacidade de reparo em períodos de pós-exposição (MARQUES et al., 2014) enquanto a investigação de pós-exposição a IONP e associações é pioneira.

Deste modo, considerando o potencial das IONP funcionalizadas com citrato de adsorver glifosato, este estudo propõe a investigação de biomarcadores histopatológicos, ultraestruturais e bioquímicos de guppies por

meio da co-exposição e pós-exposição de IONP  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemite) associadas a herbicida baseado em glifosato (GBH) e glifosato puro (GLY), para avaliar a interação e possibilidade de recuperação dos animais na interface de uso das IONP em propostas de remediação ambiental.

## OBJETIVOS

### Objetivos gerais

Avaliar a resposta no tecido hepático do guppy (*Poecilia reticulata*) expostos e pós-expostos a íons ferro e nanopartículas associadas a glifosato puro e herbicida baseado em glifosato.

### Objetivos específicos

- Sintetizar as nanopartículas de maghemita;
- Caracterizar as nanopartículas de maghemita;
- Avaliar o potencial hepatotóxico de IONP livres e associadas à Roundup® e Glifosato em exposição de longo período por métodos histopatológicos e ultra-estruturais;
- Averiguar o potencial hepatotóxico de íons ferro livres em exposição de longo período;
- Determinar os efeitos da pós exposição de longo período no tecido e nas células do fígado;
- Estabelecer análises estatísticas comparativas entre os tratamentos propostos;
- Avaliar a acumulação e eliminação de ferro nos peixes expostos aos tratamentos.

## Bibliografia

- Borggaard, O.K., Gimsing, A.L., 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Manag. Sci.* 64, 441–456. <https://doi.org/10.1002/ps.1512>
- Duke, S.O., 2018. The history and current status of glyphosate. *Pest Manag. Sci.* 74, 1027–1034. <https://doi.org/10.1002/ps.4652>

- Fiorilli, S., Rivoira, L., Calì, G., Appendini, M., Bruzzoniti, M.C., Coisson, M., Onida, B., 2017. Iron oxide inside SBA-15 modified with amino groups as reusable adsorbent for highly efficient removal of glyphosate from water. *Appl. Surf. Sci.* 411, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.03.206>
- Harayashiki, C.A.Y., Junior, A.S.V., Machado, A.A. de S., Cabrera, L. da C., Primel, E.G., Bianchini, A., Corcini, C.D., 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquat. Toxicol.* 142–143, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.006>
- Jaworski, E.G., 1972. Mode of Action of N-Phosphonomethylglycine: Inhibition of Aromatic Amino Acid Biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 20, 1195–1198. <https://doi.org/10.1021/jf60184a057>
- Ma, J., Zhu, J., Wang, W., Ruan, P., Rajeshkumar, S., Li, X., 2019. Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. *Environ. Pollut.* 252, 1288–1300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.040>
- Marques, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2014. Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods - Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 166, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.07.009>
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047>
- Pereira, A.C., Gonçalves, B.B., Brito, R. da S., Vieira, L.G., Lima, E.C. de O., Rocha, T.L., 2020. Comparative developmental toxicity of iron oxide nanoparticles and ferric chloride to zebrafish (*Danio rerio*) after static and semi-static exposure. *Chemosphere* 254, 126792. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126792>

- Pereira, P., Raimundo, J., Barata, M., Araújo, O., Pousão-Ferreira, P., Canário, J., Almeida, A., Pacheco, M., 2015. A new page on the road book of inorganic mercury in fish body-tissue distribution and elimination following waterborne exposure and post-exposure periods. *Metallomics* 7, 525–535. <https://doi.org/10.1039/c4mt00291a>
- Qualhato, G., Rocha, T.L., de Oliveira Lima, E.C., e Silva, D.M., Cardoso, J.R.J.R., Grisolia, C.K., de Saboia-Morais, S.M., Lima, E.C. de O., Silva, D.M., Cardoso, J.R.J.R., Koppe Grisolia, C., Sabóia-Morais, S.M.T., 2017. Genotoxic and mutagenic assessment of iron oxide (maghemite- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticle in the guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 183, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.061>
- Qualhato, G., Sabóia-Morais, S.M.T., Silva, L.D., Rocha, T.L., 2018. Melanomacrophage response and hepatic histopathologic biomarkers in the guppy *Poecilia reticulata* exposed to iron oxide (maghemite) nanoparticles. *Aquat. Toxicol.* 198, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.014>
- Rivoira, L., Appendini, M., Fiorilli, S., Onida, B., Del Bubba, M., Bruzzoniti, M.C., 2016. Functionalized iron oxide/SBA-15 sorbent: investigation of adsorption performance towards glyphosate herbicide. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 21682–21691. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7384-8>
- Rocha, T.L., Santos, A.P.R. dos, Yamada, Á.T., Soares, C.M. de A., Borges, C.L., Bailão, A.M., Sabóia-Morais, S.M.T., 2015. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.016>
- Roos, A.J., Blair, A., Rusiecki, J.A., Hoppin, J.A., M., S., Dosemeci, M., Dosemeci, M., Alavanja, M.C., Sandler, D.P., 2005. Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Environ. Health Perspect.* 113, 49–54.
- Santos, A.P.R., Rocha, T.L., Borges, C.L., Bailão, A.M., de Almeida Soares, C.M., de Sabóia-Morais, S.M.T., 2017. A glyphosate-based herbicide

induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 168, 933–943.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.116>

Sheel, R., Kumari, P., Panda, P.K., Ansari, M.D.J., Patel, P., Singh, S., Kumari, B., Sarkar, B., Mallick, M.A., Verma, S.K., 2020. Molecular intrinsic proximal interaction infer oxidative stress and apoptosis modulated in vivo biocompatibility of P.niruri contrived antibacterial iron oxide nanoparticles with zebrafish. *Environ. Pollut.* 267, 115482.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115482>

Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 112–120.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.01.012>

Söffker, M., Tyler, C.R., 2012. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish a critical review on effects and possible consequences. *Crit. Rev. Toxicol.* 42, 653–668.

<https://doi.org/10.3109/10408444.2012.692114>

Solomon, K.R., 2020. Estimated exposure to glyphosate in humans via environmental, occupational, and dietary pathways: an updated review of the scientific literature. *Pest Manag. Sci.* 76, 2878–2885.

<https://doi.org/10.1002/ps.5717>

Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J., 2013. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem. Toxicol.* 59, 129–136.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>

## CAPÍTULO 2

### **RECOVERY TREND TO CO-EXPOSURE OF IRON OXIDE NANOPARTICLES ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) AND GLYPHOSATE IN LIVER TISSUE OF THE FISH *POECILIA RETICULATA***

Este capítulo apresenta o artigo já publicado na revista "Chemosphere" (fator de impacto: 5,778) em junho de 2021, referente aos resultados obtidos neste trabalho

**Recovery trend to co-exposure of Iron Oxide Nanoparticles ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) and Glyphosate in liver tissue of the fish *Poecilia reticulata***

João Marcos de Lima Faria<sup>a</sup>; Lucas Nunes Guimarães<sup>a</sup>; Victória Costa da Silva<sup>a</sup>; Emília Celma de Oliveira Lima<sup>b</sup>; Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Cellular Behavior, Department of Morphology, Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

<sup>b</sup> Chemistry Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

\*

Corresponding author at: Simone Sabóia-Morais, Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas IV, Laboratório de Comportamento Celular, Sala 101, CEP 74690-900, Goiânia, Goiás, Brasil. Tel.: +55(62) 3521-1485. E-mail address: simone\_saboia@ufg.br



## Recovery trend to co-exposure of iron oxide nanoparticles ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) and glyphosate in liver tissue of the fish *Poecilia reticulata*

João Marcos de Lima Faria<sup>a</sup>, Lucas Nunes Guimarães<sup>a</sup>, Victória Costa da Silva<sup>a</sup>,  
Emília Celma de Oliveira Lima<sup>b</sup>, Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Cellular Behavior, Department of Morphology, Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

<sup>b</sup> Chemistry Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

### ARTICLE INFO

Handling Editor: Willie Peijnenburg

**Keywords:**  
Iron ions  
Glyphosate  
Roundup  
Liver  
Recovery  
Fish

### ABSTRACT

Citrate-coated iron oxide nanoparticles (IONPs) have potential use in environmental remediation, with possibilities in decontaminating aquatic environments exposed to toxic substances. This study analyzed IONPs associated to Roundup Original, a glyphosate-based herbicide (GBH), and pure glyphosate (GLY), through ultrastructural and histopathological biomarkers in liver tissue, from females of *Poecilia reticulata* exposed to: iron ions (0.3 mg/L) (IFe) and IONPs (0.3 mgFe/L) associated with GLY (0.65 mg/L) and GBH (0.65 mgGLY/L (IONP + GBH1) and 1.30 mgGLY/L (IONP + GBH2)) for a period of 7, 14 and 21 days, followed by an equal post-exposure period only in reconstituted water. For the assays, the synthesized IONPs had crystalline and rounded shape with an average diameter of 2,90 nm, hydrodynamic diameter 66,6 mV, zeta potential -55,4 and diffraction profile of maghemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). The data obtained by biomarkers indicated a high inflammatory response in all treatments. These same parameters, considered during the post-exposure period indicated recovery in reaction patterns of circulatory disturbances and regressive changes, resulting in average reductions of 37,53 points in IFe, 21 points in IONP + GBH1, 15 points in IONP + GBH2 and 11 points in IONP + GLY in total histopathological index of liver after 21 days post-exposure. However, although the cellular and tissue responses were significant, there was no change in the condition factor and hepatosomatic index, denoting resilience of the experimental model.

### 1. Introduction

Nanoparticles have several applications, including agriculture (Petrovsky and Martínez-António, 2017), human health (Ojo et al., 2021), textile industry (Shahidi, 2019) and environmental health (Guerra et al., 2018; Mohmood et al., 2013; Simeonidis et al., 2016), these structures are in a scale of 1–100 nm, giving them specific physical and chemical properties.

Among the nanoparticles, the iron oxide nanoparticles (IONPs) are widely used because they are easy to synthesize at low cost and enable a variety of functionalizations, allowing for the existence of phases of magnetite (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) and maghemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Guo and Barnard, 2013; Woo et al., 2004), the latter - maghemite - has

characteristics of sphericity and possibility of citrate functionalization (Assis et al., 2019), ensuring negative charge in IONPs surface (Ghosh et al., 2016), so that make the interactions with molecules available in the environment possible, justifying its use in this study.

Although the nanoparticles have interesting characteristics for environmental remediation, so it is necessary to understand its toxicological effects to articulate good usage practices. Thereby, studies with aquatic toxicity assessment models demonstrate the IONPs' toxicity in fish with genotoxic (Qualhato et al., 2017) and histopathological damage (Qualhato et al., 2018) in *Poecilia reticulata* exposed by long period to 0,3 mg/L of IONPs, in addition to sub-lethal effects as embryotoxicity and cardiotoxicity in *Danio rerio*, after acute exposure to IONPs' increasing concentration of 0,3–10 mg/L (Pereira et al., 2020), in *Daphnia magna*

\* Corresponding author. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas IV, Laboratório de Comportamento Celular, Sala 101, ZIP 74690-900, Goiânia, Goiás, Brazil.

E-mail address: [simone\\_saboia@ufg.br](mailto:simone_saboia@ufg.br) (S.M.T. Sabóia-Morais).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130993>

Received 31 March 2021; Received in revised form 21 May 2021; Accepted 24 May 2021

Available online 1 June 2021

0045-6535/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## **Recovery trend to co-exposure of Iron Oxide Nanoparticles ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) and Glyphosate in liver tissue of the fish *Poecilia reticulata***

### **Abstract**

Citrate-coated iron oxide nanoparticles (IONP) have potential use in environmental remediation, with possibilities in decontaminating aquatic environments exposed to toxic substances. This study analyzed IONP associated to Roundup Original, a glyphosate-based herbicide (GBH), and pure glyphosate (GLY), through ultrastructural and histopathological biomarkers in liver tissue, from females of *Poecilia reticulata* exposed to: iron ions (0.3mg / L) (IFe) and IONP (0.3mgFe / L) associated with GLY (0.65mg / L) and GBH (0.65mgGLY / L (IONP + GBH1) and 1.30mgGLY / L (IONP + GBH2)) for a period of 7, 14 and 21 days, followed by an equal post-exposure period only in reconstituted water. For the assays, the synthesized IONP had crystalline and rounded shape with an average diameter of 2,90nm, hydrodynamic diameter 66,6, zeta potential -55,4 and diffraction profile of maghemite ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). The data obtained by biomarkers indicated a high inflammatory response in all treatments. These same parameters, considered during the post-exposure period indicated recovery in reaction patterns of circulatory disturbances and regressive changes, resulting in average reductions of 37,53 points in IFe, 21 points in IONP+GBH1, 15 points in IONP+GBH2 and 11 points in IONP+GLY in total histopathological index of liver after 21 days post-exposure. However, although the cellular and tissue responses were significant, there was no change in the condition factor and hepatosomatic index, denoting resilience of the experimental model.

### **Keywords**

Iron ions, Glyphosate, Roundup, Liver, Recovery, Fish

## 1. Introduction

Nanoparticles have several applications, including agriculture (Pestovsky and Martínez-Antonio, 2017), human health (Ojo et al., 2021), textile industry (Shahidi, 2019) and environmental health (Guerra et al., 2018; Mohmood et al., 2013; Simeonidis et al., 2016), these structures are in a scale of 1 to 100 nanometers, giving them specific physical and chemical properties.

Among the nanoparticles, the iron oxide nanoparticles (IONP) are widely used because they are easy to synthesize at low cost and enable a variety of functionalizations, allowing for the existence of phases of magnetite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), hematite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) and maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (Guo and Barnard, 2013; Woo et al., 2004), the latter - maghemite - has characteristics of sphericity and possibility of citrate functionalization (Assis et al., 2019), ensuring negative charge in IONP surface (Ghosh et al., 2016), so that make the interactions with molecules available in the environment possible, justifying its use in this study.

. Although the nanoparticles have interesting characteristics for environmental remediation, so it is necessary to understand its toxicological effects to articulate good usage practices. Thereby, studies with aquatic toxicity assessment models demonstrate the IONP' toxicity in fish with genotoxic (Qualhato et al., 2017) and histopathological damage (Qualhato et al., 2018) in *Poecilia reticulata* exposed by long period to 0,3mg/L of IONP, in addition to sub-lethal effects as embryotoxicity and cardiotoxicity in *Danio rerio*, after acute exposure to IONP' increasing concentration of 0,3 to 10mg/L (Pereira et al., 2020), in *Daphnia magna* exposed to concentrations between 10 to 100ppm of magnetite by 48 hours indicated reproductive alterations and survival impairment (Blinova et al., 2017).

In view of the ecotoxicological potential of IONP and mixtures, it is essential to think about limit concentrations of use, in this case, this study will use the concentration of 0.3mg of Iron per liter of water, considering that it is the maximum concentration allowed for water use in Brazilian legislation (CONAMA, 2011, 2005), in addition to this, concentrations higher than 0.3mg / L have already been reported in rivers contaminated by heavy metals with damage to the local ecosystem (Giongo et al., 2020; Razak et al., 2021; Siddique et al., 2021). Thus, the organic reaction of animals exposed to IONP and pesticides is still a field to be investigated.

Beyond IONP, one object of this study is the Glyphosate, that is not found in its pure form. Its use is done from incorporation in products with complex formulations – not always described by manufactures – like Roundup Original®, called Glyphosate-based Herbicide (GBH). Beyond glyphosate, in GBH mixture are surfactants like Polyoxyethylenamide (POEA) that had already proved oxidative stress and genotoxic effects in *Prochilodus lineatus* – exposed to POEA concentrations of 0,15 to 1,5mg/L for 24 hours (Navarro and Martinez, 2014) and genotoxic damage in *Anguilla anguilla* (Guilherme et al., 2012), both studies the POEA showed more significantly toxicity than glyphosate, that supports the relevance of seeking ways to treat contaminated environments by GBH, since this compost was found in relevant concentrations in soil and water (Duke, 2018).

However, the action of isolated GLY, GBH and IONP have already been investigated in acute and long-term exposures, so it is necessary to investigate the ecotoxicological potential of the associations, considering that a genotoxic effect has already been reported in *Poecilia reticulata* co-exposed to 0,3mg/L and 65-130µgGLY/L of IONP+GBH (Trigueiro et al., 2021). Therefore, this work will

investigate the organic effects, and the possible damage recovery of the associations IONP + GBH/GLY and iron ions on the ultrastructural and organic biomarkers of *P. reticulata*,

Thus, it is essential to use important biological models in the aquatic trophic cadence, which are relevant for toxicological assessments (Villarroel et al., 2003). In this context, guppy (*P. reticulata*) is indicated in standards to ecotoxicological studies by American Public Health Association (APHA, 1989) and by Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 1992), as a specie with the possibility to evaluate of several biomarkers expressed by environmental impacts of many contaminants (Almeida et al., 2019; Escarrone et al., 2016; Filho et al., 2013; Qualhato et al., 2018, 2017; Rocha et al., 2015; Santos et al., 2017).

In summary, the hypothesis of this work is that IONP associated to GBH and GLY, as well iron ions – IONP oxidative dissolution product – can cause ultrastructural and histopathological damage in guppies. While an equal post-exposure period in clean water induces the recovery in animal hepatic cells from damage by exposure.

## **2. Material and methods**

### **2.1. IONP synthesis and characterization**

The IONP synthesis process was adapted from the protocols described by Bee et al., 1995, Unal et al., 2010 e Qualhato et al., 2017, from FeCl<sub>2</sub> and FeCl<sub>3</sub> dilution with 1:2 molar relation. The IONP citrate functionalization was made with addition of NaOH (1M) and citric acid (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) (1M). The solution was oxidized in 96°C, sonicated and dialyzed in ultra-filtration cell. The Fe (III) presence in the solution was evaluated in diluted 1:10 and 1:30 samples, submitted to Lambda

1050 spectrophotometer (Perkin Elmer, EUA), with absorption spectrum established between 400nm and 1850nm. The total Fe (III) and Na<sup>+</sup> quantification was performed by atomic absorption spectrometry, measured in 0,25ml of IONP solution diluted in 100ml of HCl, analyzed in a AAnalys 400 spectrometer (PerkinElmer, EUA).

Zeta potential and hydrodynamic size were measured by electrophoretic (ELS) and dynamic (DLS) light scattering, respectively, in a high performance analyzer Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Holanda). The IONP format and diameter were determined from images obtained in an transmission electron microscope JEM-2100 (JEOL, Japan) evaluated in Image J Fiji software (Schindelin et al., 2012). The X-ray diffraction profile was obtained from the lyophilized sample in a D8 Discover diffractometer (Bruker, EUA), with copper anode coupled to monochromator Johansson for  $K\alpha_1$ , operating in 40kV and 40mA. The measurements were made with a one-dimensional detector Lynxeye (Bruker, EUA) with  $2\theta$  of 10° to 80° interval, with 0,01° step and 15 rpm rotation. The result was obtained by an average of 20 measures.

## **2.2. Experimental design**

This study was approved by Ethics Committee on Use of Animals of Federal University of Goiás (Register number 046/2017).

*Poecilia reticulata* (guppy) female adults were collected in pisciculture sector of effluents treatment Dr. Hélio Seixo de Brito of Empresa de Saneamento Básico de Goiás (16°38'08.2"S 49°15'37.4"W, Goiânia, Goiás, Brazil), acclimatized in 300 liters tanks with reconstituted water (ISO 1986) during 30 days. After this period, the animals were transferred to 60 liters aquariums for 15

days. The feeding was done *ad libitum* three times a day, with commercial food for fish and photo-period 12h:12h, keeping the parameters in water: temperature  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH  $7,1 \pm 2$ , ammonia 0-0,25ppm, nitrite 0-0,25ppm and dissolved oxygen 6,0-8,0ppm.

After acclimatation, 63 animals were submitted to 21 days exposure, subdivided in 5 treatment groups, respectively: Control, only reconstituted water; IFe: iron ions 0,3mg/L; IONP+GBH1: 0,3mg Fe L<sup>-1</sup> of IONP + 0,65mg L<sup>-1</sup> of Roundup Original®; IONP+GBH2: 0,3mg Fe.L<sup>-1</sup> of IONP + 1,30mg L<sup>-1</sup> of Roundup Original®; and IONP+GLY: 0,3mg Fe.L<sup>-1</sup> of IONP + 65mg.L<sup>-1</sup> of glyphosate P.A (GLY) (Sigma-Aldrich, Germany). During experimental time, acclimatation parameters were maintained. The hepatic tissue were collected after 7, 14 and 21 exposure days. After exposure time, 63 remaining animals were transferred to only reconstituted water tanks, where new liver samples were made after 7, 14 and 21 post-exposure days.

### **2.3. Histological evaluation and histopathological index**

Ten animal per group were collected in each exposure and post-exposure intervals, of which 7 fish were euthanized to histological analysis. Thus, the animals were dissected in dorsal decubitus position to the extraction of liver and fixed overnight by adapted Karnovsky (glutaraldehyde 2.5%, formaldehyde 4%, 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.2). The organs were dehydrated in alcohol strings under oscillation of 70% to 95% and included in Histo-resin (Leica, USA). Cuts with thickness between 2,5 to 3,0µm, then stained with aqueous Toluidine Blue 1% under hot plate.

For each one of the 7 animals 3 microscope slides were made with 8 cuts, of which 3 cuts were selected randomly. For each cut selected, one photomicrography with 10x magnification was obtained from use of Moticam 2300 camera (Motic, Japan) attached to a Leica LMD microscopy (Leica, Alemanha). On each image, a mesh with 100 equal size squares was traced with Motic Image Plus 2,0 software (Motic, Japan), so that represents 1% of total frequency in the image.

#### **2.4. Biometric analysis and histopathological index**

For all animals, at all times, it was measured total and standard length (SL), and weighted liver ( $W_l$ ) and animal ( $W_a$ ), making possible the biometric analysis by Fulton's condition factor ( $K_{\text{Fulton}}$ ) and hepatossomatic index (HSI). In this way the  $K_{\text{Fulton}}$  was obtained/calculated from the ratio of animal weight and standard length raised to Fulton's constant, as in the formula  $K_{\text{Fulton}}=W_a/SL^3$ . The HSI was calculated obtained by the percentage ratio of the weights of the liver and the animal, according to  $IHS=W_l/W_a100$ .

In order to obtain the histopathological index, one score value was applied, according to the frequency ( $F\%$ ) of each alteration. The Score Value ( $S_v$ ) was multiplied by Importance Factor ( $W$ ), that varies from 1 to 3, being:  $W=1$  not severe and reversible;  $W=2$  moderate severity and reversible if toxicity was neutralized; and  $W=3$  high severity with irreversible and permanent damage with exposure persistence. The alterations were organized in 3 reaction patterns and the index calculated based on Bernet et al., 1999; Bonifacio and Hued, 2019 e Qualhato et al., 2018 with adaptations (*Table 1*). The histopathological index was calculated for each reaction pattern ( $Hi_{Rp}$ ) and resulted in the total histopathological index of liver ( $Hi_{liv}$ ), so that  $Hi_{Rp} = \Sigma(S_v * W)$  and  $Hi_{liv} = \Sigma Hi_{Rp}$ .

Table 1: Reference values for calculating the histopathological index. W = importance factor; Sv = score value.. <sup>a</sup>Bernet et al., 1999; <sup>b</sup>Bonifacio and Hued, 2019; <sup>c</sup>Qualhato et al., 2018; <sup>d</sup>This work.

Reaction patterns (Rp)	Alterations	W	Sv				
			0	2	4	6	8
Circulatory disturbances (Rp1)	Hemorrhage <sup>a,b,c</sup>	1	0-1%	1,1-10%	10,1-20%	20,1-30%	>30%
	Sinusoid dilatation <sup>a,b,c</sup>	1	0-5%	5,1-25%	25,1-50%	50,1-75%	>75%
	Blood congestion <sup>a,b,c</sup>	1	0-5%	5,1-25%	25,1-50%	50,1-75%	>75%
	Exudate <sup>a,c,d</sup>	2	0-1%	1,1-10%	10,1-20%	20,1-30%	>30%
Regressive changes (Rp2)	Necrosis <sup>a,b</sup>	3	0-1%	1,1-10%	10,1-20%	20,1-30%	>30%
	Hydropic degeneration <sup>b</sup>	1	0-5%	5,1-25%	25,1-50%	50,1-75%	>75%
	Fatty metamorphosis <sup>b</sup>	2	0-5%	5,1-25%	25,1-50%	50,1-75%	>75%
Inflammatory response (Rp3)	Melanomacrophage centers <sup>a,c</sup>	2	0-1%	1,1-10%	10,1-20%	20,1-30%	>30%
	Leukocyte infiltration <sup>a,b</sup>	2	0-1%	1,1-10%	10,1-20%	20,1-30%	>30%

## 2.5. Ultrastructural evaluation

Livers of three fish was fixed in glutaraldehyde 2,5% overnight and post-fixed in osmium tetroxide by 2 hours. The samples was dehydrated in crescents concentrations of acetone and pre-stained with uranyl acetate 0,5% diluted in acetone 70% overnight. The samples were infiltrated in resin Embed 812 (EMS, USA), included in polyethylene capsules BEEM (EMS, USA) and polymerized in 60°C by 48 hours. Cuts with 70nm thickness were obtained with a ultramicrotome Ultracut UCT (Leica, Germany), collected with 300 mesh cooper grids. The films was stained with acetic solution of saturated uranyl acetate and lead citrate 4%. The images obtained were analyzed with the Image J-Fiji software (Schindelin et al., 2012) to take measurements of the diameter of the lipid droplets in the cells.

## 2.6. Statistical argumentation

The evaluation of distribution was performed by analyze of QQ-plot normality test, followed by homogeneity of variances analyze by ANOVA Two-way test, afterword was made multiple comparisons by Tukey test. The line of tendencies was obtained from perform of linear regression with data of

histopathological index. All tests and graphics were made using software GraphPad Prism version 8.3 with 95% ( $p < 0,05$ ) of confidence interval.

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Nanoparticles characterization**

The iron concentration in IONP determined by atomic absorption spectroscopy was 13,49g per liter of solution, while the sodium concentration was 0,564g per liter of solution. Thus, the sodium remotion by filtrating and washing goal had been achieved. The TEM images indicates limpid and rounded IONP shape (Fig. 1A and B), with  $2.90\text{nm} \pm 0.84\text{nm}$  individual diameter (Fig. 1C). The nanoparticles presented  $66.6\text{r.nm} \pm 0.17\text{r.nm}$  hydrodynamic size (Fig. 1D) and  $-55.4\text{mV} \pm 7.4\text{mV}$  zeta potential in ultrapure water, that indicate the nanoparticles suspension in the solution (Nurdin et al., 2014, 2012), keeping the interactions

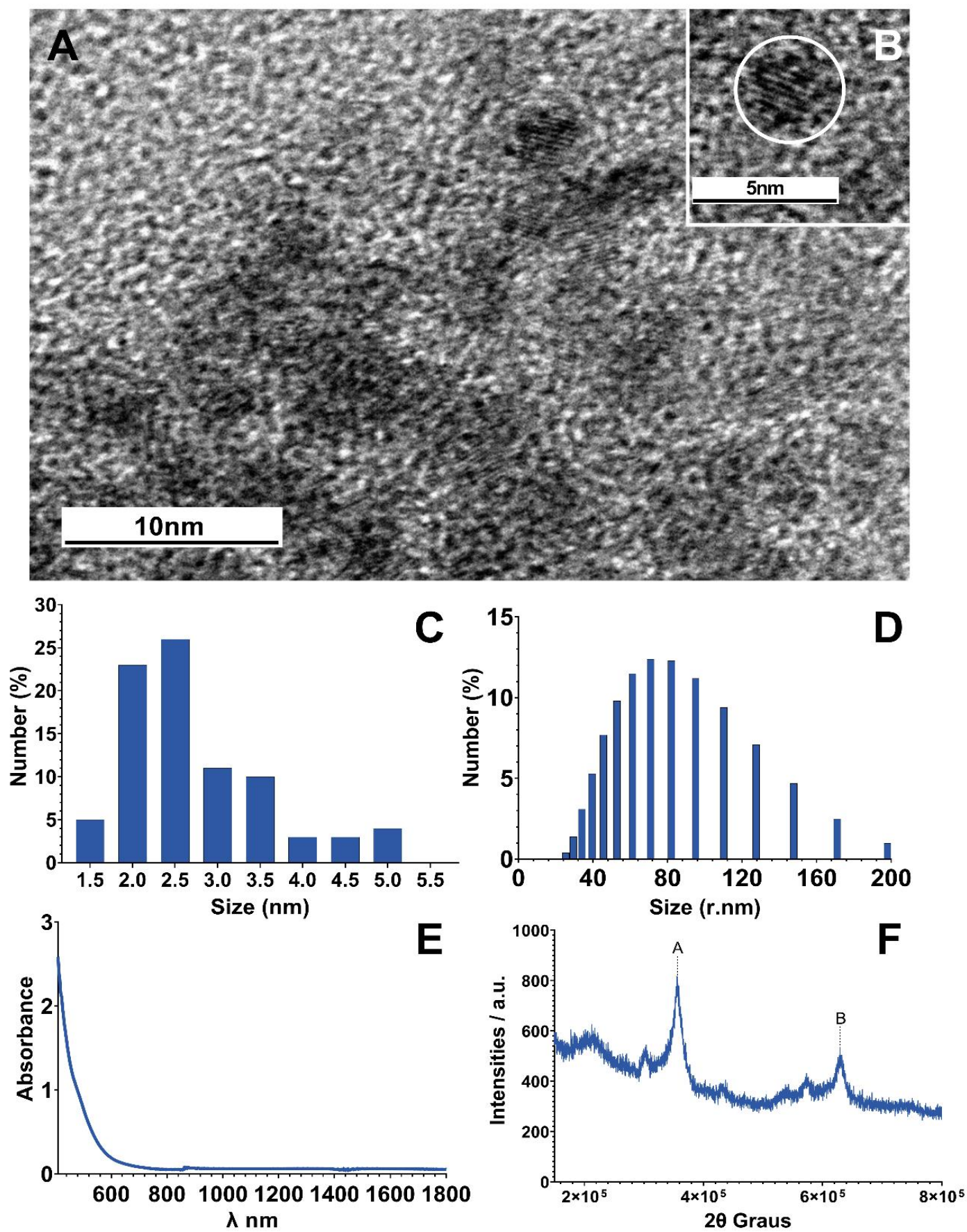


Figure 1: Characterization graphs of IONPs. (A) IONPs transmission electron micrograph; (B) Isolated IONP; (C) Histogram of frequency of individual size distribution; (D) Distribution of hydrodynamic diameter; (E) Absorption of the UV-Vis spectrum; (F) X-ray diffraction IONPs profile.

data denotes absence of spikes to Fe (II) ions and absorbance near to specific wave-length to Fe (III), characterizing IONP in Maghemite phase (Fig. 1E). The X-ray diffraction results shows cubic spinel phase with spikes in plans 311 and 440 characterizing Maghemite particles according to PDF number 39-1346 of International Center of Diffraction (Fig. 1F)

### **3.2. Histological analysis and Histopathological index (Hi)**

The animals of control group presented normal and preserved hepatocytes, nucleus without changes, homogeneous cytoplasm and polyhedric shape (Fig. 2A). When compared to control, the treated groups showed vasodilatations, exudates, fat accumulation, necrosis and melanomacrophage sites, what led us to analyze circulatory disturbances (Rp1) (Fig. 4A, E), regressive alterations (Rp2) (Fig. 4B, F) and inflammatory response (Rp3) (Fig. 4C, G).

The evaluations of histopathological index for circulatory disturbances ( $Hi_{Rp1}$ ) are dependent from relation between time and treatment ( $F=2,891$ ;  $DF=20$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. 4A), in this way, fish exposed to IFe shows, in average, 11 times ( $p<0,001$ ) more circulatory disturbances than the non-exposed group after 14 exposure days, reaching 18 times ( $p<0,001$ ) bigger than the control group at the end of exposure time, thus indicating that IFe treatment has a toxic effect on circulatory disturbances .

When comparing the data from this study with the literature, it was verified that damage is near to the found in liver and gills of *Astyanax Lütken*, exposed from water of Doce river contaminated by heavy metals (Macêdo et al., 2020), and *Oreochromis niloticus* exposed to heavy metals, including iron (Rehman et al.,

2021). So, either in gills or in liver, the increase of circulatory disturbance in animals exposed to IFe is possibly related to increased availability of iron in organism, resulting on increase of blood circulation to promote capture, transformation an detoxification of excessive ions, causing congestions and hemorrhage like collateral damage (Fig. 2B-D).

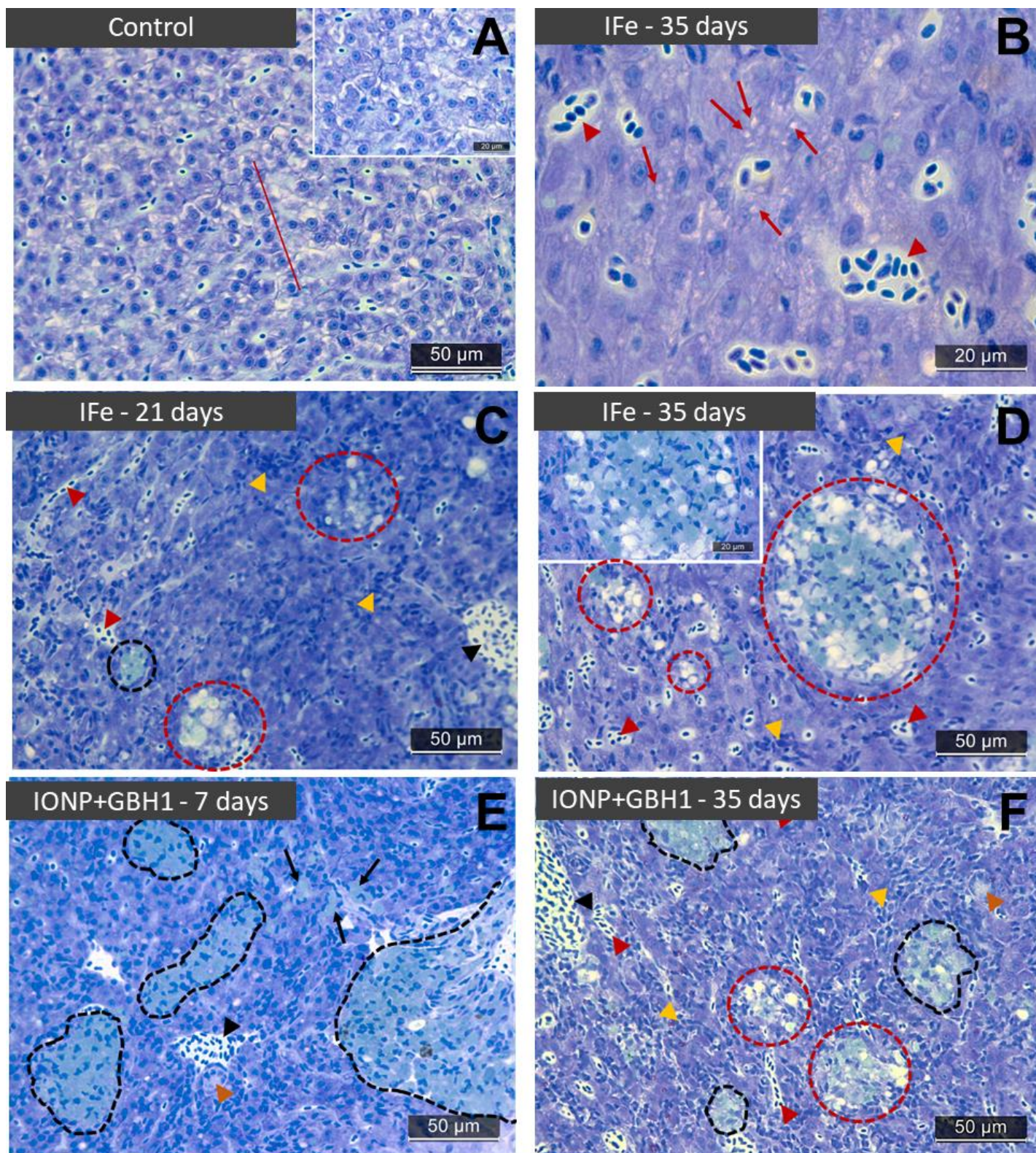
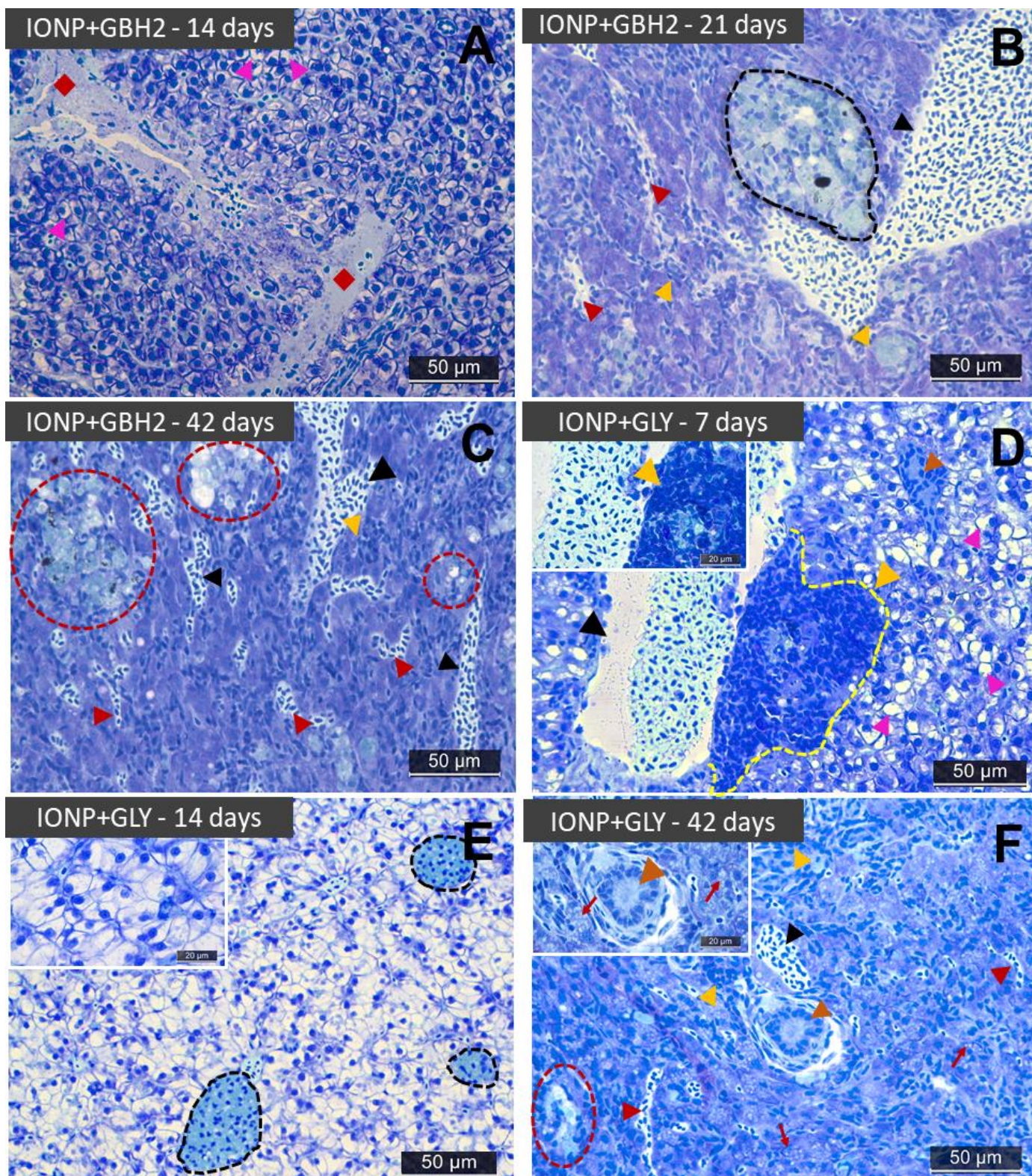


Figure 2: Histological section of liver of *Poecilia reticulata* from Control group and groups IFe and IONP+GBH1. (A) Control group with regular hepatocytes and arranged in cords; (B) IFe treatment, presenting the fatty metamorphosis in hepatocytes, an indicative of oxidative stress and lipid peroxidation; (C and D) IFe treatment, showing necrotic areas with action of melanomacrophages indicating a process of detoxification of compromised tissue; (E) IONPs + GBH1 treatment with high inflammatory response, including melanomacrophage infiltration throughout the tissue, with progression to necrotic areas over time; (F) IONPs + GBH1 treatment with leukocyte infiltration throughout the tissue. Red arrowhead: dilated sinusoid; Yellow arrowhead: Leukocyte infiltration; Black arrowhead: Hyperemia / congestion of vessels; Orange arrowhead: bile duct; Red arrowhead: dilated sinusoid; Yellow arrowhead: Leukocyte infiltration; Black arrowhead: Hyperemia / congestion of vessels; Orange arrowhead: bile duct; Dotted black contour: melanomacrophages sites; Dotted red circle: necrotic zones



**Figure 3:** Histological section of liver of *Poecilia reticulata* from IONP+GBH2 and IONP+GLY. (A) IONP+GBH2 treatment showing hydropic degeneration, result of the accumulation of liquid, indicative of cell death processes, exudate resulting from the leakage of liquids in the inflammation process; (B) IONP+GBH2 treatment with melanomacrophage sites dispersed and associated with the vessel, with leukocyte infiltration throughout the tissue; (C) IONPs + GBH2 treatment indicating necrotic zones with the presence of melanomacrophages; (D) IONPs + GLY showing large leukocyte infiltrate close to an over-dilated vessel, which confirms the relationship between circulatory disorders and the inflammatory response; (E) IONPs + GLY treatment with hydropic degeneration and dispersed melanomacrophage sites; (F) IONPs + GLY treatment presenting steatosis with high extension in the tissue and melanomacrophages associated with hepatopancreas and bile ducts Red arrowhead: dilated sinusoid; Yellow arrowhead: Leukocyte infiltration; Black arrowhead: Hyperemia / congestion of vessels; Orange arrowhead: bile duct; Red arrowhead: dilated sinusoid; Yellow arrowhead: Leukocyte infiltration; Black arrowhead: Hyperemia / congestion of vessels; Orange arrowhead: bile duct; Dotted black contour: melanomacrophages sites; Dotted red circle: necrotic zones; Red rhombuses: exudate.

Our expectation during the post-exposure period was that there would be a reduction in circulatory changes, since the Fe concentration in the liver tissue would be reduced in relation to the exposure, which occurred after 14 days of post-exposure, when statistical relevance is not seen compared to non-exposed group (Fig. 2A).

Circulatory disorders were observed in IONP + GBH 1 and 2 (Fig. 2E,F and Fig. 4A-C), increased 11 and 13 times ( $p < 0,001$ ), respectively, in relation to the control group after 21 days (Figure 4A). Similar circulatory damage was also observed in gills and liver of *Jenynsia multidentata* exposed by short and long duration (Hued et al., 2012; Sánchez et al., 2019) and in liver of *Prochilodus lineatus* exposed to 7,5 and 10mg/L of GBH in 96 hours (Langiano and Martinez, 2008). However, by associating GBH and IONP, our results indicated that GBH remained active, promoting concentration-dependent circulatory disorders.

The recovery of circulatory damage in animals exposed to GBH had relation with the concentrations, so that the lower GBH concentration (GBH1) indicates recovery in 14 post-exposure days, while the higher concentration (GBH2) had recovery in 21 post-exposure days. These data suggests that GBH concentration increase causes the increase in detoxification response time, as the circulatory disturbance – that enable the detoxification – persisted longer in GBH2.

Analyzes indicate that the potential for toxicity decreases when IONP adsorb GBH, but GBH remains active and has greater toxicity than pure glyphosate (GLY) (Peillex and Pelletier, 2020). Thus, our data shows the IONP+GLY 8 times ( $p = 0,013$ ) more circulatory damage than the control from 14 exposure days, getting 11 times ( $p < 0,001$ ) bigger after 21 days (Fig. 4A).

Regarding to post-exposure period, the treated animals recovered in 14 post-exposure days. On the other hand, was observed that animals exposed to IONP + GLY (Fig. 3E,F) showed less circulatory disorders compared to those treated with GBH1 and GBH2, in the same time interval (Fig. 4A).

Auwal et al., 2019 and Ko et al., 2016 described that, in general, circulatory damage is associated with a generalized response parallel to inflammation, as they are related to the action of vasoactive amines and angiotensin-converting and inhibiting enzymes, resulting in vasodilatation enabling the inflammatory response, getting consequent damages like hemorrhage, congestion and exudates.

We also detected these changes, when evaluating the liver tissue of Guppy submitted to the treatments IFe, IONP + GBH 1 and 2 and IONP + GLY, therefore the treatments carried out in the present study, are promoters of the inflammatory process.

Beyond the circulatory disturbs, this study investigate the histopathological index from regressive alterations ( $H_{iRp2}$ ) (Fig. 4B) in guppies' liver, which in this study are time-treatment dependents ( $F=1,946$ ;  $DF=20$ ;  $p=0,012$ ), considering that they alter cellular functionality and allow us to presume that they promote from slight changes to more extensive damage such as necrosis, which leads to functional loss of liver zones.

Regarding the regressive changes in liver tissue, the presence of steatosis was detected in fish exposed to IFe, in addition to necrosis from 14 exposure days (Fig. 2B-D), which lead to a strong impact in histopathological index calculation, justified by high importance factor ( $W=3$ ) and score value associated

to lower frequencies. These tissue damage was also detected in fish *Labeo rohita* exposed by short period to iron ions, with detection of high lipidic peroxidation and antioxidant activity (Singh et al., 2019), and in liver of *Hoplias intermedius* and *Hypostomus affinis*, with high levels of accumulated iron from Fundão dam contaminated water in Brazil (Weber et al., 2020), thus besides steatosis, regressive damages induces the cell death, from action of apoptosis mechanisms to cell renewal, or even necrosis, as a result of the inflammatory process.

When analyzed, regressive changes showed, on average, 6 times more damage during 21 days ( $p < 0,001$ ) of exposure, in animals treated with IONP + GBH1 and IONP + GBH2 (Fig. 4E,F and Fig. 3A-C). At the same time, fish exposed to IONP+GLY (Fig. 3D-F) showed the same amount of alterations than groups treated with GBH, which is confirmed by no statistical difference between the  $H_{iRp2}$  of the groups IONP+GBH1, IONP+GBH2 and IONP+GLY (Fig. 4B). Allowing to suppose that adsorption to IONP attenuates the toxicity in regressive responses of GBH, since previous studies have already reported higher toxicity of GBH compared to GLY in aquatic organisms (Antunes et al., 2017; Bach et al., 2018; Moraes et al., 2020).

According to Samanta et al. (2019), the compensatory decline of enzymes such as lipases, amylases and proteases is associated with the formation of steatosis sites, observed in *Anabas testudineus* and *Heteropneustes fossilis*, exposed to Excel Mera 71 – other glyphosate-based herbicide. In view of these data, it is possible to assume that in guppy the regressive changes, when they were exposed to IFE, IONP+GBH and IONP+GLY, may also be related to a compensatory mechanism such as a plasticity capacity of *P. reticulata* in response to environments contaminated with GBH and GLY.

Still considering the fatty metamorphosis, studies carried out in *Oreochromis niloticus* exposed to 4 to 16mg/L of glyphosate (Zheng et al., 2021), in *Piaractus mesopotamicus* exposed to 3 to 4,5mg/L of glyphosate (Shiogiri et al., 2012) and in *Poecilia reticulata* exposed to 0,3mg/L of IONP (Qualhato et al., 2018), showed that the hepatic accumulation of lipids may indicate the formation of an inflammatory process in response to oxidative stress, resulting from lipid peroxidation.

Moreover, other reaction pattern observed were the inflammatory responses (Rp3) – resulting from the time-treatment relationship ( $F=3,979$ ;  $DF=20$ ;  $p<0,0001$ ) – are attached to changes in the composition of the  $Hi_{Rp3}$  (Fig. 4C), triggering reactions on hepatic tissue, such as an increase in melanomacrophage sites and leukocyte infiltrations, frequently identified in all treated groups.

In this sense, the data from this study showed that in all exposed groups, for an inflammatory response to be established by the organism, it requires as much time as the circulatory responses and the regressive damage. However, contrary to these two reaction patterns, the inflammatory responses persist even during the post-exposure period, therefore, they must require the organism of fish to be more active for a longer time in order to have an organic restoration.

In this same perspective, the post-exposure time was not sufficient for the recovery of the inflammatory response in the animals during the exposure to IFe, because there is 11 times ( $p<0.001$ ) more damage than in the control group in 21 days of exposure and although there is a decrease during the post-exposure, the damage remains with difference of 12 points ( $p<0.001$ ) in relation to the

control group 21 days of post-exposure (Fig. 4C). These results are corroborated by the studies of Cottet et al. (2015), in which iron accumulation was identified in fish species *Poropuntius carinatus*, *Hypsibarbus vernayi*, *Hampala macrolepidota* and *Cyclocheilichthys repasson*, from a reservoir in Lao country, as well as Fahmi et al. (2019) who identified melanomacrophages as an inflammatory response in fish.

With regard to inflammatory responses in animals exposed to associations of IONP and GBH, 10-fold ( $p < 0.001$ ) larger responses were seen in IONP+GBH1 (Fig. 3E,F) than the control group after 21 days of exposure, reaching 7-fold ( $p < 0.001$ ) greater than in guppies treated with IONP+GBH2 (Fig. 2C and Fig. 3C). The studies by Li et al. (2016) with liver of *Carassius auratus* exposed to GBH during 96h, also evidenced complex inflammatory responses involving leukocyte infiltrations on hepatic tissue.

Concerning the inflammatory behavior in animals treated with associations of IONP with GBH, the persistence of the inflammatory response was noted in the treatment IONP+GBH1 until 7 post-exposure days, while in IONP+GBH2 the response starts to decrease only at 14 days post-exposure (Fig. 3C), suggesting that GBH is responsible for delaying the inflammatory response by distorting the proinflammatory activity. Richard et al. (2014), when studying *Dicentrarchus labrax* exposed to 647mg/l of GBH for 96 hours, showed impairment of the immune system by distortion of pro-inflammatory cytokine and interleukin activity, which leads us to the assumption that GBH activity promotes inhibition of the inflammatory process.

Besides to inflammatory behavior of GBH, responses are also described in fish species like *Oreochromis niloticus*, *Clarias gariepinus*, *Danio rerio* and *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate (Antunes et al., 2017; Jiraungkoorskul et al., 2003; Karami-Mohajeri et al., 2017; Nwonumara and Okogwu, 2020), associated to increase of pro-inflammatory cytokines, already registered in *Cyprinus carpio* exposed to 52,08 and 104,15mg/l of GLY during 168 hours (Ma and Li, 2015).

Regarding the association of IONP+GLY, this study showed that the inflammatory responses were 16 times ( $p=0.028$ ) greater than the control group starting at 14 days of exposure, without full recovery even after 21 days post-exposure (Fig. 3G). In general, the trend lines indicated that all groups remained without full recovery of the inflammatory response by the end of 21 days post-exposure, so post-exposure for the same time period as exposure was not sufficient to counteract the inflammatory response (Fig. 3G).

To get an integrated view of the damage assessment, the total histopathological index (Hiliv) was made, in this study, based on the sum of the individual reaction patterns with a dependency relationship between time and treatment ( $F=2,055$ ;  $DF=20$ ;  $p=0,007$ ) (Fig. 3D).

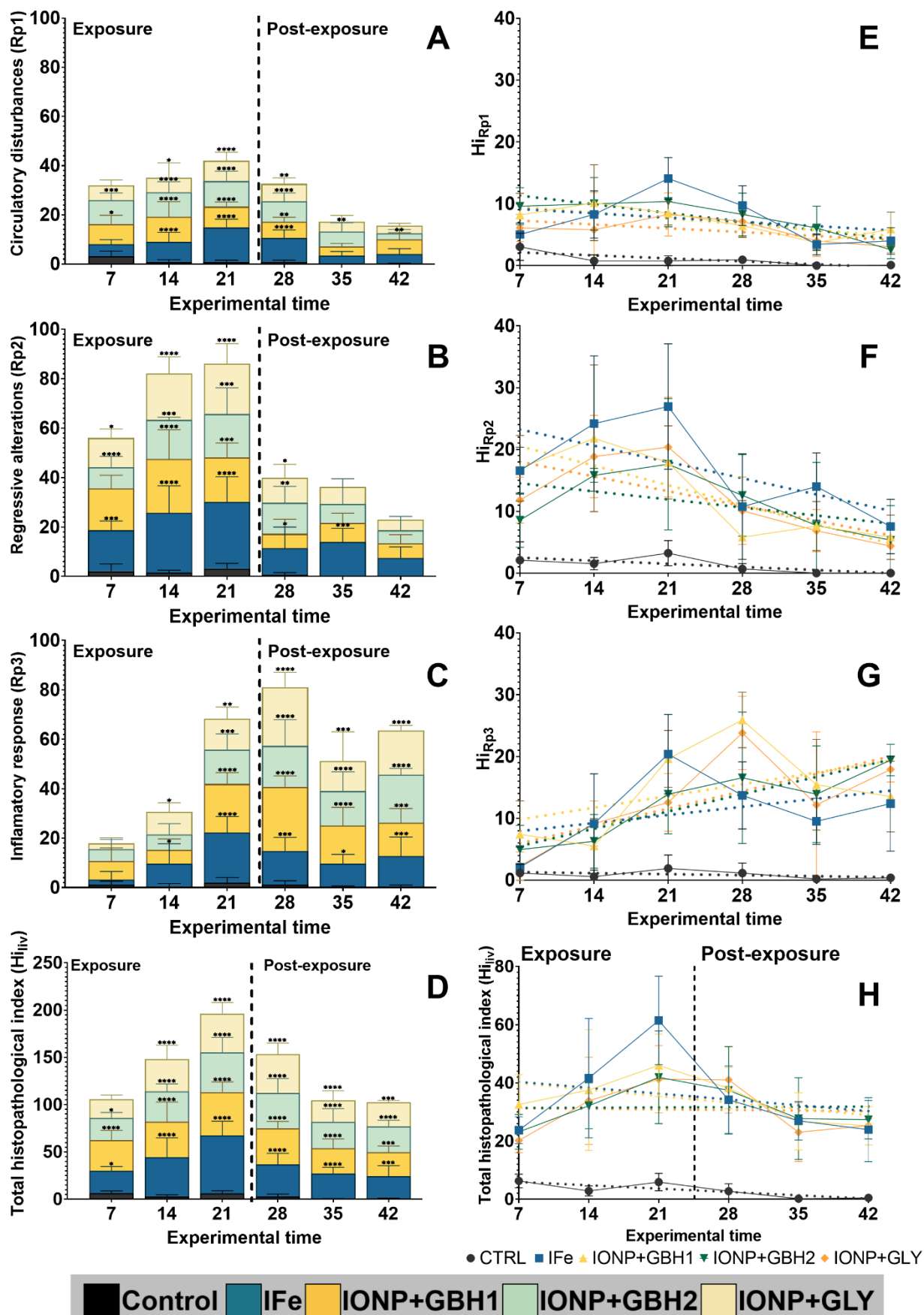


Figure 4: Stacked graph and linear regression of histopathological indices (Hi). (A-E) Histopathological index of circulatory disorders ( $H_{iRp1}$ ); (B-F) Histopathological index of regressive changes ( $H_{iRp2}$ ); (C-G) Histopathological index for inflammatory response ( $H_{iRp3}$ ); (D-H) Total histopathological index of the liver ( $H_{iiv}$ ).

the control in 21 days of exposure, organic responses similar to these were described in *Salminus franciscanus* in the São Francisco River in Brazil (Savassi et al., 2020) and in *Oryzias latipes* exposed to 5 and 20mg/L to nanoscale zerovalent iron and iron oxide nanoparticles (Yang et al., 2019). As for the post-exposure period, the present study indicated tendency for damage recovery, since there was an average decrease of 37.53 ( $p < 0.01$ ) points in the  $H_{liv}$  after 21 days of post-exposure (Fig. 3H). In this way, these results are probably linked to the iron elimination profile of the fish, based on the tendency to not accumulate iron in the tissues, thus, it is possible to assumed that more time would be needed for full recovery of the animals exposed to IFe.

Tissues are biomarkers frequently reported to identify changes promoted by GBH, as already seen in fish species such as *Colossoma macropomum* (Silva et al., 2019), *Piractus mesopotamicus* (Shiogiri et al., 2012) and *Prochilodus lineatus* (Langiano and Martinez, 2008). Nevertheless, the present study, in addition to identifying histopathological alterations, performed an analysis of  $H_{liv}$  in *P. reticulata* exposed to the association of IONP and GBH, detecting in IONP+GBH1 an 8-fold increase ( $p < 0.001$ ) in relation to the control group, during 21 days of exposure, while IONP+GBH2 shows the  $H_{liv}$  7 times ( $p < 0,001$ ) bigger than control at the end of exposure time.

During post-exposure,  $H_{liv}$  in IONP+GBH1 decreased 20.76 ( $p < 0.001$ ) points and IONP+GBH2 decreased 14.57 ( $p < 0.001$ ) points in  $H_{liv}$ , both compared to control group in 21 (Fig. 4D), although there was no full recovery of the guppies exposed to the associations with GBH, this behavior corroborates the trend line of IONP+GBH1 and IONP+GBH2, indicating the possibility of decreasing  $H_{liv}$  in

the post-exposure period (Fig. 4F) suggesting that post-exposure period longer than 21 days will enable the full recovery of animal health.

Regarding the association of IONP with GLY, it was observed that the tissue damage behavior expressed in  $H_{liv}$  in animals treated with IONP+GLY was 7 times ( $p < 0.001$ ) higher than the control group after 21 days of exposure (Fig. 3D). Even in the absence of nanoparticles, previously studies considering only glyphosate in *Leptodactylus latrans* exposed for 96 hours to concentrations from 3 to 300mg/l of GLY (Bach et al., 2018), *Anabas testudineus* exposed for 45 days to concentrations of 2.6 to 7.8 mg/L of GLY (Mohapatra et al., 2021) and *Poecilia reticulata* exposed for 96 hours to 35mg/l of GLY (Antunes et al., 2017), confirm the damaging action of glyphosate on fish liver tissue.

However, despite the damage to liver tissue suffered during exposure, in this study the guppies treated with IONP+GBH submitted to post-exposure, although not fully recovered, had a reduction of 11 points ( $p < 0.005$ ) in  $H_{liv}$ , which confirms the trend line and allows us to assume that times longer than 21 days post-exposure can lead to full recovery of liver function in animals (Fig. 4H).

In general, even though the inflammatory responses include changes with relevance factor 2 ( $W=2$ ) and score value associated with lower frequencies, it should be considered that the circulatory disturbances and regressive changes were recovered after post-exposure, so that the trend line (Fig. 4H) for  $H_{Rp1}$ ,  $H_{Rp2}$  and  $H_{Rp3}$  indicate a positive organ recovery and permit to assume that in periods longer than 21 days post-exposure, there may be full recovery of histopathological damage in all treatments

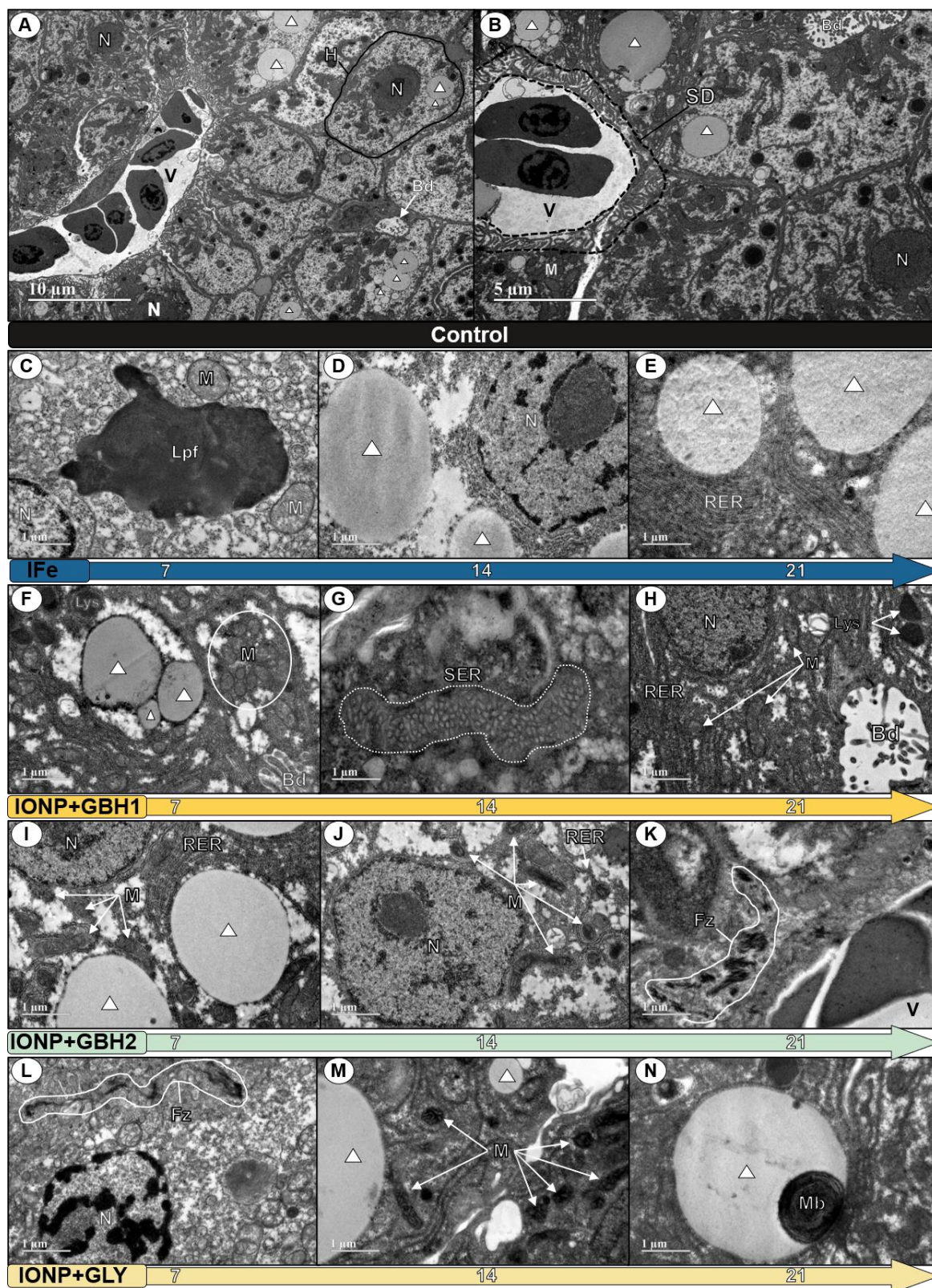
### 3.3. Ultrastructural analysis

The liver tissue is a complex of cells that performs many functions related to vital processes, among them detoxification. This activity involves the hepatocytes that were the ultrastructural cellular biomarkers evaluated in this study. Thus, it is necessary to consider that these cells have organelles linked to the process of lipid synthesis and degradation, as well as the deposition of lipid droplets in the cytoplasm of the cell, associating to this the presence of organelles such as those of the endomembrane system and the nucleus, to be considered in its normal aspect in the control group (Fig. 5A1 and A2), such as the possibility of activation to respond efficiently in detoxification in the presence of xenobiotics.

In this way, the hepatocytes of exposed groups in the present study showed alterations at various levels of complexity and the analysis complemented the histopathological observations already described in Figures 2 and 3. Thus, the presence of necrotic zones was noted in all periods of exposure to IFe (Fig. 5B1, B2 and B3), so that, from the ultrastructural point of view, these cells showed cytoplasmic degeneration, disorganized nuclei, and increased and irregular lysosomes. In addition to these changes, lipofuscin was also observed in macrophages of fish exposed to IFe (Fig. 5B1). This pigment is associated with degeneration of organelles and lysosomal digestive enzymes, such as were described in *Danio rerio* by Gandahi et al. (2020), in this case, the action of melanomacrophages was on the process of necrosis in the extracellular matrix, similar to what was observed in the present study

It was also observed that the extracellular matrix was altered in animals treated with IONP+GBH (Fig. 5C1-D3), confirming the histopathological analyses, with possibility to denote increasing perisinusoidal interface – Disse

space, where happens vessel communications with cells, that signalize high demand by circulatory changes in inflammatory process. Therefore, the inflammatory response is mediated by cellular way, since there is an increase in metabolic activity diagnosed by endoplasmic reticulum (ER) abundance and mitochondrial proliferation (Fig. 5D2) when compared to the control group.



**Figure 5** Ultrastructure of hepatocytes of *Poecilia reticulata*. (A and B) Unexposed group, intact hepatocytes, preserved Disse space, small and dispersed lipid droplets; (C, D, E) Group exposed to IFe: (C) Lipofuscin zones; (D) Large lipid droplets associated with RER; (E) Large lipid droplets associated with the disorganized endoplasmic reticulum. (F, G, H) Group exposed to IONP + GBH1: (F) Lipid droplets associated to disorganized RER with proliferation and grouping of mitochondria with intense activity of lysosomes; (G) Smooth endoplasmic reticulum; (H) Disorganized endoplasmic reticulum associated to mitochondria near biliary duct. (I, J, K) Group exposed to IONP + GBH2: (I) Lipids droplets closely linked with disorganized RER and mitochondria; (J) Proliferation of mitochondria and elongated dysmorphic mitochondria with high electron dense matrix; (K) Fibrose zones near to blood vessel; (L, M, N) Group exposed to IONP + GLY: (L) Deposition of fibrose in a zone with melanomacrophage; (M) Mitochondria with high activity in mitochondrial matrix associated with disorganized RER; (N) Myeloid body inside a lipid droplet. N=nucleus; V=blood vessel, H=regular hepatocyte, Bd=biliary duct, SD=space of Disse, M=mitochondria, Lpf=lipofuscin, RER=rough endoplasmic reticulum, SER=smooth endoplasmic reticulum, Lys=lysosome, Fz=fibrose zone, Mb=myeloid body.

Previously studies with *Cnesterodon decemmaculatus* exposed by 42 days to GBH (0,2 and 2mg/l) and chlorpyrifos (0,84 and 8,4nl/l) (Bonifacio and Hued, 2019) and in both species *Anabas testudineus* and *Heteropneustes fossilis* exposed by 16,9mgGLY/l to Excel Mera 71 during 30 days (Samanta et al., 2019), corroborate the data previously cited, about the proliferation of ER and mitochondrial abundance.

Therefore, the observations of this study indicate the possibility that there is high transport of proteins in the ER membrane, such as enzymes of the cytochrome P450 family, involved in the reduction of molecular oxygen and the consequent formation of reactive oxygen species (ROS) in the electron transport chain of mitochondria. These data are corroborated by Yoboue et al. (2018), when he describes that protein synthesis efforts are potentially related to detoxification, signaling, and cellular repair processes and by Hrycay and Bandiera (2015), who report cytochrome P450 enzymes as key elements in catalyzing the oxygenation of organic substrates, with the consequent formation of ROS.

In parallel, the treatment with IONP+GLY (Fig. 5E1, E2 and E3), showed high energy demand, since morphological changes of mitochondria are noted, as well as the high electrondensity of the mitochondrial matrix (Fig. 5E3). So that it is possible to suppose that the observed changes are due to the high concentration of proteins in the mitochondrial matrix, possibly because of the intense synthesis of mitochondrial rRNA and tRNA, in addition to essential proteins such as subunits of multimeric complexes involved in electron transport and - mainly - ATP synthesis. Thus, besides the high concentration of native mitochondrial proteins, the high electrondensity of mitochondria observed in this

study corroborates the mechanism described by Schatz (1996) and Pfanner et al. (1997), regarding the importance of proteins from the cytosol to the mitochondrial matrix, such as RNA and DNA polymerases, besides Hsc 70 chaperones and processing proteases involved in this process.

Ultrastructural analyses of hepatocytes, also indicated the presence of large amounts of lipid droplets associated with the ER in all groups exposed to the test substances IONP+GLY, IONP+GBH 1 and 2, as well as IFe (Fig. 5B2, B3, C1, D1, D3, E1). The process of microvesicular steatosis was well characterized and in fact is a physiological response to potentially toxic environments (Bonifacio and Hued, 2019; Hued et al., 2012; Karami-Mohajeri et al., 2017), showing uncontrolled cholesterol production and storage, which has its excess deposited in lipid droplets in the cytoplasm. Therefore, a semi-quantitative evaluation of lipid accumulation in hepatocytes, shows that exposure time lead to increasing in quantity and area of lipid droplets. ( $F=15,89$ ;  $DF=2$ ;  $p<0,0001$ ).

The analyses demonstrates that IONP+GLY group, in 7 exposure days had droplets with diameter, in average,  $10\mu\text{m}$  ( $p=0,0044$ ) bigger than non-treated group, while IONP+GBH2 presented in 14 days, an average of  $14\mu\text{m}$  ( $p<0,0001$ ) bigger than control in the same period. Thus, in 21 exposure days, all treated groups demonstrated diameters larger and statically relevant ( $p<0,05$ ) in relation to control group, so that the proliferation and droplets accumulation confirms the found on histopathological evaluation of regressive damage.

The data from this study are consistent with the response in *Oncorhynchus mykiss* exposed to water contaminated with oil ( $62\mu\text{g/l}$ ) and chlorpyrifos ( $20\mu\text{g/l}$ ) (Anna et al., 2021) and metabolic disorders in transgenic *Danio rerio* with

overexpression of activation transcription factor 4 (Yeh et al., 2017), showing an excess in fatty acid and cholesterol synthesis, from the distortion of the activity of sterol regulatory base-binding enzymes.

Considering the observations and data from this study, it is important to highlight that this analysis performed for *Poecilia reticulata*, is an unusual approach that demonstrates that toxic substances can lead to an increase in lipid droplets, showing a proposal with the possibility of use in future studies.

### 3.4. Biometric analysis

According to Mozsár et al. (2015), the maintenance of Fulton's condition factor ( $K_{\text{Fulton}}$ ) and of the hepatosomatic index (HSI) indicate quality of life and conservation of animal welfare, which is in agreement with the data obtained here, in addition to corroborating with the plasticity capacity of guppy, already seen in animals subjected to endocrine stress (Houslay et al., 2019), staying alive, including in

contaminated environments (Rolshausen et al., 2015). Thus, the *Poecilia*

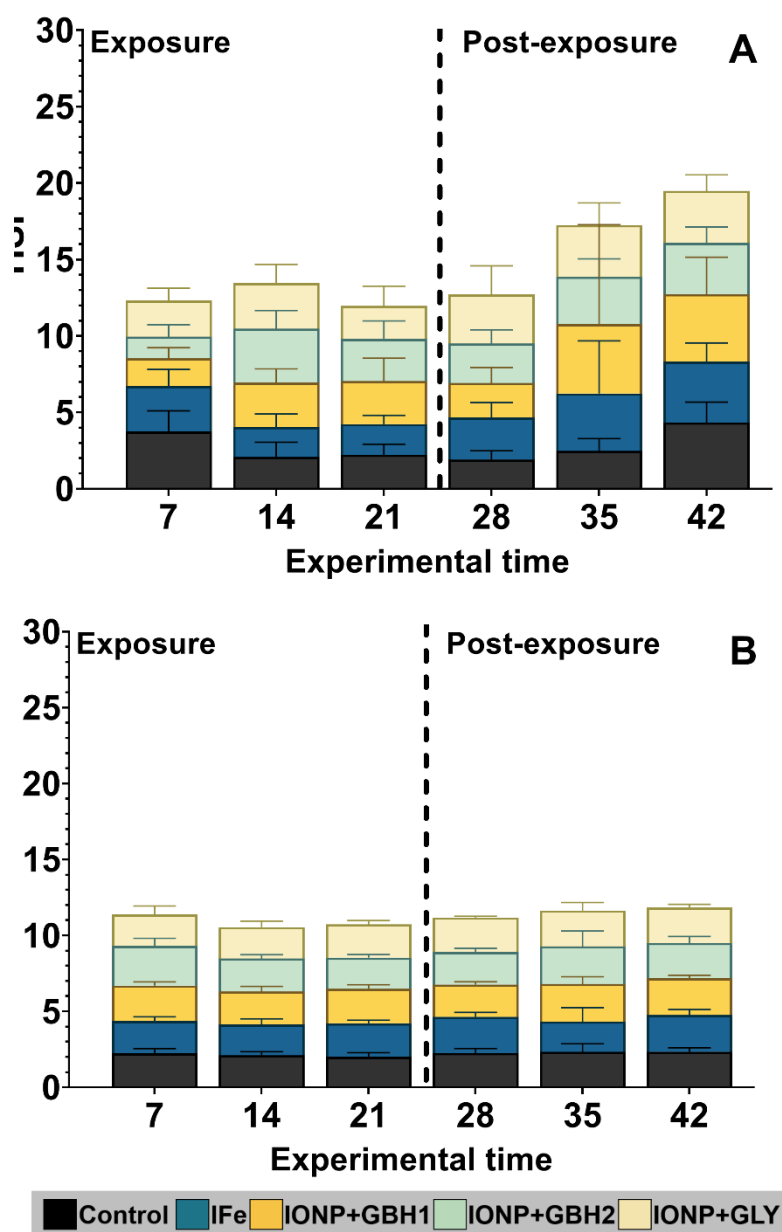


Figure 6: Stacked graphic of biometric analyses. (A) Hepatosomatic index (HSI); (B) Fulton's condition factor ( $K_{\text{Fulton}}$ ).

*reticulata* model used in the present work is a suitable biomonitor, since it allows responsive assessments to interactions with contaminants (Fig. 6).

#### **4. Conclusion**

This study showed that the exposure of *Poecilia reticulata* to iron ions and nanoparticles associated with GBH or GLY causes toxicity in the liver tissue, generating tissue and ultrastructural responses. In this sense, inflammatory responses are the most striking and persistent cause of damage, so that IONP + GBH is concentration dependent and has greater toxicity than IONP + GLY. On the other hand, there is a tendency for animals to recover in all groups in periods greater than 21 days after exposure, which is complemented by the adaptive plasticity of *Poecilia reticulata*, since the experimental period does not affect fish growth. Thus, this study contributes to the knowledge of the behavior of IONP - as an environmental alternative, and its associations, regarding the toxicity in aquatic organisms, increasing the possibilities of use based on the awareness of their respective impacts.

#### **5. Declaration of Competing Interest**

The authors had not declared competing interests

#### **6. Author contributions**

**João Marcos de Lima Faria:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review and editing, Visualization. **Lucas Nunes Guimarães:** Conceptualization, Methodology, Investigation **Victória Costa da Silva:** Conceptualization, Methodology, Investigation **Emília Celma de Oliveira Lima:** Investigation, Methodology, Resources **Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais:** Conceptualization,

Resources, Writing – review and editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition

## 7. Acknowledgments

This study was funded by FAPEG-PPSUS (Edital 04/17 – Proj. 201710267001261 – FAPEG/SES-GO/CNPq/MS-DECIT/2017 – PPSUS-GO) and from FAPEG-FAPESP (Edital 04/19 – Proj. 2019011000085). Our thanks to CAPES by students scholarships. The authors also acknowledge the CRTI, LabMic, Central Analítica IQ-UFG and LabCOMN for their collaboration in the synthesis and characterization of maghemite and electron microscopy facilities, and Laboratório de Pesquisa em Morfologia Humana e Animal for their collaboration in capture and processing images.

## 8. Bibliography

- Almeida, S. dos S., Rocha, T.L., Qualhato, G., Oliveira, L. de A.R., Amaral, C.L. do, Conceição, E.C. da, Sabóia-Morais, S.M.T. de, Bailão, E.F.L.C., 2019. Acute exposure to environmentally relevant concentrations of benzophenone-3 induced genotoxicity in *Poecilia reticulata*. *Aquat. Toxicol.* 216, 105293. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105293>
- Anna, J.S., Castro, J.M., Darraz, L.A., Elías, F.D., Cárcamo, J.G., Luquet, C.M., 2021. Exposure to hydrocarbons and chlorpyrifos alters the expression of nuclear receptors and antioxidant, detoxifying, and immune response proteins in the liver of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111394>
- Antunes, A.M., Rocha, T.L., Pires, F.S., Freitas, M.A., Leite, V.R.M.C., Arana, S., Moreira, P.C., Sabóia-Morais, S.M.T., 2017. Gender-specific histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to

- glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid. *J. Appl. Toxicol.* 37, 1098–1107. <https://doi.org/10.1002/jat.3461>
- Assis, M.B. da S., Werneck, I.H.S.R., Moraes, G.N., Semaan, F.S., Pacheco Pereira, R., 2019. Citrate-capped iron oxide nanoparticles: ultrasound-assisted synthesis, structure and thermal properties. *Mater. Res. Express* 6, 045064. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aaff2a>
- Auwal, S.M., Abidin, N.Z., Zarei, M., Tan, C.P., Saari, N., 2019. Identification, structure-activity relationship and in silico molecular docking analyses of five novel angiotensin I-converting enzyme (ACE)inhibitory peptides from stone fish (*Actinopyga lecanora*) hydrolysates. *PLoS One* 14, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197644>
- Bach, N.C., Marino, D.J.G., Natale, G.S., Somoza, G.M., 2018. Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere* 202, 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.110>
- Bee, A., Massart, R., Neveu, S., 1995. Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Magn. Mater.* 149, 6–9. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(95\)00317-7](https://doi.org/10.1016/0304-8853(95)00317-7)
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- Blinova, I., Kanarbik, L., Irha, N., Kahru, A., 2017. Ecotoxicity of nanosized magnetite to crustacean *Daphnia magna* and duckweed *Lemna minor*. *Hydrobiologia* 798, 141–149. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2540-6>

- Bonifacio, A.F., Hued, A.C., 2019. Single and joint effects of chronic exposure to chlorpyrifos and glyphosate based pesticides on structural biomarkers in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere* 236, 124311. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.042>
- Cottet, M., Descloux, S., Guédant, P., Godon, A., Cerdan, P., Vigouroux, R., 2015. Total iron concentrations in waters and fish tissues in the Nam Theun 2 Reservoir area (Lao PDR). *Environ. Monit. Assess.* 187. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4745-6>
- Duke, S.O., 2018. The history and current status of glyphosate. *Pest Manag. Sci.* 74, 1027–1034. <https://doi.org/10.1002/ps.4652>
- Escarrone, A.L.V., Caldas, S.S., Primel, E.G., Martins, S.E., Nery, L.E.M., 2016. Uptake, tissue distribution and depuration of triclosan in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to freshwater. *Sci. Total Environ.* 560–561, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.039>
- Fahmi, U., Andriani, I., Salmah, S., Hatta, T.H., Omar, S.B.A., Sari, D.K., 2019. Histopathology of liver and intestine of pangkulan bare fish (*Oryzias matanensis*) Polluted by nickel and iron in Lake Matano, South Sulawesi. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 370. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/370/1/012078>
- Filho, J.S., Sousa, C.C.N., Silva, C.C., Sabóia-Morais, S.M.T., Grisolia, C.K., 2013. Mutagenicity and Genotoxicity in Gill Erythrocyte Cells of *Poecilia reticulata* Exposed to a Glyphosate Formulation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 91, 583–587. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1103-7>
- Gandahi, N.S., Gandahi, J.A., Yang, P., Tarique, I., Vistro, W.A., Haseeb, A., Huang, Y., Yu, L., Bai, X., Chen, Q., 2020. Ultrastructural Evidence of

- Melanomacrophagic Centers and Lipofuscin in the Liver of Zebrafish  
(*Denio rerio*). *Zebrafish* 17, 83–90. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1826>
- Ghosh, G., Gaikwad, P.S., Panicker, L., Nath, B.B., Mukhopadhyaya, R., 2016. Unfolding and inactivation of proteins by counterions in protein-nanoparticles interaction. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 145, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.053>
- Guerra, F.D., Attia, M.F., Whitehead, D.C., Alexis, F., 2018. Nanotechnology for Environmental Remediation: Materials and Applications. *Molecules* 23, 1760. <https://doi.org/10.3390/molecules23071760>
- Guilherme, S., Santos, M.A., Barroso, C., Gaivão, I., Pacheco, M., 2012. Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): Considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology* 21, 1381–1390. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0892-5>
- Guo, H., Barnard, A.S., 2013. Naturally occurring iron oxide nanoparticles: morphology, surface chemistry and environmental stability. *J. Mater. Chem. A* 1, 27–42. <https://doi.org/10.1039/C2TA00523A>
- Houslay, T.M., Earley, R.L., Young, A.J., Wilson, A.J., 2019. Habituation and individual variation in the endocrine stress response in the Trinidadian guppy (*Poecilia reticulata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 270, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.10.013>
- Hrycay, E.G., Bandiera, S.M., 2015. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer, in: *Advances in Pharmacology*. Elsevier Inc., pp. 35–84. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.03.003>

- Hued, A.C., Oberhofer, S., Bistoni, M.D.L.Á., 2012. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, cyprinodontiformes). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 107–117.  
<https://doi.org/10.1007/s00244-011-9686-7>
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.* 18, 260–267. <https://doi.org/10.1002/tox.10123>
- Karami-Mohajeri, S., Ahmadipour, A., Rahimi, H.R., Abdollahi, M., 2017. Adverse effects of organophosphorus pesticides on the liver: A brief summary of four decades of research. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 68, 261–275. <https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-2989>
- Ko, J.Y., Kang, N., Lee, J.H., Kim, J.S., Kim, W.S., Park, S.J., Kim, Y.T., Jeon, Y.J., 2016. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from an enzymatic hydrolysate of flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) muscle as a potent anti-hypertensive agent. *Process Biochem.* 51, 535–541.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.01.009>
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 147, 222–231.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.09.009>
- Li, M.-H., Xu, H.-D., Liu, Y., Chen, T., Jiang, L., Fu, Y.-H., Wang, J.-S., 2016. Multi-tissue metabolic responses of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to glyphosate-based herbicide. *Toxicol. Res. (Camb)*. 5, 1039–1052.

<https://doi.org/10.1039/C6TX00011H>

- Ma, J., Li, X., 2015. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. *Chemosphere* 128, 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.017>
- Macêdo, A.K.S., Santos, K.P.E. dos, Brighenti, L.S., Windmüller, C.C., Barbosa, F.A.R., Ribeiro, R.I.M. de A., Santos, H.B. dos, Thomé, R.G., 2020. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. *Sci. Total Environ.* 735, 139505. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139505>
- Mohapatra, S., Kumar, R., Sundaray, J.K., Patnaik, S.T., Mishra, C.S.K., Rather, M.A., 2021. Structural damage in liver, gonads, and reduction in spawning performance and alteration in the haematological parameter of *Anabas testudineus* by glyphosate- a herbicide. *Aquac. Res.* 52, 1150–1159. <https://doi.org/10.1111/are.14973>
- Mohmood, I., Lopes, C.B., Lopes, I., Ahmad, I., Duarte, A.C., Pereira, E., 2013. Nanoscale materials and their use in water contaminants removal-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 1239–1260. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1415-x>
- Moraes, J.S., Nornberg, B.F.S., Castro, M.R. de, Vaz, B. dos S., Mizuschima, C.W., Marins, L.F.F., Martins, C. de M.G., 2020. Zebrafish (*Danio rerio*) ability to activate ABC transporters after exposure to glyphosate and its formulation Roundup Transorb®. *Chemosphere* 248, 125959. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125959>
- Mozsár, A., Boros, G., Sály, P., Antal, L., Nagy, S.A., 2015. Relationship

between Fulton's condition factor and proximate body composition in three freshwater fish species. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 315–320.

<https://doi.org/10.1111/jai.12658>

Navarro, C.D.C., Martinez, C.B.R., 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*.

*Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 165, 83–90.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.06.003>

Nurdin, I., Johan, M.R., Yaacob, I.I., Ang, B.C., Andriyana, A., 2014. Synthesis, characterisation and stability of superparamagnetic maghemite nanoparticle suspension. *Mater. Res. Innov.* 18, S6-200-S6-203.

<https://doi.org/10.1179/1432891714Z.0000000001017>

Nurdin, I., Yaacob, I.I., Johan, M.R., Ang, B.C., 2012. Characterization and stability monitoring of maghemite nanoparticle suspensions. *Adv. Mater. Res.* 576, 398–401.

<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.576.398>

Nwonumara, G.N., Okogwu, O.I., 2020. Oxidative and biochemical responses as indicators of chemical stress in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) juvenile exposed to glyphosate. *Sci. African* 8, e00373.

<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00373>

OECD, 1992. Guidelines for the Testing of Chemicals: 203 - Fish, Acute Toxicity Test. OECD Libr. <https://doi.org/10.1787/9789264070684-en>

Ojo, O.A., Olayide, I.I., Akalabu, M.C., Ajiboye, B.O., Ojo, A.B., Oyinloye, B.E., Ramalingam, M., 2021. Nanoparticles and their biomedical applications. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 11, 8431–8445.

<https://doi.org/10.33263/BRIAC111.84318445>

Peillex, C., Pelletier, M., 2020. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *J. Immunotoxicol.* 17, 163–174. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2020.1804492>

Pereira, A.C., Gonçalves, B.B., Brito, R. da S., Vieira, L.G., Lima, E.C.O., Rocha, T.L., 2020. Comparative developmental toxicity of iron oxide nanoparticles and ferric chloride to zebrafish (*Danio rerio*) after static and semi-static exposure. *Chemosphere* 254. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126792>

Pestovsky, Y.S., Martínez-Antonio, A., 2017. The use of nanoparticles and nanoformulations in agriculture. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 17, 8699–8730. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.15041>

Pfanner, N., Craig, E.A., Hönlinger, A., 1997. Mitochondrial Preprotein Translocase. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 25–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.25>

Qualhato, G., Rocha, T.L., Lima, E.C. de O., Silva, D.M., Cardoso, J.R., Koppe Grisolia, C., Sabóia-Morais, S.M.T., 2017. Genotoxic and mutagenic assessment of iron oxide (maghemite- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticle in the guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 183, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.061>

Qualhato, G., Sabóia-Morais, S.M.T., Silva, L.D., Rocha, T.L., 2018. Melanomacrophage response and hepatic histopathologic biomarkers in the guppy *Poecilia reticulata* exposed to iron oxide (maghemite) nanoparticles. *Aquat. Toxicol.* 198, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.014>

- Rehman, T., Naz, S., Hussain, R., Chatha, A.M.M., Ahmad, F., Yamin, A., Akram, R., Naz, H., Shaheen, A., 2021. Exposure to heavy metals causes histopathological changes and alters antioxidant enzymes in fresh water fish (*Oreochromis niloticus*). *Asian J. Agric. Biol.* 2021, 1–11.  
<https://doi.org/10.35495/ajab.2020.03.143>
- Richard, S., Prévot-D'Alvise, N., Bunet, R., Simide, R., Couvray, S., Coupé, S., Grillasca, J.P., 2014. Effect of a glyphosate-based herbicide on gene expressions of the cytokines interleukin-1 $\beta$  and interleukin-10 and of heme oxygenase-1 in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 294–299. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1180-7>
- Rocha, T.L., Santos, A.P.R. dos, Yamada, Á.T., Soares, C.M. de A., Borges, C.L., Bailão, A.M., Sabóia-Morais, S.M.T., 2015. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 175–186.  
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.016>
- Rolshausen, G., Phillip, D.A.T.T., Beckles, D.M., Akbari, A., Ghoshal, S., Hamilton, P.B., Tyler, C.R., Scarlett, A.G., Ramnarine, I., Bentzen, P., Hendry, A.P., 2015. Do stressful conditions make adaptation difficult? Guppies in the oil-polluted environments of southern Trinidad. *Evol. Appl.* 8, 854–870. <https://doi.org/10.1111/eva.12289>
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K., Senapati, T., Ghosh, A.R., 2019. Effects of Glyphosate-Based Herbicide (Excel Mera 71) on Digestive Enzymes and Recovery Pattern in Teleostean Fishes. *Proc. Zool. Soc.* 72, 54–60.  
<https://doi.org/10.1007/s12595-017-0255-6>
- Sánchez, J.A.A., Klosterhoff, M.C., Romano, L.A., Martins, C.D.M.G., 2019.

- Histological evaluation of vital organs of the livebearer *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) exposed to glyphosate: A comparative analysis of Roundup® formulations. *Chemosphere* 217, 914–924.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.020>
- Santos, A.P.R., Rocha, T.L., Borges, C.L., Bailão, A.M., Soares, C.M.A.S., Sabóia-Morais, S.M.T., 2017. A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 168, 933–943.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.116>
- Savassi, L.A., Paschoalini, A.L., Arantes, F.P., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2020. Heavy metal contamination in a highly consumed Brazilian fish: immunohistochemical and histopathological assessments. *Environ. Monit. Assess.* 192. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08515-8>
- Schatz, G., 1996. The Protein Import System of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271, 31763–31766. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.50.31763>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Shahidi, S., 2019. Magnetic nanoparticles application in the textile industry—A review. *J. Ind. Text.* <https://doi.org/10.1177/1528083719851852>
- Shiogiri, N.S., Paulino, M.G., Carraschi, S.P., Baraldi, F.G., Cruz, C., Fernandes, M.N., 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*.

Environ. Toxicol. Pharmacol. 34, 388–396.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.007>

Silva, G.S., Matos, L.V., Freitas, J.O. da S., Campos, D.F., Val, V.M.F.A., 2019.

Gene expression, genotoxicity, and physiological responses in an Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (CUVIER 1818), exposed to Roundup® and subsequent acute hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 222, 49–58.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.010>

Simeonidis, K., Mourdikoudis, S., Kaprara, E., Mitrakas, M., Polavarapu, L.,

2016. Inorganic engineered nanoparticles in drinking water treatment: A critical review. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2, 43–70.

<https://doi.org/10.1039/c5ew00152h>

Singh, M., Barman, A.S., Devi, A.L., Devi, A.G., Pandey, P.K., 2019. Iron

mediated hematological, oxidative and histological alterations in freshwater fish *Labeo rohita*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 87–97.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.129>

Trigueiro, N.S. de S., Gonçalves, B.B., Dias, F.C., Lima, E.C.O., Rocha, T.L.,

Sabóia-Morais, S.M.T., 2021. Co-exposure of iron oxide nanoparticles and glyphosate-based herbicide induces DNA damage and mutagenic effects in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 81, 103521.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103521>

Unal, B., Toprak, M.S., Durmus, Z., Sözeri, H., Baykal, A., 2010. Synthesis,

structural and conductivity characterization of alginic acid-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite. *J. Nanoparticle Res.* 12, 3039–3048.

<https://doi.org/10.1007/s11051-010-9898-1>

- Villarroel, M.J., Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 2003. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53, 857–864. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00546-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00546-0)
- Weber, A.A., Sales, C.F., Faria, F.S., Melo, R.M.C., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2020. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 190. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>
- Woo, K., Hong, J., Choi, S., Lee, H.-W., Ahn, J., Kim, C.S., Lee, S.W., 2004. Easy Synthesis and Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Mater.* 16, 2814–2818. <https://doi.org/10.1021/cm049552x>
- Yang, C.-H., Kung, T.-A., Chen, P.-J., 2019. Differential alteration in reproductive toxicity of medaka fish on exposure to nanoscale zerovalent iron and its oxidation products. *Environ. Pollut.* 252, 1920–1932. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.154>
- Yeh, K.-Y., Lai, C.-Y., Lin, C.-Y., Hsu, C.-C., Lo, C.-P., Her, G.M., 2017. ATF4 overexpression induces early onset of hyperlipidaemia and hepatic steatosis and enhances adipogenesis in zebrafish. *Sci. Rep.* 7, 16362. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16587-9>
- Yoboue, E.D., Sitia, R., Simmen, T., 2018. Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. *Cell Death Dis.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0033-4>
- Zheng, T., Jia, R., Cao, L., Du, J., Gu, Z., He, Q., Xu, P., Yin, G., 2021. Effects of chronic glyphosate exposure on antioxidant status, metabolism and immune response in tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem.*

Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol. 239, 108878.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108878>

## CAPÍTULO 3

### **TOXICIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE IONP E GLIFOSATO EM *POECILIA RETICULATA* DURANTE ACUMULAÇÃO E ELIMINAÇÃO DE FERRO APÓS EXPOSIÇÃO E PÓS- EXPOSIÇÃO À ASSOCIAÇÃO DE IONP E GLIFOSATO**

Este capítulo aborda a segunda parte dos resultados deste trabalho, apresentando as análises de bioacumulação, integridade tecidual e distribuição de lipídeos no fígado de *Poecilia reticulata*

**Toxicidade da associação de IONP e glifosato em *Poecilia reticulata* durante acumulação e eliminação de ferro após exposição e pós-exposição à associação de IONP e glifosato**

**Resumo**

As nanopartículas de óxido de ferro (IONP) apresentam a capacidade de adsorção de glifosato (GLY) em sua superfície, tornando-as materiais de interesse para aplicação em processos de remediação ambiental. Devido a isso, é relevante se avaliar o comportamento tecidual e celular de peixes expostos a IONP e associações diversas. Assim, este estudo buscou investigar a acumulação de ferro, a integridade tecidual e a distribuição de lipídeos causadas pela associação de IONP e glifosato puro, bem como IONP e herbicidas baseados em glifosato (GBH) – neste caso Roudup Original®, bem como de íons ferro, em fêmeas de *Poecilia reticulata* expostas a íons ferro (0.3 mg/L) (IFe), IONP (0.3 mgFe/L) e IONP associadas com GLY (0.65 mg/L) e GBH (0.65 mgGLY/L (IONP + GBH1) e 1.30 mgGLY/L (IONP + GBH2)) por um período de 7, 14 e 21 dias, seguidos por um período igual de pós-exposição em água reconstituída. Os grupos tratados com IFe, IONP, IONP+GBH1, IONP+GBH2 e IONP+GLY apresentaram a eliminação do ferro chegando a se equiparar com o grupo controle, durante os 21 dias de pós-exposição, o que foi refletido nas avaliações de integridade tecidual que demonstraram um intenso acúmulo de lipídeos, bem como formação de zonas necróticas e infiltrados leucocitários em todos os grupos tratados durante a exposição. Para além da integridade tecidual, os resultados da distribuição de lipídeos indicou que é possível que a composição lipídica nos animais tratados com IONP+GLY é diferente dos expostos a IONP+GBH, de modo que é interessante observar que o acúmulo

dos lipídeos são independentes da concentração de GBH durante a exposição e em todos os tratamentos há o decréscimo expressivo das gotículas de lipídeos durante a pós-exposição.

### **Abstract**

Iron oxide nanoparticles (IONP) have the ability to adsorb glyphosate (GLY) on their surface, becoming an interesting proposal for use in environmental remediation processes. Therefore, this study aimed to investigate the iron accumulation, tissue integrity and lipid distribution caused by the association of IONP and pure glyphosate, as well as IONP and glyphosate-based herbicides (GBH) - in this case Roudup Original®, as well as iron ions, in female *Poecilia reticulata* exposed to iron ions (0.3 mg/L) (IFe), IONP (0.3 mgFe/L) and IONP associated with GLY (0.65 mg/L) and GBH (0.65 mgGLY/L (IONP + GBH1) and 1.30 mgGLY/L (IONP + GBH2)) for a period of 7, 14 and 21 days, followed by an equal period of post-exposure in reconstituted water. The groups treated with IFe, IONP, IONP+GBH1, IONP+GBH2, and IONP+GLY showed iron elimination reaching parity with the control group during the 21-day post-exposure period, which was reflected in the tissue integrity assessments that demonstrated intense lipid accumulation, as well as necrotic zone formation and leukocyte infiltrates in all treated groups during exposure. In addition to tissue integrity, the results of lipid distribution indicated that it is possible that the lipid composition in animals treated with IONP+GLY is different from those exposed to IONP+GBH, so it is interesting to note that lipid accumulation is independent of GBH concentration during exposure and in all treatments there is a significant decrease in lipid droplets during post-exposure.

## **Introdução**

Os nanomateriais (MN) têm ampliado sua aplicabilidade e visibilidade para uso em soluções ecotoxicológicas, devido à diversidade de interações que podem realizar ao se associarem com contaminantes e poluentes (Guerra et al., 2018), o que os tornam ferramentas interessantes para a remediação de ambientes contaminados e poluídos (Rivoira et al., 2016; Santos et al., 2019). Nesta perspectiva, as nanopartículas de óxido de ferro (IONP) ganham proeminência por terem uma elevada relação tamanho-superfície, síntese viável, possibilidade de funcionalização da superfície (Baumann et al., 2014) e porque são magnéticas, o que torna possível a remoção dos IONP do ambiente. Estas características tornam os IONP instrumentos promissores para a remediação ambiental, uma vez que estudos já demonstraram a sua eficácia na adsorção e remoção de contaminantes dissolvidos na água (Hassan et al., 2018; Muraro et al., 2020; Yakar et al., 2020), bem como no tratamento de efluentes urbanos (Xu et al., 2012).

A vasta gama de aplicações possíveis utilizando IONP para a remediação ambiental é um campo de investigações promissor, entre estas investigações é importante destacar o trabalho de Park et al. (2020), que descreve os IONP como materiais eficientes para a remoção do glifosato (GLY) na água, com base nas associações dos grupos COO e PO<sub>3</sub> da molécula de glifosato com a superfície das nanopartículas, que por sua vez podem ser removidas da água utilizando métodos de remoção magnética (Park et al., 2020).

Neste sentido, para tornar possível a utilização de IONP em situações reais de contaminação por glifosato, é essencial compreender a toxicidade dos

IONP e GLY. De acordo com Valdiglesias et al., 2016; Valsami-Jones and Lynch, 2015, os nanomateriais podem ser inseguros se aplicados equivocadamente em concentrações erradas. Além disso, é importante, a fim de apoiar a utilização segura dos IONP, se basear em estudos anteriores, pois eles vêm demonstrando a toxicidade dos IONP como indutores de genotoxicidade em sangue e resposta inflamatória com danos no tecido hepático em *Poecilia reticulata* (Qualhato et al., 2017, 2018) e danos embrionários em zebrafish expostos a IONP isolados (Zhu et al., 2012), tornando assim necessário procurar um maior conhecimento sobre a utilização segura dos IONP.

No que diz respeito ao glifosato, é necessário considerar que é o herbicida mais comercializado no mundo, com ampla distribuição e aplicação nas principais culturas vegetais do planeta (Duke, 2018; Geng et al., 2021). O glifosato é bem conhecido por ser tóxico. Alguns estudos mostraram que o GLY induz resposta inflamatória complexa envolvendo estresse oxidativo e respostas imunológicas e metabólicas alteradas em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Zheng et al., 2021), *Clarias gariepinus* (Nwonumara and Okogwu, 2020), *Anabas testudineus* (Mohapatra et al., 2021) e *Poecilia reticulata* (Antunes et al., 2017).

No entanto, o GLY não é comercializado na sua forma pura, mas em misturas complexas de herbicidas à base de glifosato (GBH), tais como Roundup Original®. O GBH contém vários componentes nas suas formulações que nem sempre são descritos pelo fabricante, entre as quais surfactantes como a amina polietoxiquilada (POEA) (Mesnage et al., 2019). Esta combinação de glifosato e tensoactivos torna o GBH uma mistura significativamente mais tóxica do que o

GLY puro para organismos aquáticos, o que é referendado pela literatura em estudos com o GBH, indicando serem eles causadores de danos maiores do que o GLY nos biomarcadores histológicos, ultra-estruturais e metabólicos em *Oreochromis niloticus* (Samanta et al., 2018) e *Carassius auratus* (Li et al., 2016), apresentando neurotoxicidade em larvas de *Rhamdia quelen* (Sobjak et al., 2017), dano reprodutivo em *Danio rerio* (Uren Webster et al., 2014) e dano histopatológico em *Poecilia reticulata* (Antunes et al., 2017).

Para desenvolver a utilização segura de IONP para remediação de ambientes contaminados com GLY, é necessário compreender o comportamento da associação de IONP+GLY em organismos aquáticos, considerando que os IONP livres podem ter o seu efeito tóxico mitigado pela associação com GLY, que podem ou não permanecer ativos após adsorção na superfície dos IONP. O estudo da associação de IONP+GLY é um campo que necessita de mais investigação, uma vez que um estudo de Trigueiro et al. (2021) mostrou que a co-exposição de IONP e GLY induz danos no DNA e efeitos mutagênicos em *Poecilia reticulata*.

Desta forma, *Poecilia reticulata* (Guppy) é um excelente biomonitor ambiental, com o seu genoma estrutural descrito (Künstner et al., 2016) sendo recomendado nos guias da OCDE para avaliação da toxicidade em peixes (OECD, 2019), pela sua sensibilidade ao tratamento e alta resistência em ambientes eutróficos. Os guppies têm uma distribuição extensa no mundo (Deacon et al., 2011), podem ser encontrados em águas lênticas ou lóxicas, o que nos leva a pensar que estes animais podem migrar ou permanecer por períodos de tempo específicos em ambientes contaminados com GLY. É a partir

desta ideia que para o desenvolvimento de uma aplicação segura de IONP é essencial ter em conta os períodos pós-exposição aos IONP sozinhos ou em associações, para avaliar a potencial inversão das respostas inflamatórias e a consequente recuperação dos animais.

Assim, o presente estudo se propõe a avaliar a acumulação e eliminação de IONP nos peixes, bem como os respectivos efeitos das IONP e associações na indução de danos histopatológicos no tecido hepático de *Poecilia reticulata*, centrando-se na organização e distribuição de lípidos no tecido, utilizando técnicas de ICP-OES, histologia e microscopia electrónica. O emprego destas técnicas visará testar as hipóteses de que: 1) os guppies acumulam ferro de IONP durante a exposição; 2) seguido da eliminação do ferro quando pós-expostos em água limpa; tal que 3) os tratamentos causam danos ultra-estruturais e histológicos, com aumento dos níveis lipídicos nas células; tal que 4) os guppies recuperam dos danos quando removidos da condição de exposição e pós-expostos em água limpa.

## **Materiais e métodos**

### **Delineamento experimental**

Este estudo foi aprovado pelo Comité de Ética sobre a Utilização de Animais da Universidade Federal de Goiás sob o número de registo 046/2017.

As fêmeas adultas de *Poecilia reticulata* foram recolhidas na estação de tratamento de efluentes Dr. Hélio Seixo de Brito da Empresa de Saneamento Básico de Goiás (16°38'08.2 "S 49°15'37.4 "W, Goiânia, Goiás, Brasil) e aclimatadas em tanques de 300 litros com água reconstituída durante 30 dias. Após este período, os animais foram transferidos para aquários com razão 2 peixes por litro durante 15 dias para uma segunda aclimação e durante este

período e toda a experiência, os animais foram alimentados *ad libitum* duas vezes por dia com comida comercial para peixes. Durante a aclimatização e o tempo experimental foi mantido fotoperíodo 12h:12, temperatura  $26\pm 2$  °C, pH  $7,1\pm 0,2$ , amónia 0-0,25 ppm, nitrito 0-0,25 ppm e oxigénio dissolvido cerca de 8,0 ppm.

Desta forma, após a aclimatação, 63 animais em triplicata foram submetidos ao período experimental, com 15 animais submetidos a 21 dias de exposição subdivididos em grupo de controlo apenas em água reconstituída e 5 grupos tratados: 1) cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) em  $0,3 \text{ mg. L}^{-1}$  (IFe) - como uma parte dissolvida de IONP; 2) IONP+GBH1:  $0,3 \text{ mgFe.L}^{-1}$  de IONP +  $0,65 \text{ mgGLY.L}^{-1}$  de Roundup Original®; 3) IONP+GBH2:  $0,3 \text{ mgFe.L}^{-1}$  de IONP +  $1,30 \text{ mgGLY.L}^{-1}$  de Roundup Original®; e 4) IONP+GLY:  $0,3 \text{ mgFe.L}^{-1}$  de IONP +  $65 \text{ mg.L}^{-1}$  de glifosato P.A (GLY) (Sigma-Aldrich, Alemanha).

Foram realizados dois ensaios. No ensaio 1 coletou-se 7 peixes expostos para avaliação quanto a morfologia tecidual em microscopia de luz e quanto à ultra-estrutura em MEV e MET, também foram coletados 3 animais para avaliação da acumulação de ferro. Cabe indicar que as análises morfológicas serviram de suporte para a avaliação a ser realizada no ICP-OES e será descrita à posteriori. Mas, foi importante para identificar a realização do ensaio 2 no qual houve a repetição do ensaio 1 com a inclusão de um novo grupo IONP  $0,3 \text{ mg Fe, L}^{-1}$

### **Análises histológicas e ultraestruturais**

Para as análises ultra-estruturais e histológicas, após 7, 14 e 21 dias de exposição e 7, 14 e 21 dias pós-exposição, 10 animais foram eutanizados por

arrefecimento e dissecados em decúbito dorsal. Deste total, 7 animais foram os seus fígados processados para análises histológicas fixadas por solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio a 0,1 M com pH 7,2), pós-fixados em tetroxido de ósmio 1% durante 2 horas, desidratados em cadeias de álcool e incluídos em Histo-resin (Leica, Alemanha). Os fígados foram submetidos ao ultramicrotoma (Leica UCT, Alemanha) para fazer secções com 2,5-3,0 $\mu$ m. As lâminas obtidas seguiram-se a diferentes métodos de reacção e coloração, onde foram utilizadas: 1) Toluidina Azul 1%; 2) Hematoxilina de Mayer; e 3) Schiff Ácido Periódico.

Para avaliação ultra-estrutural, outros três animais foram fixados em 2,5% de glutaraldeído durante 24 horas, pós-fixados em 1% de solução de tetróxido de ósmio durante 2 horas e processados para microscopia electrónica de transmissão. Os órgãos foram incorporados em resina epoxi EMbeed-812 (EMS, EUA). Após a ultramicrotomia, as grelhas com películas de 70nm foram rebatidas numa solução de acetato de uranilo saturado e citrato de chumbo a 4%, após rebatimento, as telas de cobre com as secções foram tomadas para análise num microscópio electrónico de transmissão JEM-2100 (JEOL, Japão).

#### **Análise de distribuição e quantificação de gotículas de lipídeo**

Os blocos obtidos para avaliação ultra-estrutural por microscopia electrónica de transmissão, foram fixados verticalmente em tocos de alumínio e tomados para revestimento com película de carbono num sistema de revestimento de carbono JEE-420 (JEOL, Japão). Os blocos revestidos de carbono foram analisados para análise elementar por detecção de electrões com backscattered electron detection (SEM-BEC) e espectroscopia de raios X dispersiva de energia (EDS) em microscopia electrónica de varrimento. Em cada bloco, duas imagens

de regiões diferentes foram obtidas e processadas no software Image J Fiji (Schindelin et al., 2012), em tal limiar foi aplicado para determinar a área e distribuição dos lípidos. O tamanho mínimo de detecção fixado foi de 0,05  $\mu\text{m}^2$  para eliminar artefactos que não são de interesse.

### **Quantificação de ferro por ICP-OES**

Após 7 e 21 dias de exposição e 7 e 21 dias pós-exposição, três peixes de cada tratamento em cada momento de recolha foram lavados com solução salina (NaCl 1%), eutanizados por arrefecimento e desidratados numa estufa de secagem a 105°C durante 48 horas. As amostras desidratadas foram digeridas numa solução 1:1:1 (v/v) constituída por ácido nítrico concentrado, peróxido de hidrogénio a 30%, e água desionizada. Os peixes da solução foram digeridos num digestor de microondas MARS 6 (CEM, EUA) a 180 °C durante 10 minutos em reactores de teflon. Para análise, a solução foi diluída 3 vezes em solução de ácido nítrico a 2%.

A análise química do elemento Fe foi realizada num espectrómetro de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) OPTIMA 8300 (Perkin Elmer, Alemanha), com potência e fluxo de argon de plasma de 1500 W e 15 L/min, respectivamente, e fluxo de nebulização de 0,8 ml/min. A calibração foi realizada utilizando padrões de elemento único da substância a analisar de interesse. O elemento ferro (Fe) foi analisado a um comprimento de onda de 238,204 nm. Os valores resultantes foram obtidos em partes por milhão (ppm) convertidos em microgramas por grama ( $\mu\text{g/g}$ ).

### **Delineamento estatístico**

Com os valores recolhidos das análises pelo ICP-OES e SEM-BEC, as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.3.0. Para

análises de distribuição lipídica foi realizada uma regressão não linear para obter a distribuição gaussiana. Para comparações entre grupos, os testes de suposição foram validados pelo gráfico QQ-plot e ANOVA Two-way, seguido de comparações múltiplas pelo teste LSD de Fisher, assumindo um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), com significado expresso no modo GP do valor  $p$ , onde:  $p > 0,1234 = \text{ns}$ ;  $p > 0,0332 = *$ ;  $p > 0,0021 = ***$ ;  $p > 0,0002 = ***$ ; e  $p < 0,0001 = ****$ .

## **Resultados e discussão**

### **Acumulação de ferro**

As observações deste trabalho são dados preliminares quanto ao emprego do ICP-OES, de modo que a posteriori serão realizadas metodologias mais robustas. Porém, é relevante se obter indicações adequadas que justifiquem o avanço metodológico em novas direções. De modo que este estudo visou obter informações indicativas significantes quanto a acumulação e eliminação do ferro nos peixes, contribuindo com a literatura científica que ainda se encontra avançando em estudos de bioacumulação. Levando em consideração estas observações, as análises por ICP-OES mostraram que no grupo controle não houve acúmulo de ferro, mantendo-se somente a concentração de ferro endógeno no organismo que foi em média de 5,261  $\mu\text{g/g}$  durante todo o tempo experimental. Por outro lado, os animais tratados apresentaram acumulação de ferro que variou no decorrer do tempo, com efeito dependente dos tratamentos ( $F=2,018$ ,  $DF=15$ ,  $p=0,033$ ).

A persistência do ferro nos animais observada neste trabalho permite supor que a acumulação do ferro está relacionada com a forma na qual ele se encontra disponível, de tal modo que o tratamento com íons ferro (IFe) não apresentou aumento da concentração de ferro no decorrer do experimento, por outro lado,

os animais submetidos ao tratamento com IONP sem associações, apresentaram um acréscimo médio de 4,676  $\mu\text{g/g}$  de 7 para 21 dias de exposição.

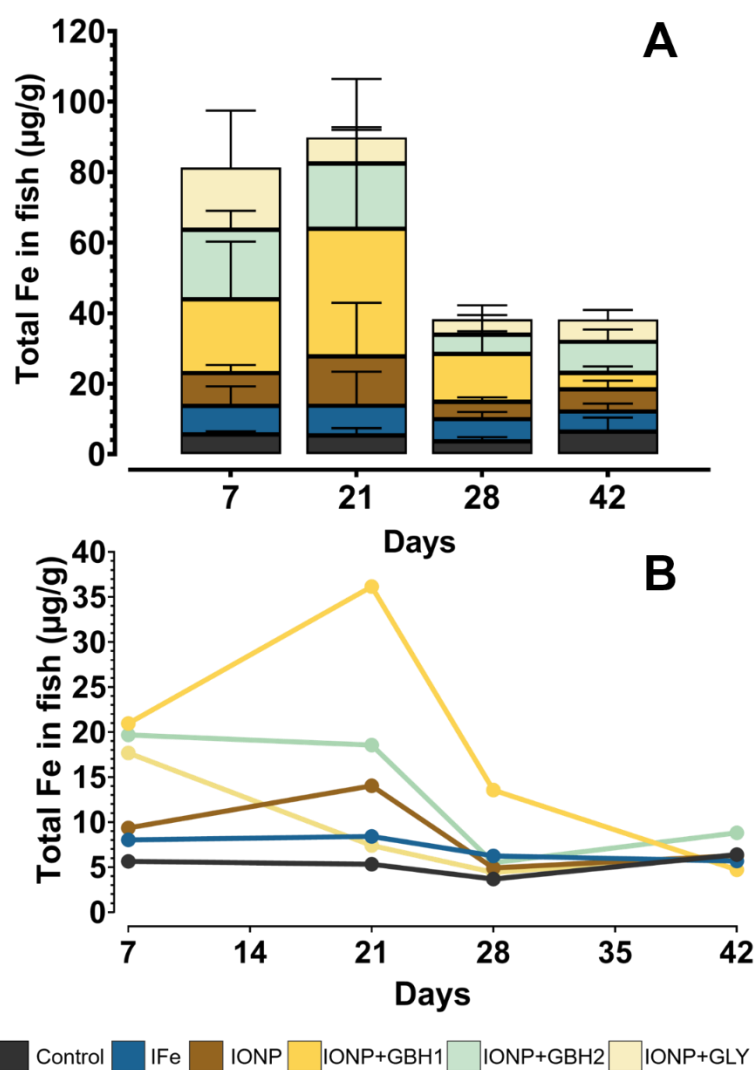


Figure 7: Gráficos de acumulação de ferro em peixes *Poecilia reticulata*. A) gráfico empilhado com apresentação dos desvios padrões. B) Gráfico de linhas, mostrando o decréscimo do acúmulo de ferro durante a pós exposição.

Já ao se comparar a acumulação em IFe e IONP foi possível supor que os íons excessivos de ferro do tratamento IFe acabaram sendo controlados pelo sistema de regulação da homeostase do ferro, que é descrito por Muckenthaler et al. (2008) e corroborado por estudos que mostram o aumento da atividade da enzima metalotioneína – relacionada ao controle e regulação de íons metálicos – em *Poecilia reticulata* expostos a efluentes de curtume contaminados com metais, incluindo ferro (Aich et al., 2017), em *Dules auriga* – uma espécie

sentinela da contaminação por metais na baía de ilha grande no Brasil (Hauser-Davis et al., 2021) e em *Salmo trutta* que viviam em ambiente antropizado com altos níveis de metais, incluindo ferro, no rio Krka na Croácia (Mijošek et al., 2019).

Dando continuidade a comparação dos grupos IFe e IONP, a maior acumulação de ferro nos tratamentos com IONP é corroborada por estudos que mostram que as formas nanoparticuladas do óxido de ferro adsorvem proteínas e outras moléculas que tenham afinidade com a superfície das IONP (Hai et al., 2017; Mosiagin et al., 2015), o que leva a formação de coronas com reativas com tecido biológico, que conseqüentemente acabam por proteger as IONP de processos de dissolução oxidativa ou reduções que levem a dissociação das nanopartículas, de modo que o acúmulo de IONP em peixes já foi relatado em *Danio rerio* expostos a 4 e 10 mg/L de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Zhang et al., 2015).

Desta forma, é possível sugerir que a formação de coronas proteicas e a complexação da relação das IONP com o tecido orgânico aconteceu no presente trabalho ocasionando a persistência das IONP no organismo, que também é vista em um estudo em brânquias, fígado, rim, intestino, cérebro, baço e músculos de *Oreochromis niloticus* expostos por 60 dias a concentrações de 0,1-10,0 mg/L de  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (Ates et al., 2016). No presente estudo foram utilizadas nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  funcionalizadas com citrato, o que deixou a carga superficial das nanopartículas negativa e disponível para interação com as moléculas orgânicas, de modo que os animais tratados com IONP sem associações mostraram um aumento médio de 4,676  $\mu\text{g/g}$  na concentração de ferro de 7 para 21 dias de exposição.

Ainda levando em conta a possibilidade da formação de coronas nas IONP, as investigações deste estudo mostraram que os tratamentos feitos com IONP+GBH apresentaram maior acúmulo de ferro durante a exposição nos animais tratados com IONP+GBH1 e IONP+GBH2, de modo que logo em 7 dias

de exposição a diferença de concentração de ferro em relação ao grupo controle já era significativa, sendo de 15,310 µg/g em IONP+GBH1 e 14,040 µg/g em IONP+GBH2, o que sugere que o GBH ao ser adsorvido na superfície das IONP formam coronas que mantem uma relação com o tecido constante enquanto durar a exposição, o que é corroborado por estudos prévios que mostram a possibilidade da persistência de interações de moléculas complexas com o tecido, como as moléculas contidas na mistura dos GBH (Martens et al., 2019; Prado et al., 2015), logo, é possível propor que os níveis de ferro são elevados nos tratamentos de IONP+GBH porque o GBH adsorvido das IONP acaba por manter as nanopartículas no organismo, já que ao mesmo tempo que tem uma forte associação com as IONP, também tem alta afinidade com o tecido orgânico.

Na mesma perspectiva de complexidade das coronas e sua respectiva relação com os tecidos biológicos, os resultados das concentrações de ferro analisadas por ICP-OES mostraram que houve uma diferença marcante entre os animais tratados com GBH e GLY, de modo que os animais tratados com IONP+GLY tiveram uma concentração de ferro em média de 17,680 µg/g logo em 7 dias, seguida por diminuição significativa ao fim da exposição, chegando a apresentar uma redução média na concentração de ferro de 10,281 µg/g após 21 dias de exposição, enquanto que os animais tratados com IONP+GBH1 tiveram em média 28,750 µg/g a mais de ferro do que IONP+GLY após 21 dias de exposição, o que pode ser explicado pela desprotonação da molécula do glifosato resultando em metabólitos como ácido aminometilfosfônico (AMPA) e sarcosina (Peixoto et al., 2015) que apresentam possibilidade de excreção pelo organismo e menor toxicidade do que o GLY e GBH, como mostrado por Rodrigues et al. (2019) em *Danio rerio* expostos a GBH, GLY e AMPA.

Para além da investigação da acumulação de ferro durante a exposição, o presente estudo investigou a possibilidade de eliminação do ferro em períodos de pós-exposição, tendo em vista que estudos prévios já mostraram a possibilidade da excreção do ferro em *Danio rerio* e *Oreochromis niloticus* expostos a IONP e posteriormente submetidos a períodos de pós-exposição em água limpa (Ates et al., 2016; Zhang et al., 2015), o que fez necessária a investigação da capacidade de eliminação das IONP associadas a GLY e GBH.

No presente estudo, nos animais expostos aos tratamentos com IONP, IONP+GBH1 e 2 e IONP+GLY foi identificada a eliminação do ferro, chegando a níveis estatisticamente iguais ao controle logo em 7 dias de pós exposição, o que se mantém até os 21 dias que concluem a pós exposição, independente das IONP isoladas ou associadas a GBH ou GLY, o que mostra que existe um empenho e sucesso na detoxificação do organismo que é refletido em uma resposta inflamatória, que pode ser avaliada nas análises histopatológicas e de distribuição de lipídeos descritas a seguir.

### **Integridade tecidual**

A análise histológica do tecido hepático é um biomarcador importante de investigação das respostas do organismo a contaminantes, de modo que estudos prévios já identificaram danos histológicos em guppies e *Capoeta fusca* promovidos por exposição a IONP (Qualhato et al., 2018; Sayadi et al., 2020), bem como respostas no tecido hepático em guppies expostos a glifosato (Antunes et al., 2017) e em *Pseudoplatystoma corruscans* expostos a GBH (Moura et al., 2017).

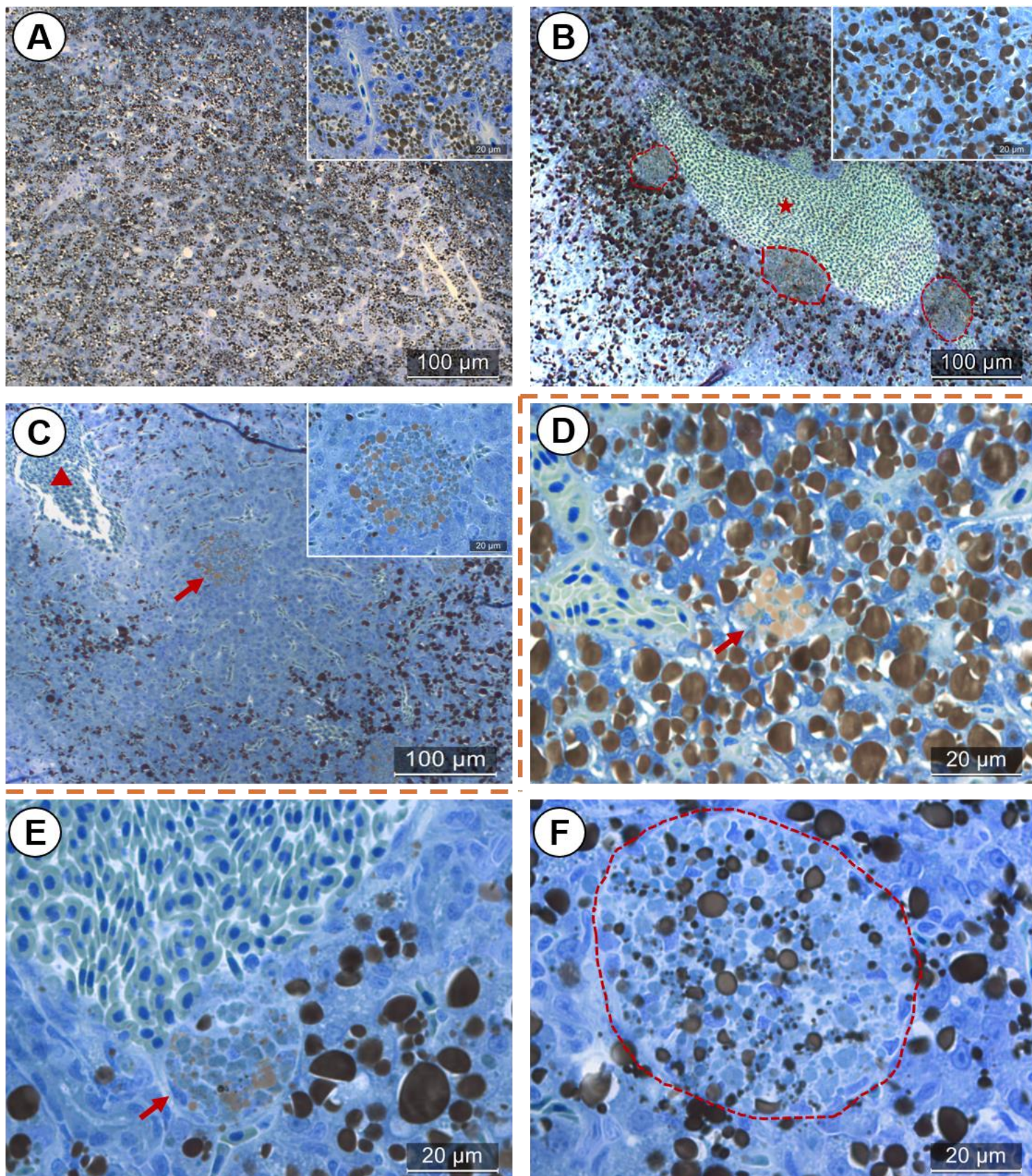


Figure 8: Tecido hepático de *Poecilia reticulata* pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e corado com azul de toluidina. (A) Controle ; (B) IFe - 14 dias de exposição; (C) IONP - 21 dias de pós-exposição; (D) IONP+GBH1 - 14 dias de exposição; (E) IONP+GBH2 - 21 dias de exposição; (F) IONP+GLY - 14 dias de pós-exposição

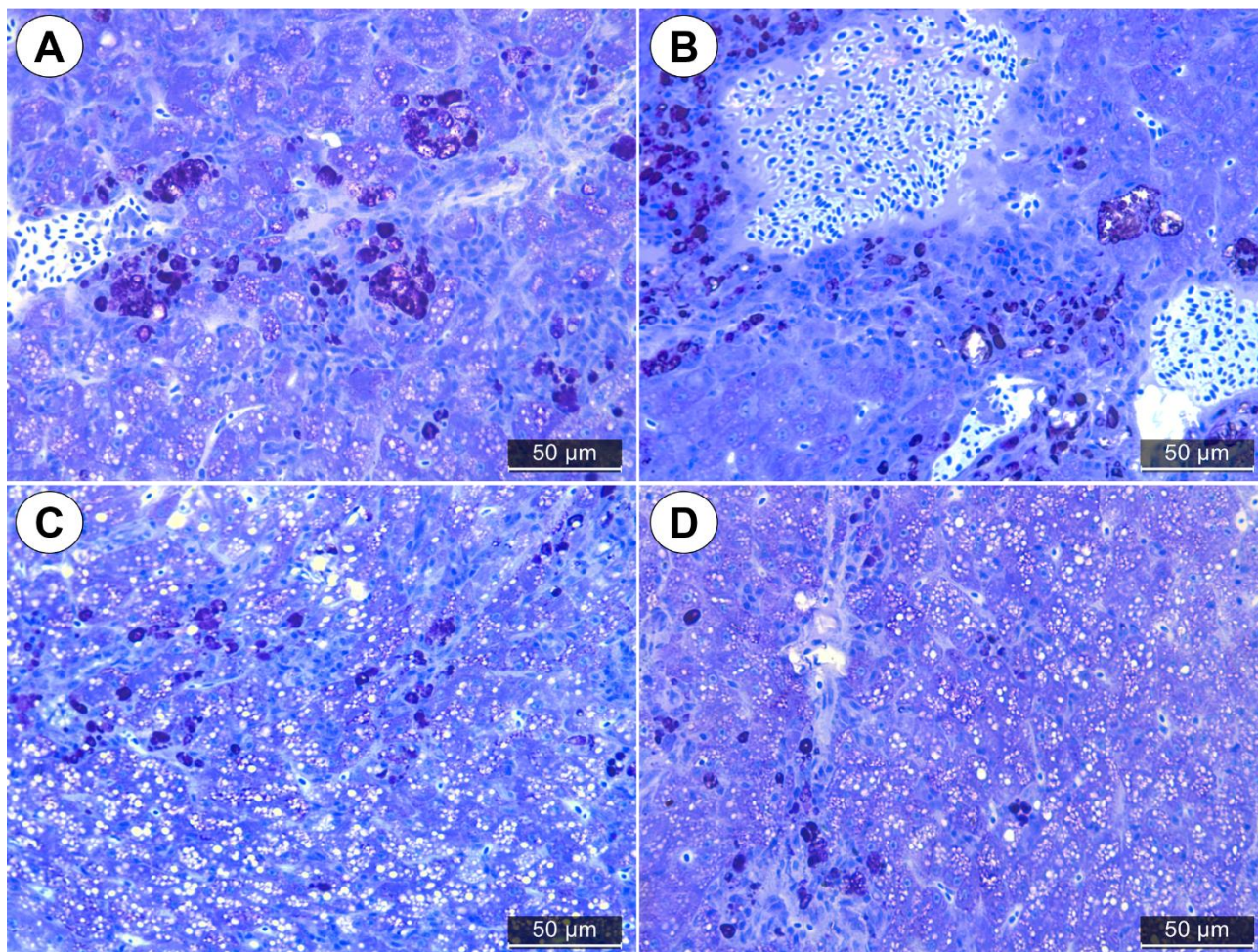


Figure 9: Tecido hepático de *Poecilia reticulata* submetido a reação de ácido periódico de Schiff e corado com azul de toluidina. Os pontos em roxo indicam os grupamentos de glicoconjugados. (A) IFe – 14 dias de exposição; (B) IONP+GBH1 – 21 dias de exposição; (C) IONP+GBH2 – 14 dias de pós-exposição; (D) IONP+GLY – 21 dias de pós-exposição.

Visando observar os efeitos dos tratamentos com IONP+GLY e IONP+GBH, o presente trabalho analisou a integridade do tecido hepático, bem como o comportamento dos lipídeos e sua distribuição nas células, de modo que as análises mostraram que no grupo controle os hepatócitos permaneceram preservados com macrófagos residentes e gotículas de lipídeo significativamente menores e mais dispersas quando comparadas aos grupos tratados, que apresentaram alterações circulatórias, regressivas e progressivas que correspondem a uma resposta inflamatória persistente durante a exposição.

Com objetivo de avaliar a complexidade das alterações histológicas foram utilizadas metodologias de coloração do tecido, bem como marcação de glicoconjugados e lipídeos. Deste modo, as análises da técnica de PAS+azul de toluidina (Fig. 2) mostraram que os animais tratados com IFe, IONP+GBH1 e 2 e IONP+GLY apresentaram grupamentos de células com glicoconjugados associadas a vasos dilatados e zonas necróticas, de modo que respostas semelhantes já foram descritas em fígado de *Poecilia reticulata* expostos a 0,3 mg/L de IONP durante 3 a 21 dias (Qualhato et al., 2018) e em fígado de *Rhamdia quelen* após exposição a diferentes formulações de GBH (Murussi et al., 2016), o que pode ser identificado como um processo de infiltração leucocitária no tecido hepático dos guppies como resultado de intensa inflamação induzida pelos tratamentos.

A resposta inflamatória nos animais tratados com IFe, para além dos infiltrados leucocitários, sítios de melanomacrófagos distribuídos em todo o tecido, de modo que a formação destes sítios é descrita por Wolf and Wheeler (2018) como uma resposta típica em peixes expostos a contaminantes que já foi vista em estudos prévios que identificaram os sítios de melanomacrófagos em tecido hepático de *Myoxocephalus scorpius* encontrados próximos a áreas de mineração (Sonne et al., 2014) e em *Catla catla* expostos a ambientes contaminados com metais pesados (Naz et al., 2021), de tal modo que é possível afirmar que o tratamento IFe induz uma forte resposta aos íons ferro, causando vasodilatações extensas, para além de promover estresse oxidativo e alterar a distribuição dos lipídeos no tecido, o que leva à formação de macroesteatoses nas células, podendo ocasionar a posterior morte celular pela formação de zonas

necróticas que levam a perda do tecido pela substituição das áreas funcionais por fibras.

A formação de macroesteatoses, bem como vasodilatações, sítios de melanomacrófagos e fibroses foram visualizadas também nos animais tratados com IONP+GBH e IONP+GLY, que são corroboradas por estudos prévios que identificaram danos histológicos semelhantes em guppies expostos por 3-21 dias a 0,3 mg/L de IONP (Qualhato et al., 2018) e em brânquias e músculos de guppies expostos por 96 horas em concentrações de 0,34-5,2 mgGLY/L de GBH (Shiogiri et al., 2012). Nos animais expostos a IONP+GBH1, para além de zonas necróticas e infiltração leucocitária foi possível identificar a presença de fibras ao

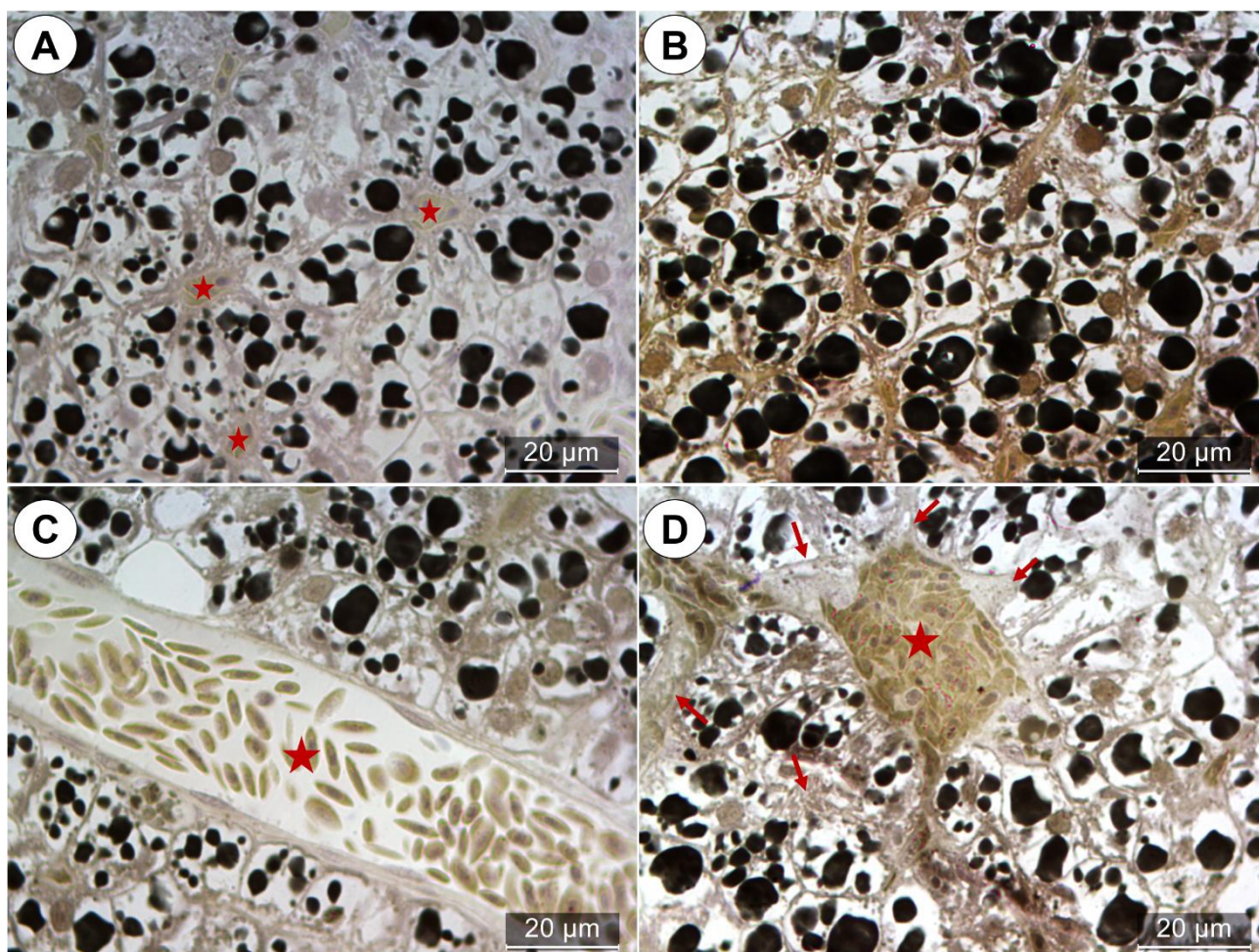


Figure 10: Tecido hepático de *Poecilia reticulata* pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e corado com hematoxilina de Meyer. (A) IONP – 7 dias de exposição; (B) IFe – 7 dias de exposição; (C) IONP+GBH2 – 7 dias de pós exposição; (D) IONP+GLY – 14 dias de pós-exposição

longo do tecido, enquanto que nos animais expostos a IONP+GBH2 e IONP+GLY, em adição as alterações descritas para IONP+GBH1, também foram visualizados sítios de melanomacrófagos com lipofuscina, que é um pigmento específico dos melanomacrófagos resultante do processo de destruição de células comprometidas, conforme descrito por Gandahi et al. (2020) que em seu trabalho caracterizou zonas de lipofuscina em *Danio rerio*.

Em síntese, os resultados da avaliação de integridade tecidual, são complementares aos de bioacumulação, visto que durante a exposição, os tratamentos com IFe, IONP, IONP+GBH e IONP+GLY são responsáveis pelo comprometimento do tecido hepático, resultante do desencadeamento de respostas inflamatórias expressas em alterações como vasodilatações, infiltrações leucocitárias, sítios de melanomacrófagos e formação de zonas necróticas. Para além das alterações citadas, os resultados deste trabalho mostraram que a exposição levou a modificação da organização e distribuição das gotículas de lipídeos nas células, de modo que esta alteração pode ser considerada um importante biomarcador, já que o comportamento dos lipídeos nas células está relacionado a processos de peroxidação lipídica e estresse oxidativo amplamente estudados na literatura da área (Anila et al., 2021; Guimarães et al., 2021; Mohmood et al., 2015; Navarro and Martinez, 2014), sendo causados, inclusive por pesticidas como GLY e GBH. Neste sentido se faz importante uma investigação da organização e distribuição dos lipídeos nas células, o que é proposto no próximo tópico deste trabalho.

### Distribuição de lipídeos

Com o objetivo de complementar a avaliação de integridade tecidual, este estudo aplicou técnicas de microscopia eletrônica para uma análise integrativa da distribuição de lipídeos e sua respectiva relação com a ultraestrutura celular, visto que os lipídeos e suas conformações nas células são biomarcadores de estresse, uma vez que as espécies reativas de oxigênio (ROS) oriundas do metabolismo de contaminantes podem promover a peroxidação dos lipídeos insaturados da membrana celular, formando hidroperóxidos de lipídeos que

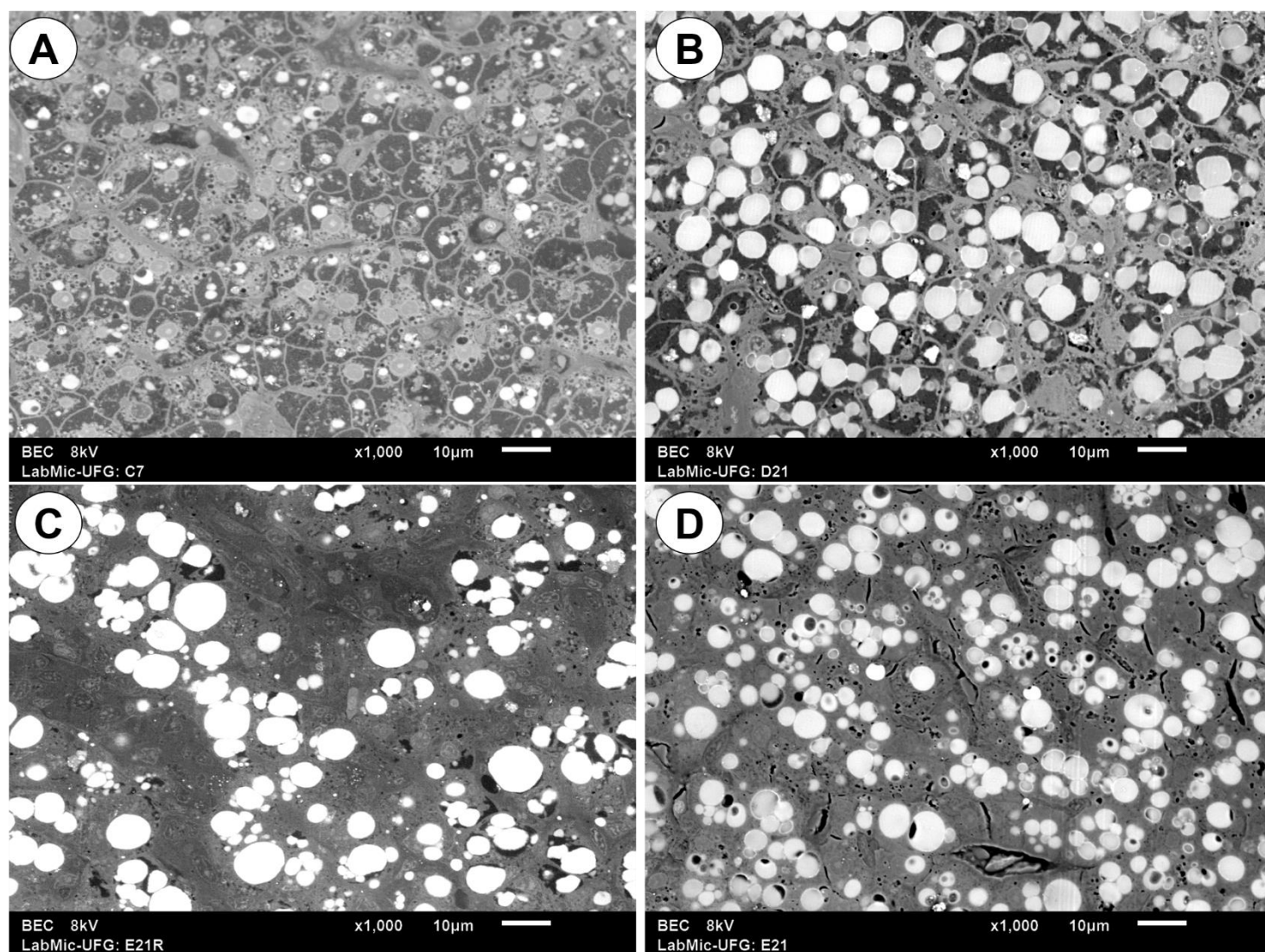


Figure 11: Eletronmicrografias de varredura por elétrons retro espalhados de fígado de *Poecilia reticulata*. As zonas de maior brilho indicam elementos de maior número atômico, neste caso, as gotículas de lipídeo aparecem com maior brilho já que o ósmio tem afinidade por lipídeos e um alto número atômico. (A) Controle – 7 dias de exposição; (B) IFe – 14 dias de exposição; (C) IONP+GBH2 – 14 dias de exposição; (D) IONP+GLY – 21 dias de exposição.

podem ser decompostos e desencadear um processo intenso de destruição celular (Martínez-Álvarez et al., 2005).

Corroborando com o fato de que desorganização decorrente das ROS a partir da peroxidação oxidativa dos lipídeos, causa danos graves às células (Harman, 1956), as análises realizadas neste trabalho, mostraram que a distribuição e área ocupada por lipídeos nas células hepáticas são dependentes da relação do tempo de exposição e do tratamento a que os animais foram submetidos ( $F=8,183$ ,  $DF=20$ ,  $p<0,001$ ), visto que em todos os grupos – exceto o controle – há o aumento da área ocupada por lipídeos durante os 21 dias de exposição.

Neste sentido, processos de intensa peroxidação lipídica já são reconhecidos em peixes expostos a glifosato, GBH (Annett et al., 2014; Martins et al., 2021) e materiais nanoparticulados como as IONP (Dasmahapatra et al., 2018; Lai et al., 2021; Qualhato et al., 2017). Deste modo, as análises realizadas no presente trabalho mostraram que o acúmulo de lipídeos no tratamento IFe se torna relevante apenas em 21 dias de exposição, quando alcançou um aumento médio da área ocupada por lipídeos de  $2234\mu\text{m}$  entre 14 e 21 dias de exposição, chegando a ser 9,0 vezes maior ( $p<0,001$ ) que o controle no mesmo período. Informações sobre a disposição dos lipídeos em peixes tratados com IFe são emergentes, porém já são conhecidos os efeitos tóxicos promovidos pela

exposição de peixes em ambientes contaminados com metais pesados incluindo ferro (Parente et al., 2021), como é o caso de animais da espécie *Astyanax lacustres* que apresentaram degenerações celulares e esteatose hepática após exposição à água do rio Doce contaminada com metais pesados, inclusive ferro,

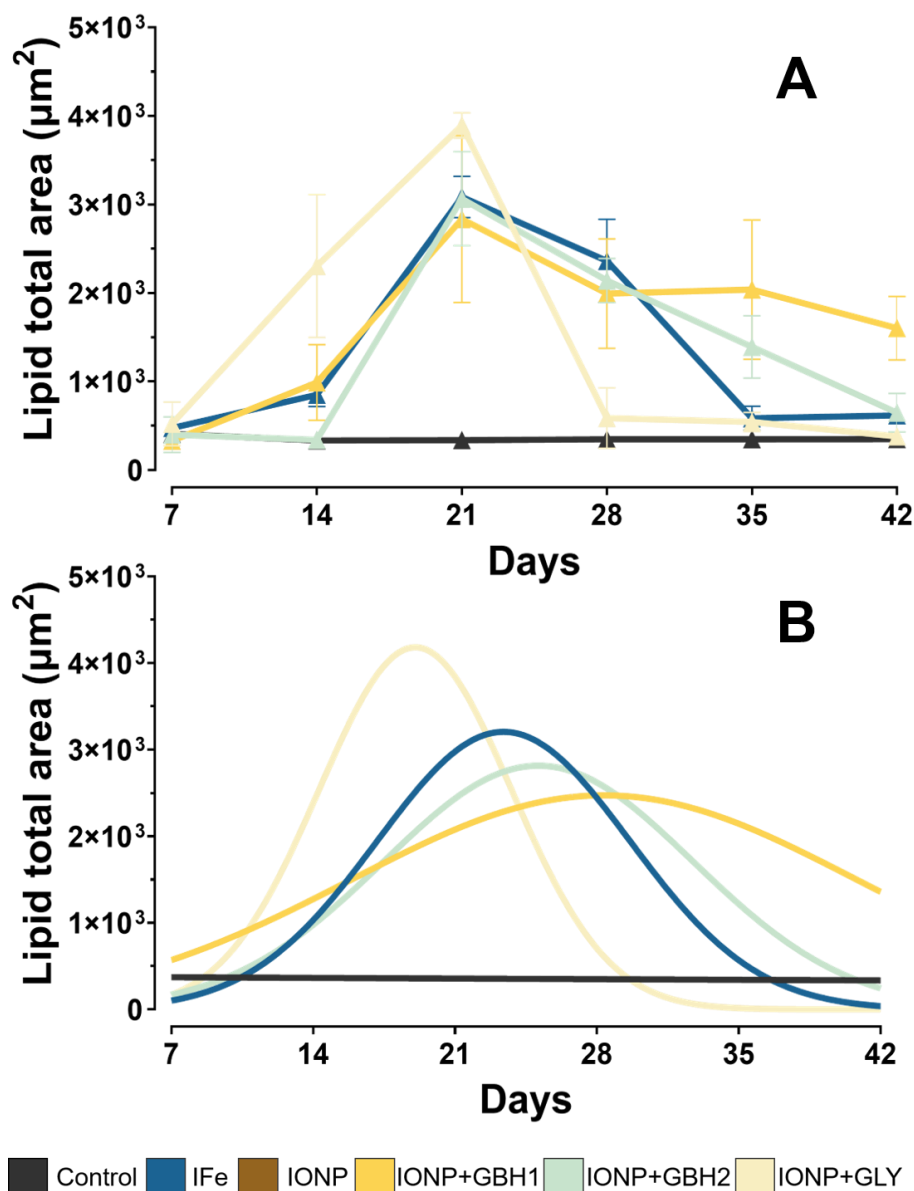


Figure 12: (A) Gráfico de área total ocupada por lipídeos; (B) Gráfico de curvas gaussianas com a distribuição da área total ocupada por lipídeos.

após o rompimento de uma barragem de minérios (Macêdo et al., 2020).

Além da comparação do ferro iônico e sua forma nanoparticulada, foi também objetivo deste trabalho analisar a distribuição de lipídeos nas células dos guppies expostos a GLY ou GBH associados as IONP, de modo que

estes tratamentos por sua vez mostraram

acúmulo relevante de lipídeos a partir do 21<sup>o</sup> dia de exposição. Nos guppies expostos a IONP+GLY, foi possível notar um aumento relevante na distribuição de lipídeos a partir de 14 dias de exposição, quando a área ocupada chegou a

ser 7,0 vezes maior ( $p=0,001$ ) que o grupo controle no mesmo período. Para além disto também é relevante ressaltar que o acúmulo de lipídeos em IONP+GLY foi 2,3 vezes maior ( $p=0,001$ ) do que em IONP+GBH1 e 6,7 vezes maior que IONP+GBH2 ( $p<0,001$ ).

Os animais submetidos ao tratamento IONP+GBH1 apresentaram um acúmulo 8,4 vezes maior ( $p<0,001$ ) do que o grupo controle, enquanto que o tratamento com IONP+GBH2 levou a um acúmulo de lipídeos nas células hepáticas 9,0 vezes maior ( $p<0,001$ ) que o grupo não tratado no mesmo período, o que chama a atenção para o fato de que o efeito de acumulação de lipídeos não teve relação ( $p>0,005$ ) com as concentrações de GBH associadas as IONP.

### **Conclusão**

Os peixes *Poecilia reticulata* estão suscetíveis a bioacumulação de ferro quando expostos a íons ferro, nanopartículas de óxido de ferro e IONP associadas a GBH e GLY, de modo que os animais tratados com IONP+GBH apresentaram um acúmulo mais expressivo de ferro do que os outros tratamentos. Este acúmulo de ferro, bem como a toxicidade das IONP e suas associações causaram danos na integridade do tecido hepático, bem como levou ao acúmulo de lipídeos nos hepatócitos dos guppies durante os 21 dias de exposição. Por outro lado, os animais apresentaram um potencial de recuperação dos danos ocorridos, a partir da eliminação de ferro e da reversão do acúmulo de lipídeos durante a pós-exposição. Sendo assim, este estudo colabora com o conhecimento das IONP e suas associações com GBH e GLY, como uma proposta de alternativa para remediação ambiental, a partir da compreensão da toxicidade, do impacto e da possibilidade de recuperação de organismos aquáticos submetidos aos tratamentos.

## **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado pela FAPEG – PPSUS (Edital 04/17 – Proj. 201710267001261 – FAPEG/SES-GO/ CNPq /MS-DECIT/2017 – PPSUS- GO) e pela FAPEG- FAPESP (Edital 04/19 – Proj. 2019011000085). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88882.386522/2019-01. Nossos agradecimentos ao Centro Regional de Tecnologia e Inovação (CRTI-UFG), Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) e ao Laboratório de Pesquisa em Morfologia Humana e Animal – UFG.

## **Bibliografia**

- Aich, A., Chattopadhyay, B., Mukhopadhyay, S.K., 2017. Immunolocalization of metallothionein in hepatocytes of guppy fish (*Poecilia reticulata*) exposed to tannery effluent: A biomarker study. *Chemosphere* 169, 460–466.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.099>
- Anila, P.A., Sutha, J., Nataraj, D., Ramesh, M., 2021. In vivo evaluation of Nano-palladium toxicity on larval stages and adult of zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 765, 144268.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144268>
- Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34, 458–479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>
- Antunes, A.M., Rocha, T.L., Pires, F.S., de Freitas, M.A., Leite, V.R.M.C., Arana, S., Moreira, P.C., Sabóia-Morais, S.M.T., 2017. Gender-specific

histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid. *J. Appl. Toxicol.* 37, 1098–1107. <https://doi.org/10.1002/jat.3461>

Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Kaya, H., Yilmaz, S., Camas, M., 2016. Chronic exposure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to iron oxide nanoparticles: Effects of particle morphology on accumulation, elimination, hematology and immune responses. *Aquat. Toxicol.* 177, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.005>

Baumann, J., Köser, J., Arndt, D., Filser, J., 2014. The coating makes the difference: Acute effects of iron oxide nanoparticles on *Daphnia magna*. *Sci. Total Environ.* 484, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.023>

Dasmahapatra, A.K., Dasari, T.P.S., Tchounwou, P.B., 2018. Graphene-Based Nanomaterials Toxicity in Fish, in: *How to Recruit Voluntary Donors in the Third World?* pp. 1–58. [https://doi.org/10.1007/398\\_2018\\_15](https://doi.org/10.1007/398_2018_15)

Deacon, A.E., Ramnarine, I.W., Magurran, A.E., 2011. How reproductive ecology contributes to the spread of a globally invasive fish. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024416>

Duke, S.O., 2018. The history and current status of glyphosate. *Pest Manag. Sci.* 74, 1027–1034. <https://doi.org/10.1002/ps.4652>

Gandahi, N.S., Gandahi, J.A., Yang, P., Tarique, I., Vistro, W.A., Haseeb, A., Huang, Y., Yu, L., Bai, X., Chen, Q., 2020. Ultrastructural Evidence of Melanomacrophagic Centers and Lipofuscin in the Liver of Zebrafish

- (Denio rerio). *Zebrafish* 17, 83–90. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1826>
- Geng, Y., Jiang, L., Zhang, D., Liu, B., Zhang, J., Cheng, H., Wang, L., Peng, Y., Wang, Y., Zhao, Y., Xu, Y., Liu, X., 2021. Glyphosate, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate ammonium in agricultural groundwater and surface water in China from 2017 to 2018: Occurrence, main drivers, and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 769, 144396. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144396>
- Guerra, F.D., Attia, M.F., Whitehead, D.C., Alexis, F., 2018. Nanotechnology for Environmental Remediation: Materials and Applications. *Molecules* 23, 1760. <https://doi.org/10.3390/molecules23071760>
- Guimarães, A.T.B., Estrela, F.N., Pereira, P.S., de Andrade Vieira, J.E., de Lima Rodrigues, A.S., Silva, F.G., Malafaia, G., 2021. Toxicity of polystyrene nanoplastics in *Ctenopharyngodon idella* juveniles: A genotoxic, mutagenic and cytotoxic perspective. *Sci. Total Environ.* 752, 141937. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141937>
- Hai, J., Piraux, H., Mazarío, E., Volatron, J., Ha-Duong, N.T., Decorse, P., Lomas, J.S., Verbeke, P., Ammar, S., Wilhelm, C., El Hage Chahine, J.-M., Hémadi, M., 2017. Maghemite nanoparticles coated with human serum albumin: combining targeting by the iron-acquisition pathway and potential in photothermal therapies. *J. Mater. Chem. B* 5, 3154–3162. <https://doi.org/10.1039/C7TB00503B>
- Harman, D., 1956. Aging: A Theory on Free Radical Radiation Chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.

- Hassan, S.S.M., Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2018. Removal of pyrene and benzo(a)pyrene micropollutant from water via adsorption by green synthesized iron oxide nanoparticles. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 015006. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aaa6f0>
- Hauser-Davis, R.A., Silva-Junior, D.R., Linde-Arias, A.R., Vianna, M., 2021. Cytosolic and Metallothionein-Bound Hepatic Metals and Detoxification in a Sentinel Teleost, *Dules auriga*, from Southern Rio de Janeiro, Brazil. *Biol. Trace Elem. Res.* 199, 744–752. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02195-8>
- Künstner, A., Hoffmann, M., Fraser, B.A., Kottler, V.A., Sharma, E., Weigel, D., Dreyer, C., 2016. The genome of the trinidadian guppy, *Poecilia reticulata*, and variation in the Guanapo population. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169087>
- Lai, W., Xu, D., Li, J., Wang, Z., Ding, Y., Wang, X., Li, X., Xu, N., Mai, K., Ai, Q., 2021. Dietary polystyrene nanoplastics exposure alters liver lipid metabolism and muscle nutritional quality in carnivorous marine fish large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *J. Hazard. Mater.* 419. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126454>
- Li, M.-H., Xu, H.-D., Liu, Y., Chen, T., Jiang, L., Fu, Y.-H., Wang, J.-S., 2016. Multi-tissue metabolic responses of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to glyphosate-based herbicide. *Toxicol. Res. (Camb)*. 5, 1039–1052. <https://doi.org/10.1039/C6TX00011H>
- Macêdo, A.K.S., Santos, K.P.E. dos, Brighenti, L.S., Windmüller, C.C., Barbosa, F.A.R., Ribeiro, R.I.M. de A., Santos, H.B. dos, Thomé, R.G., 2020.

- Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. *Sci. Total Environ.* 735, 139505. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139505>
- Martens, U., Böttcher, D., Talbot, D., Bornscheuer, U., Abou-Hassan, A., Delcea, M., 2019. Maghemite nanoparticles stabilize the protein corona formed with transferrin presenting different iron-saturation levels. *Nanoscale* 11, 16063–16070. <https://doi.org/10.1039/C9NR04967C>
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75–88. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>
- Martins, A.W.S., Silveira, T.L.R., Remião, M.H., Domingues, W.B., Dellagostin, E.N., Junior, A.S.V., Corcini, C.D., Costa, P.G., Bianchini, A., Somoza, G.M., Robaldo, R.B., Campos, V.F., 2021. Acute exposition to Roundup Transorb® induces systemic oxidative stress and alterations in the expression of newly sequenced genes in silverside fish (*Odontesthes humensis*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15239-w>
- Mesnage, R., Benbrook, C., Antoniou, M.N., 2019. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food Chem. Toxicol.* 128, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053>
- Mijošek, T., Filipović Marijić, V., Dragun, Z., Krasnići, N., Ivanković, D., Erk, M., 2019. Evaluation of multi-biomarker response in fish intestine as an initial indication of anthropogenic impact in the aquatic karst environment. *Sci.*

Total Environ. 660, 1079–1090.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.045>

Mohapatra, S., Kumar, R., Sundaray, J.K., Patnaik, S.T., Mishra, C.S.K.,  
Rather, M.A., 2021. Structural damage in liver, gonads, and reduction in  
spawning performance and alteration in the haematological parameter of  
*Anabas testudineus* by glyphosate- a herbicide. *Aquac. Res.* 52, 1150–  
1159. <https://doi.org/10.1111/are.14973>

Mohmood, I., Ahmad, I., Asim, M., Costa, L., Lopes, C.B., Trindade, T., Duarte,  
A.C., Pereira, E., 2015. Interference of the co-exposure of mercury with  
silica-coated iron oxide nanoparticles can modulate genotoxicity induced by  
their individual exposures-a paradox depicted in fish under in vitro  
conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 3687–3696.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3591-3>

Mosiagin, I.P., Furasova, A.D., Kozlova, M.A., Osmolowsky, M.G.,  
Osmolovskaya, O.M., 2015. Thermodynamic parameters of bovine serum  
albumin adsorption at the surface of various nanoparticles. *Russ. J. Gen.  
Chem.* 85, 2654–2656. <https://doi.org/10.1134/S1070363215110249>

Moura, F.R., Lima, R.R.S., Cunha, A.P.S., Costa Marisco, P., Aguiar, D.H.,  
Sugui, M.M., Sinhoro, A.P., Sinhoro, V.D.G., 2017. Effects of glyphosate-  
based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological  
aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. *Environ. Toxicol.  
Pharmacol.* 56, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.019>

Muckenthaler, M.U., Galy, B., Hentze, M.W., 2008. Systemic Iron Homeostasis  
and the Iron-Responsive Element/Iron-Regulatory Protein (IRE/IRP)

Regulatory Network. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 197–213.

<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521>

Muraro, P.C.L., Mortari, S.R., Vizzotto, B.S., Chuy, G., dos Santos, C., Brum, L.F.W., da Silva, W.L., 2020. Iron oxide nanocatalyst with titanium and silver nanoparticles: Synthesis, characterization and photocatalytic activity on the degradation of Rhodamine B dye. *Sci. Rep.* 10, 3055.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59987-0>

Murussi, C.R., Costa, M.D., Leitemperger, J.W., Guerra, L., Rodrigues, C.C.R., Menezes, C.C., Severo, E.S., Flores-Lopes, F., Salbego, J., Loro, V.L., 2016. Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 445–455.

<https://doi.org/10.1007/s10695-015-0150-x>

Navarro, C.D.C., Martinez, C.B.R., 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 165, 83–90.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.06.003>

Naz, S., Hussain, R., Ullah, Q., Chatha, A.M.M., Shaheen, A., Khan, R.U., 2021. Toxic effect of some heavy metals on hematology and histopathology of major carp (*Catla catla*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 6533–6539.

<https://doi.org/10.1007/s11356-020-10980-0>

Nwonumara, G.N., Okogwu, O.I., 2020. Oxidative and biochemical responses as indicators of chemical stress in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) juvenile exposed to glyphosate. *Sci. African* 8, e00373.

<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00373>

OECD, 2019. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Guidel. Test. Chem.

<https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>

Parente, C.E.T., Lino, A.S., Carvalho, G.O., Pizzochero, A.C., Azevedo-Silva, C.E., Freitas, M.O., Teixeira, C., Moura, R.L., Ferreira Filho, V.J.M., Malm, O., 2021. First year after the Brumadinho tailings' dam collapse: Spatial and seasonal variation of trace elements in sediments, fishes and macrophytes from the Paraopeba River, Brazil. *Environ. Res.* 193.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110526>

Park, H., May, A., Portilla, L., Dietrich, H., Münch, F., Rejek, T., Sarcletti, M., Banspach, L., Zahn, D., Halik, M., 2020. Magnetite nanoparticles as efficient materials for removal of glyphosate from water. *Nat. Sustain.* 3,

129–135. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0452-6>

Peixoto, M.M., Bauerfeldt, G.F., Herbst, M.H., Pereira, M.S., da Silva, C.O., 2015. Study of the Stepwise Deprotonation Reactions of Glyphosate and the Corresponding p K a Values in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. A*

119, 5241–5249. <https://doi.org/10.1021/jp5099552>

Prado, Y., Daffé, N., Michel, A., Georgelin, T., Yaacoub, N., Grenèche, J.-M., Choueikani, F., Otero, E., Ohresser, P., Arrio, M.-A., Cartier-dit-Moulin, C., Sainctavit, P., Fleury, B., Dupuis, V., Lisnard, L., Fresnais, J., 2015.

Enhancing the magnetic anisotropy of maghemite nanoparticles via the surface coordination of molecular complexes. *Nat. Commun.* 6, 10139.

<https://doi.org/10.1038/ncomms10139>

- Qualhato, G., Rocha, T.L., de Oliveira Lima, E.C., e Silva, D.M., Cardoso, J.R., Grisolia, C.K., de Saboia-Morais, S.M., 2017. Genotoxic and mutagenic assessment of iron oxide (maghemite- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticle in the guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 183, 305–314.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.061>
- Qualhato, G., Sabóia-Morais, S.M.T., Silva, L.D., Rocha, T.L., 2018. Melanomacrophage response and hepatic histopathologic biomarkers in the guppy *Poecilia reticulata* exposed to iron oxide (maghemite) nanoparticles. *Aquat. Toxicol.* 198, 63–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.014>
- Rivoira, L., Appendini, M., Fiorilli, S., Onida, B., Del Bubba, M., Bruzzoniti, M.C., 2016. Functionalized iron oxide/SBA-15 sorbent: investigation of adsorption performance towards glyphosate herbicide. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 21682–21691. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7384-8>
- Rodrigues, L. de B., Gonçalves Costa, G., Thá, E.L., Silva, L.R., Oliveira, R., Leme, D.M., Cestari, M.M., Grisolia, C.K., Valadares, M.C., Oliveira, G.A.R., 2019. Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 842, 94–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.002>
- Samanta, P., Kumari, P., Pal, S., Mukherjee, A., Ghosh, A., 2018. Histopathological and ultrastructural alterations in some organs of *Oreochromis niloticus* exposed to glyphosate-based herbicide, excel mera 71. *J. Microsc. Ultrastruct.* 6, 35. [https://doi.org/10.4103/jmau.jmau\\_8\\_18](https://doi.org/10.4103/jmau.jmau_8_18)

- Santos, T.R.T., Andrade, M.B., Silva, M.F., Bergamasco, R., Hamoudi, S.,  
2019. Development of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> decorated graphene oxides for  
glyphosate removal from water. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 40,  
1118–1137. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1411397>
- Sayadi, M.H., Mansouri, B., Shahri, E., Tyler, C.R., Shekari, H., Kharkan, J.,  
2020. Exposure effects of iron oxide nanoparticles and iron salts in  
blackfish (*Capoeta fusca*): Acute toxicity, bioaccumulation, depuration, and  
tissue histopathology. *Chemosphere* 247, 125900.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125900>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch,  
T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y.,  
White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012.  
Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9,  
676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Shiogiri, N.S., Paulino, M.G., Carraschi, S.P., Baraldi, F.G., Cruz, C.,  
Fernandes, M.N., 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide  
affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*.  
*Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34, 388–396.  
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.007>
- Sobjak, T.M., Romão, S., do Nascimento, C.Z., dos Santos, A.F.P., Vogel, L.,  
Guimarães, A.T.B., 2017. Assessment of the oxidative and neurotoxic  
effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish.  
*Chemosphere* 182, 267–275.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.031>

- Sonne, C., Bach, L., Søndergaard, J., Rigét, F.F., Dietz, R., Mosbech, A., Leifsson, P.S., Gustavson, K., 2014. Evaluation of the use of common sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) organ histology as bioindicator for element exposure in the fjord of the mining area Maarmorilik, West Greenland. *Environ. Res.* 133, 304–311.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.05.031>
- Trigueiro, N.S.D.S.N.S. de S., Gonçalves, B.B.B.B., Dias, F.C.F.C., de Oliveira Lima, E.C.E.C.E.C.E.C.E.C., Rocha, T.L.T.L., Sabóia-Morais, S.M.T.S.M.T., de Souza Trigueiro, N.S., Gonsalves, B.B., Dias, F.C.F.C., de Oliveira Lima, E.C.E.C.E.C.E.C.E.C., Rocha, T.L.T.L., Teixeira Saboia-Morais, S.M., Trigueiro, N.S.D.S.N.S. de S., Gonçalves, B.B.B.B., Dias, F.C.F.C., Lima, E.C.O., Rocha, T.L.T.L., Sabóia-Morais, S.M.T.S.M.T., de Oliveira Lima, E.C.E.C.E.C.E.C.E.C., Rocha, T.L.T.L., Sabóia-Morais, S.M.T.S.M.T., 2021. Co-exposure of iron oxide nanoparticles and glyphosate-based herbicide induces DNA damage and mutagenic effects in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 81, 103521.  
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103521>
- Uren Webster, T.M., Laing, L. V., Florance, H., Santos, E.M., 2014. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 48, 1271–1279.  
<https://doi.org/10.1021/es404258h>
- Valdiglesias, V., Fernández-Bertólez, N., Kiliç, G., Costa, C., Costa, S., Fraga, S., Bessa, M.J., Pásaro, E., Teixeira, J.P., Laffon, B., 2016. Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *J. Trace*

- Elem. Med. Biol. 38, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.03.017>
- Valsami-Jones, E., Lynch, I., 2015. How safe are nanomaterials? *Science* (80-.). 350, 388–389. <https://doi.org/10.1126/science.aad0768>
- Wolf, J.C., Wheeler, J.R., 2018. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquat. Toxicol.* 197, 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.013>
- Xu, P., Zeng, G.M., Huang, D.L., Feng, C.L., Hu, S., Zhao, M.H., Lai, C., Wei, Z., Huang, C., Xie, G.X., Liu, Z.F., 2012. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: A review. *Sci. Total Environ.* 424, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2012.02.023>
- Yakar, A., Ünlü, A., Yeşilçayır, T., Bıyık, İ., 2020. Kinetics and thermodynamics of textile dye removal by adsorption onto iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol. Environ. Eng.* 5. <https://doi.org/10.1007/s41204-020-0068-0>
- Zhang, Y., Zhu, L., Zhou, Y., Chen, J., 2015. Accumulation and elimination of iron oxide nanomaterials in zebrafish (*Danio rerio*) upon chronic aqueous exposure. *J. Environ. Sci.* 30, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.08.024>
- Zheng, T., Jia, R., Cao, L., Du, J., Gu, Z., He, Q., Xu, P., Yin, G., 2021. Effects of chronic glyphosate exposure on antioxidant status, metabolism and immune response in tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 239, 108878. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108878>

Zhu, X., Tian, S., Cai, Z., 2012. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. PLoS One 7, e46286.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046286>

## **CAPÍTULO 4**

### **EVALUATION OF THE DISTRIBUTION AND ORGANIZATION OF LIPIDS IN HEPATIC TISSUE BY LIGHT MICROSCOPY AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY**

Este capítulo apresenta uma proposta metodológica executada a partir de adaptações de metodologias prévias e inclusão de uma técnica de avaliação de distribuição de lipídeos utilizando software de análise de imagens

---

**Method Article – Title Page**

<b>Title</b>	<i>Evaluation of the distribution and organization of lipids in hepatic tissue by light microscopy and scanning electron microscopy</i>
<b>Authors</b>	<i>João Marcos de Lima Faria<sup>a</sup>, Lucas Nunes Guimarães<sup>a</sup>, Victória Costa da Silva<sup>a</sup>, Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais<sup>a*</sup></i>
<b>Affiliations</b>	<i><sup>a</sup>Laboratory of Cellular Behavior, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás</i>
<b>Corresponding Author's email address</b>	<i>simonesaboias@gmail.com</i>
<b>Keywords</b>	<i>Lipid, osmium, hematoxylin, toluidine blue, scanning electron microscopy, backscattered electrons, Image J, Fiji, Poecila reticulata, fish, guppy, lipid peroxidation, steatosis, SEM, SEM-BEC, TEM, methacrylate, historesin, toxicity, hepatotoxicity</i>
<b>Direct Submission or Co-Submission</b>	<i>Direct Submission</i>

**ABSTRACT**

Toxicity evaluations involve the analysis of multiple biomarkers, among them the accumulation of lipids in the liver of organisms, considering that the distribution of lipids in organs is closely related to inflammatory processes induced by contaminants. In this sense, this work proposes an integrated approach to evaluate the behavior and distribution of lipids in the liver, from the improvement of histological techniques and the proposal of a new way to evaluate the distribution of lipid droplets using elemental analysis by backscattered electron detection in scanning electron microscopy. In this proposal the methods start initially from the post-fixation of the liver with osmium tetroxide for lipid staining, from this are proposed two methodologies of inclusion in methacrylate and staining with Mayers hematoxylin and toluidine blue, in addition to histological methodologies, is presented an innovative technique for obtaining and processing images by electron backscattered scanning electron microscopy.

- Histological stains are low complexity methods that allow optimal localization and distribution of lipid droplets in liver tissue under conventional light microscopy.
- Blocks with samples used for transmission electron microscopy can be used for analysis by backscattered electron detection (SEM-BEC), complementing the research data.

- Because of the high contrast of the lipid zones with osmium in SEM-BEC it is possible to quantify the area occupied by the lipid droplets using threshold with Image J Fiji software.

## SPECIFICATIONS TABLE

<b>Subject Area</b>	Agricultural and Biological Sciences
<b>More specific subject area</b>	
<b>Method name</b>	<i>Evaluation of lipid distribution in osmium-fixed hepatic tissue by light microscopy and scanning electron microscopy.</i>
<b>Name and reference of original method</b>	A method for staining epoxy sections for light microscopy [1]
<b>Resource availability</b>	<i>Image J Fiji [2] <a href="https://imagej.nih.gov/ij/download.html">https://imagej.nih.gov/ij/download.html</a> and <a href="https://imagej.net/Fiji/Downloads">https://imagej.net/Fiji/Downloads</a></i>

## Method details

### Background

Toxicity tests around the world are carried out to verify risk, danger, and safety of substances, whether relevant to human health or the environment. Among these tests are those performed with fish to investigate the toxicity to aquatic organisms, and there are standardizations and technical norms for performing the tests with various species, which has made this type of evaluation increasingly recurrent in the field of environmental health studies. Among the fishes submitted to the tests, it is common to find *Danio rerio* - with a genome 70% close to the human - and *Poecilia reticulata* - a great environmental biomonitor.

Given the relevance of understanding the toxicity of substances and mixtures, researchers in the area seek a multiple biomarker approach, since the relationship between biomarkers allows understanding the complexity of the interaction of contaminants with the organism. Thus, in the extensive set of animal health biomarkers it is possible to evaluate oxidative stress involving lipid peroxidation processes and lipid accumulation in fish. In this sense, this methodological proposal brings: 1) an improvement of techniques for lipid labeling with osmium, already described in previous works [1,2]; and 2) a new proposal for analysis of the distribution of hepatocyte steatosis in fish, using the elemental analysis interface of scanning electron microscopy.

### Methodology description

The samples obtained in this work were collected from an experiment conducted by the research group, with approval by the research ethics committee on the use of animals under number 046/2017. Females of the fish *Poecilia reticulata* were

subjected to exposure by a contaminant pesticide for 21 days. The animals were euthanized by cooling and dissected for liver extraction in dorsal decubitus. The collected livers were fixed for 24 hours in 2.5% glutaraldehyde solution diluted in 0.1M sodium phosphate buffer.

The highlight of this work is the post-fixation for 2 hours in 1% osmium tetroxide solution, since osmium has affinity for lipid molecules, thus highlighting the phospholipids of the cell membrane and the endomembrane system, as well as the lipid droplets in the cytoplasm of the cell, so after fixation, the organs were divided into 2 fragments that went to post-fixation. Both fixation and post-fixation were done in a refrigerator and the fragments were destined according to the following methodologies.

### **Histological analyses**

A liver fragment post-fixed in osmium was dehydrated for 30 minutes in 70% alcohol and 30 minutes in 95% alcohol, followed by infiltration in historesin methacrylate (Historesin, Leica). The fragment was left in a 1:1 solution of historesin and alcohol absolute (v/v) for 2 hours, then in a 2:1 solution of historesin and alcohol absolute (v/v) for 1 hour, and finally in pure historesin for another 2 hours. After infiltration, the material was placed in histological molds and included in historesin with hardener, and polymerized in an oven at 60°C for 48 hours. After polymerization, the samples were taken to the ultramicrotome (Leica Ultracut UCT, Leica), where 2.5µm thick sections were obtained. The sections were transferred to water drops on a glass slide and placed to dry on a hot plate. The mounted slides proceeded to two different stains, as follows.

Important: osmium precipitates in solvents such as alcohol and xylene, so the sections show instability in osmium staining if the slide is mounted with Entellan® mounting medium. Our team has tested mounting with glycerin and gelatin, but methacrylate hydrates and deforms. Therefore, the slides should be mounted with Entellan® immediately before the analysis, with a maximum validity of 24 hours, after this period the osmium staining starts to become transparent and disappears.

### Osmium with Mayer's hematoxylin

For staining with Meyer's hematoxylin, the slides with sections were hydrated by immersion in distilled water for 10 minutes, proceeding to immersion in Mayer's hematoxylin for 35 minutes, then the slides were washed in running water for 5 minutes and dried in a drying oven. It is important to note that methacrylate is dissolved in alcohol, so Meyer's hematoxylin was the option chosen to stain the sections because it does not contain alcohol in its formulation. The staining with Meyer's hematoxylin is interesting for marking the basophilic compounds of the tissue as the cell nuclei, membranes and fibers, allowing a better location of the cells, while on the other hand it does not stain the cytoplasm, so it is possible to see the distribution of lipid droplets in the tissue and their intracellular relation, as shown in figure 1.

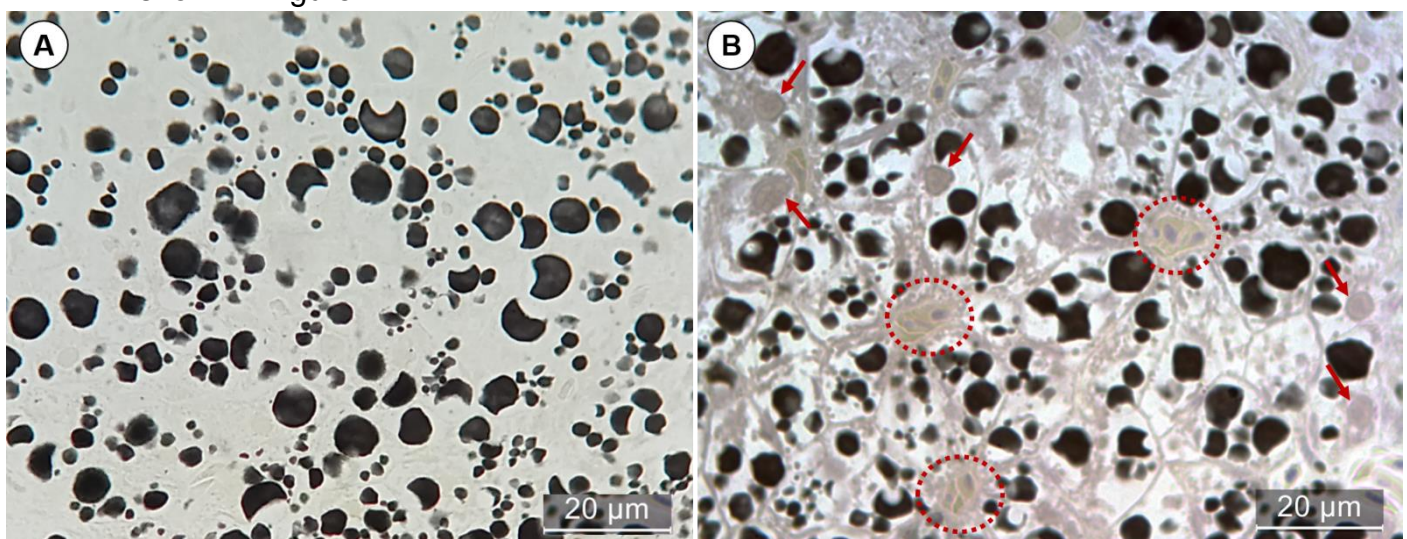
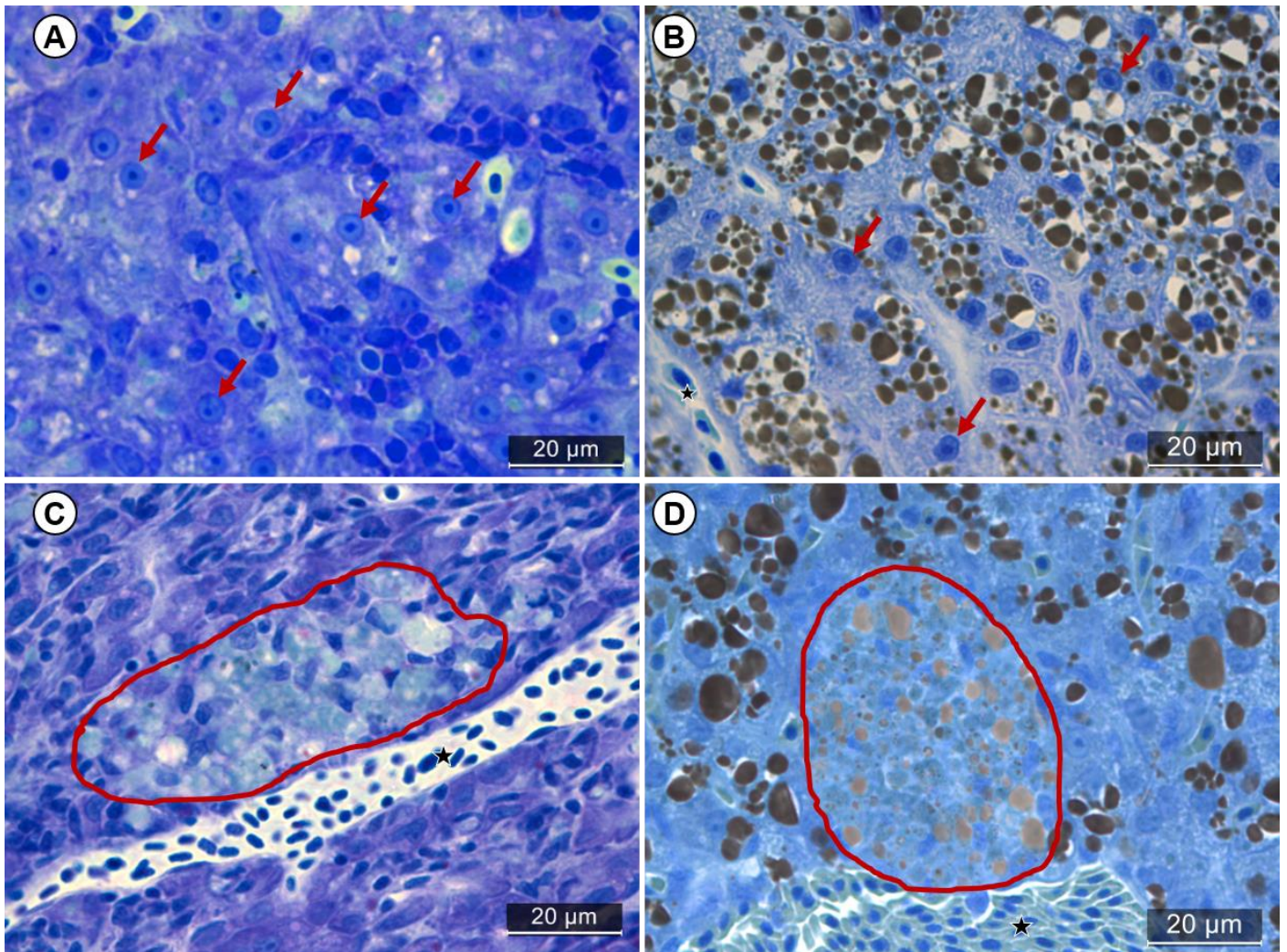


Figure 13: *Poecilia reticulata* liver tissue post-fixed with osmium before (A) and after (B) Mayer's hematoxylin staining. Without hematoxylin staining (A), it is not possible to locate the droplets in the cells, while in stained tissue (B) it is possible to visualize the nuclei (red arrows), as well as other structures such as blood vessels (dotted).

### Osmium with toluidine blue

For the second staining method, immediately after drying the slides, the sections were covered with 1% toluidine blue solution at pH 5.2 and placed on a hot plate until a golden ring was formed on the dye drops - which takes approximately 1 minute at 55°C, after which, the slides were washed with distilled water to remove the excess dye. In this step, it is important to observe if the intensity of the staining is interesting to the user, because as toluidine blue and osmium combine the staining can be too intense, especially in the medullary regions of the liver, if this occurs leave the slides on the heating plate for a shorter time.

Toluidine blue is a widely used dye for staining methacrylate-embedded samples, as it is able to stain carboxyl groups, sulfates and phosphates in tissue when at neutral pH to 4.0 [3]. Thus, we chose to use toluidine blue because it stains in addition to the nucleus, the cytoplasm and membranes of the cells (Fig. 2).



**Figure 14:** Toluidine blue staining of *Poecilia reticulata* liver tissue without osmium (A,C) and post-fixed with 1% osmium (B,D). Toluidine blue staining alone traditionally marks most of the structural components of cells, with greater intensity in nuclei (red arrows), and also marks melanomacrophage sites (red rounded) in lighter shades of blue and does not stain erythrocytes with intensity. On the other hand, when toluidine blue staining is applied to post osmium-fixed tissue it is possible to note the increased delimitation of cells by the intensity of membrane staining (B,D). Because of the blue+osmium combination the red blood cells are highlighted in the vessels (star) and in the melanomacrophage sites it is possible to identify the areas of lipofuscin pigment arranged in light brown droplets in the sites (D).

In this sense, the combination of toluidine blue with osmium highlights the membranes by the sum of the contrast of the dye with osmium (Fig. 2 B and D), which allows us to analyze the distribution of lipid droplets and their respective organization in the cells, also highlighting structures that only the osmium staining would not highlight, such as melanomacrophage sites, exudates and leukocyte infiltrations (Fig. 2D). Furthermore, the combination of the techniques in methacrylate allows us to relate the arrangement of lipids with processes of inflammatory responses in relation to exposure to contaminants, such as the localization of lipid congested ducts, the formation of macro- and micro-stasis in hepatocytes (Fig 2B), as well as the localization of lipofuscin at melanomacrophage sites (Fig 2D).

### **Scanning electron microscopy analyses**

In the methodology described below, our group tried to take advantage of material destined for transmission electron microscopy to answer complementary questions about the behavior of lipids in the liver of fish exposed to contaminants, with this, we managed to optimize the material obtaining in the same sample ultrastructural information by TEM and elemental information by SEM.

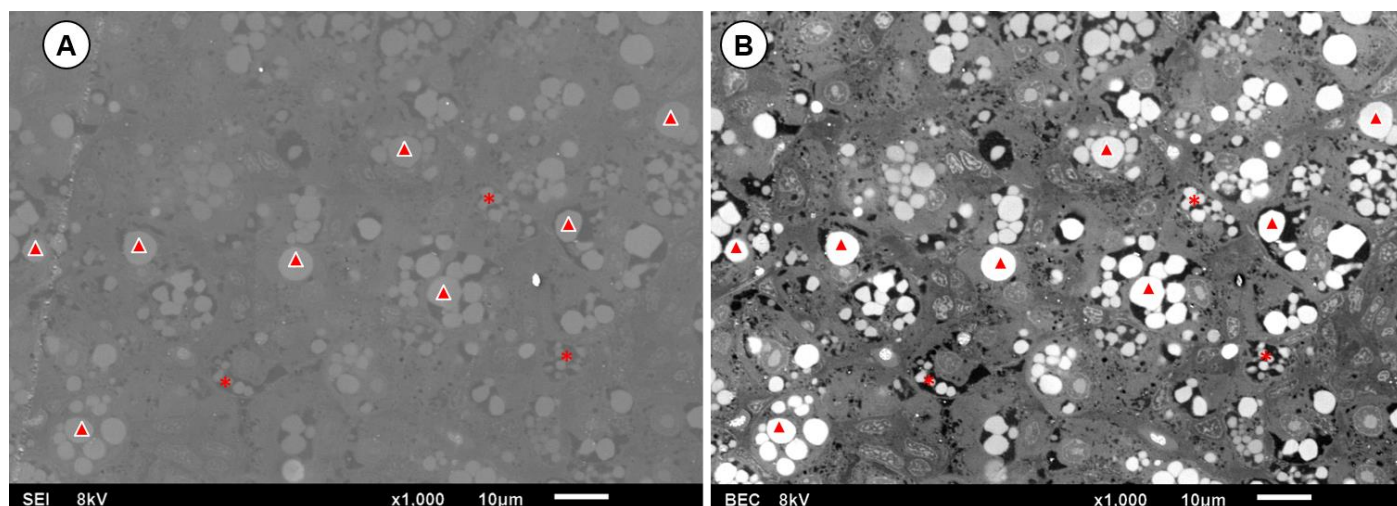
In this sense, the second liver fragment, after post-fixation with osmium tetroxide followed the sample processing for transmission electron microscopy. The sample was dehydrated in acetone 30-100% and then infiltrated in: 1) 1:1 (v/v) solution of epoxy resin (Embed 812, EMS) and acetone absolute for 24 hours, 2) 2:1 (v/v) solution of epoxy resin and acetone absolute for another 24 hours, and 3) pure epoxy resin for 24 hours. The infiltrated material was placed in BEEM® capsules and polymerized in an oven at 60°C for 48 hours. After polymerization, the blocks obtained were trimmed and taken to the ultramicrotome (Leica Ultracut UCT, Leica), where they were thinned until the exposure of the sample in the resin block. At this time, other sections were obtained for transmission electron microscopy that complemented the other work of the team, which shows the optimization of the material in the research.

The roughened blocks were positioned in stubs vertically, so that the surface with the sample was upwards, then the stubs with the samples were taken to the university's multi-purpose high-resolution electron microscopy laboratory (LabMic) for coating with an evaporation carbon coating system (JEE-420, JEOL). The stubs with the blocks were taken to the scanning electron microscope, where the analyses continued.

### **Backscattered electron scanning electron microscopy (SEM-BEC): imaging**

In the field of natural sciences, it is conventional to use images obtained by secondary electrons, these electrons have energy below 50eV and provide topographic information when interacting with the valence layers of atoms in scanning electron microscopy (Fig. 3A). However, seeking to identify the lipids in the samples, the research team sought to associate elemental analysis techniques to obtain accurate information, in this sense, analysis was performed by backscattered electrons.

The backscattered electrons interact with the nuclei of the sample atoms, so that more electrons are detected as the atomic number of the element increases. Osmium has a high atomic number (76), so by backscattered electron analysis the regions with osmium will be brighter, as osmium has an affinity for lipids, using this technique the lipid droplets will be brighter, which is confirmed in figure 3B.



**Figure 15:** Scanning electron microscopy of the liver tissue of *Poecila reticulata* with images obtained by secondary electron detection (A) and backscattered electron detection (B). Secondary electron detection (A) provides images of the topography of the sample, so in this case it is an image with low contrast between the elements. On the other hand, backscattered electron detection (B) provides elementary information, with brightness proportional to the atomic number of the materials. Because of the osmium affinity with lipids and its high atomic number in relation to the other elements in the sample, it is possible to observe that both macro steatosis (triangles) and micro steatosis (asterisks) are highlighted with high brightness, allowing an analysis with greater definition of the distribution of lipids in the tissue.

### **Backscattered electron scanning electron microscopy (SEM-BEC): image processing with Image J Fiji**

**Table 2:** Image processing Step-by-step to realize threshold and obtain data of area and quantity of lipid droplets on software Image J Fiji

Step	Activity
1 Open image and set scale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1) Draw a line on the scale bar of the image; 2) analyze, set scale; 3) enter the distance known as the scale bar size; 4) enter the unit of measure.</li> </ul>
2 Apply the threshold to the image (Fig. 4 B)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1) Image, threshold or CTRL+Shift+T; 2) set the interval in the histogram to mark only lipid droplets and apply the threshold. Note that some regions that are not of interest may be marked, they will be removed in the next step.</li> </ul>
3 Remove unnecessary information (Fig. 4C)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Using the rectangle tool, delete areas with unnecessary information (e.g. scale bar, texts, vessel regions, artifacts and imperfections).</li> </ul>
4 Measuring lipid droplets (Fig. 4D)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1) Analyze, analyze particles...; 2) set a minimum measurement size, to prevent the software from counting very small spots that can be waste or osmium traces that are not of interest, we suggest a minimum</li> </ul>

- |   |       |  |
|---|-------|--|
| 5 | Check | <p>size of <math>0.15\mu\text{m}^2</math>; 3) to see the labeled droplets, select Show, overlay or outlines; 4) Ok</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Check that there are no undesirable items marked and that as many lipid droplets as possible have been marked, if you want, you can change the minimum size and shape of the particles you want to measure.</li> </ul> |
|---|-------|--|

The images obtained by backscattered electrons (Fig. 3B) can identify the composition of materials composed by several elements, so that an important characteristic for this diagnosis is the contrast of the images. Seeking to take advantage of the high contrast of the images, in this work an analysis is proposed using the open source software Image J Fiji [4]. Table 1 lists the steps to be followed in the software.

The data obtained show the area of the droplets, as well as allow us to evaluate the distribution of lipids and diagnose the formation of micro and macro steatosis. Thus, in conjunction with the histological analyses described here, evaluation by

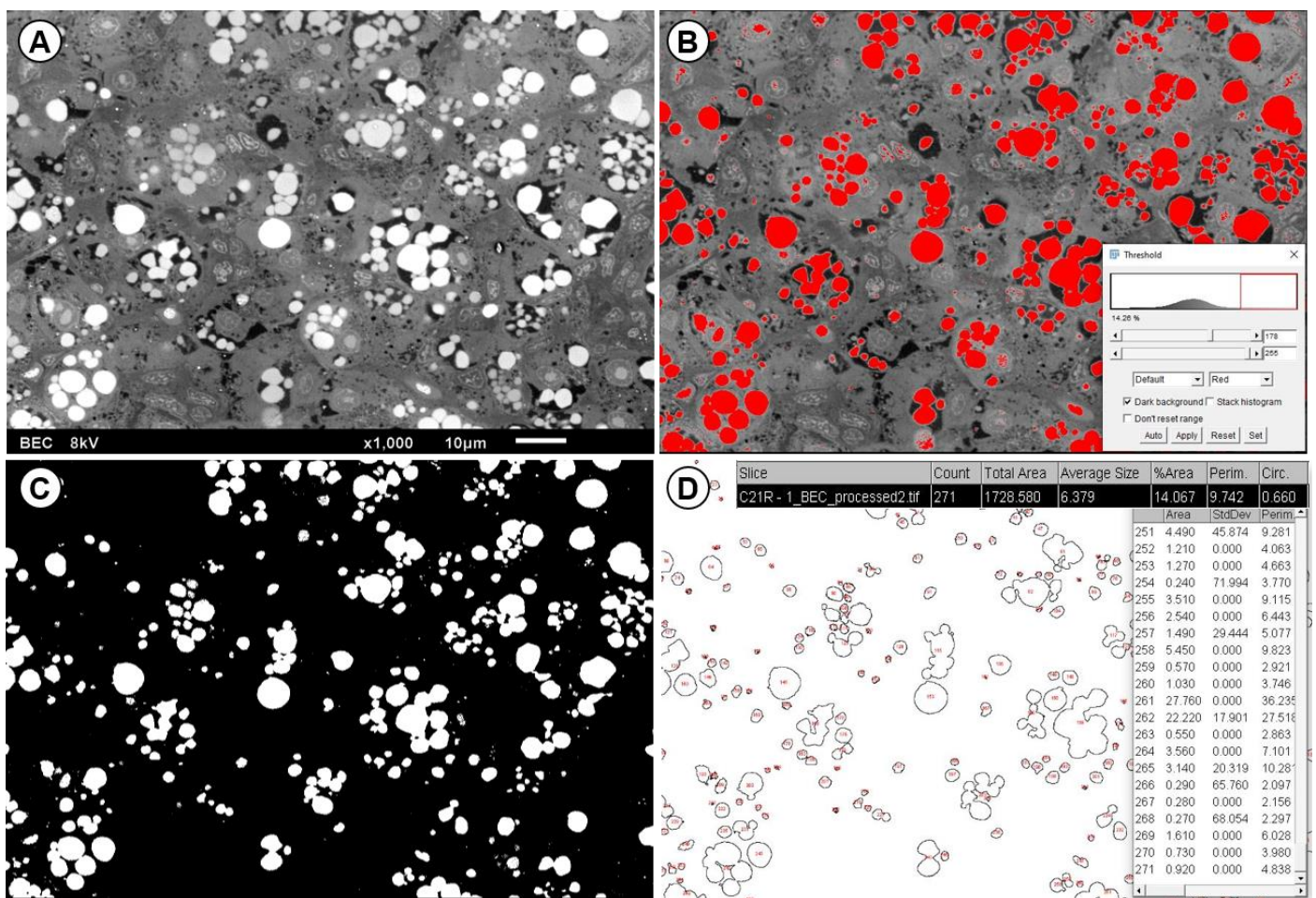


Figure 16: SEM-BEC image processing in Image J Fiji software. The original image is opened in the program and the scale is set (A); after the scale is set, the threshold area is defined to identify only the lipid droplets (B); the areas with artifacts and objects that are not of interest are cleaned and the threshold is applied (C); the minimum detection size is set in the particle analysis and measurements of the quantity and area of the lipid droplets are performed (D).

SEM-BEC is of high complementary potential, since it is possible to observe and quantify micro and macro steatosis in hepatocytes.

### Methods validation

For the histological evaluations, figure 1B show the difference of the tissue stained with Mayer's hematoxylin when compared to figure 1A without hematoxylin. Similarly, toluidine blue staining is validated by comparing the images with the traditional staining method (Fig. 2 A and C) and those with osmium-fixed material (Fig. 2 B and D). The SEM-BEC technique was validated by performing elemental analysis by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), as shown in figure 5, confirming the presence of osmium in regions of intense bright staining the lipid droplets..

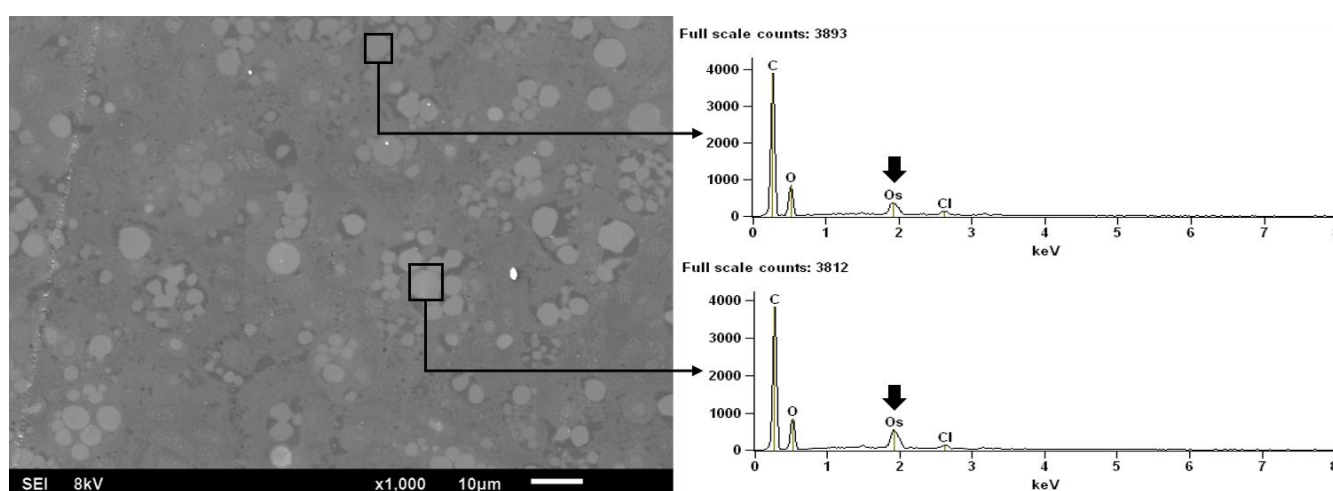


Figure 17: Elemental analysis by energy dispersive Xray spectroscopy (EDS) in liver tissue of *Poecilia reticulata*. The spectrums corresponds to highlighted zones in electronmicrography and it is possible to note the osmium presence (black arrow) in lipid droplets.

### Acknowledgements:

This study was funded by FAPEG-PPSUS (Edital 04/17 – Proj. 201710267001261 – FAPEG/SES-GO/CNPq/MS-DECIT/2017 – PPSUS-GO) and from FAPEG-FAPESP (Edital 04/19 – Proj. 2019011000085). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 88882.386522/2019-01. The authors also acknowledge the Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução from Universidade Federal de Goiás (LabMic-UFG) for their collaboration with the electron microscopy facilities

### Declaration of interests:

✓ The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

**References:**

- [1] B.F. Trump, E.A. Smuckler, E.P. Benditt, A method for staining epoxy sections for light microscopy, *J. Ultrastruct. Res.* 5 (1961) 343–348. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(61\)80011-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(61)80011-7).
- [2] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: An open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods.* 9 (2012) 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.

## **CAPÍTULO 5**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO**

### **Sobre os dados obtidos e resultados apresentados**

Os nanomateriais são ferramentas promissoras para utilização nos mais diversos campos da tecnologia, por apresentarem características específicas relacionadas diretamente ao fato de serem estruturas nanométricas, como: a maior relação de área e superfície de contato; as especificidades eletrônicas e a possibilidade de atuarem em nível intracelular. Dentre estes nanomateriais, as nanopartículas de óxido de ferro foram as escolhidas para realização do presente trabalho, por ser de síntese viável, ser magnética e apresentar possibilidade de adsorção de contaminantes como o glifosato em sua superfície.

Neste sentido, este estudo foi guiado a partir da justificativa de que as IONP podem adsorver o glifosato – que é um pesticida com potencial tóxico mundialmente conhecido – em sua superfície, o que torna as IONP uma ferramenta em potencial para o desenvolvimento de métodos de remediação de solos e água contaminados com glifosato. Todavia, para o desenvolvimento de uma estratégia segura utilizando as IONP se fez necessário investigar os efeitos tóxicos das nanopartículas, bem como de sua parte iônica – resultante da dissolução oxidativa das IONP – e das associações das IONP com o glifosato puro e sua fórmula comercial que é o Roundup®, logo, foi nesta perspectiva de colaborar com o desenvolvimento de uma estratégia segura que este trabalho avaliou a toxicidade e a possibilidade de recuperação nas exposições aos tratamentos com IONP, IFe e associações de IONP+GLY e GBH no modelo biológico internacionalmente reconhecido e recomendado *Poecilia reticulata*,.

As análises abordadas no presente estudo passaram por planejamentos extensos, sempre em busca de avaliações de múltiplos biomarcadores com o objetivo de gerar informações sobre a complexa resposta do modelo biológico

escolhido, portanto foram avaliados biomarcadores biométricos, de integridade celular e tecidual, além de bioacumulação e distribuição de lipídeos.

Os resultados obtidos, a partir da análise destes biomarcadores mostraram que o tanto os íons ferro, quanto as IONP isoladas ou associadas a GLY ou GBH causam toxicidade no tecido hepático, de modo que a resposta inflamatória é a mais persistente, visto que é uma resultante dos distúrbios circulatórios e progressivos. Para além disto, os animais expostos passam por um complexo processo de estresse oxidativo, resultando na formação de gotículas de lipídeo nas células hepáticas, de modo que a distribuição e quantidade destas gotículas são alteradas de acordo com o tratamento, sendo que os animais tratados com IONP+GLY tem um pico maior de área ocupada por lipídeos durante a exposição, porém os tratamentos com IONP+GBH tem maior persistência da presença de lipídeos nos hepatócitos durante o período experimental.

Para além dos biomarcadores já citados, o presente estudo também buscou avaliar a bioacumulação do ferro nos peixes, como uma forma de investigar os efeitos tóxicos com o potencial de permanência das IONP no organismo do *Poecilia reticulata* e seu consequente efeito na cadeia trófica. Os dados das análises de bioacumulação foram obtidos por meio da técnica de ICP-OES, o que gerou informações preliminares sobre a persistência do ferro no tecido dos peixes, de tal modo que os animais tratados com a forma iônica do ferro tendem a não acumulá-lo, enquanto que a forma nanoparticulada do ferro apresenta potencial de bioacumulação quando associada a GLY e GBH, sendo este último o tratamento com maiores índices de acúmulo de ferro.

Tendo em vista o acúmulo do ferro e a toxicidade de GLY, GBH e das IONP, este trabalho buscou obter informações sobre a possibilidade de recuperação dos animais que já estiveram em contato com os tratamentos, já que o desenvolvimento de uma estratégia segura de uso das IONP deve levar em consideração que os organismos podem entrar em contato com elas e acabar se contaminando, mas também podem eliminá-las do organismo e recuperar os danos ocasionados tanto pelas IONP, quanto por suas associações. Neste sentido, os experimentos consideraram um período de pós-exposição – somente em água reconstituída – com o mesmo tempo de duração da exposição, no qual os animais foram retirados da condição de contato com os contaminantes.

A transferência dos animais para tanques com água reconstituída trouxe dados importantes para a compreensão dos sistemas de detoxificação dos guppies, bem como podem colaborar no entendimento dos períodos e concentrações de uso das IONP nos processos de remediação, visto que as análises histológicas mostraram que os distúrbios circulatórios e os danos regressivos são recuperados durante a pós exposição, ainda que o dano inflamatório não se recupere totalmente, mas apresente tendência de recuperação em períodos mais longos do que 21 dias.

Além da recuperação dos danos histopatológicos, a bioacumulação do ferro tem os picos de acúmulo durante os 21 dias de exposição, seguidos por decréscimo constante durante a pós exposição, sendo que os animais tratados com IONP+GLY, IFe e IONP foram capazes de eliminar o ferro do organismo até se equipararem estatisticamente com o grupo controle não tratado. Conseqüentemente, a quantificação da área ocupada por lipídeos também decresceu durante a pós exposição, o que indica que o *Poecilia reticulata* é

capaz de realizar as ações de detoxificação de maneira eficaz quando submetido as concentrações utilizadas, pelo tempo experimental aplicado, o que indica a plasticidade do guppy em ambientes contaminados.

Em síntese, os resultados explorados neste estudo ajudaram a elucidar – a partir de uma análise complexa de múltiplos biomarcadores – a dinâmica das IONP, bem como de suas associações com GLY e GBH nos organismos aquáticos, abrindo caminho para novos estudos que possam continuar testando e validando as IONP como ferramentas úteis à remediação ambiental.

### **Sobre a formação de recursos humanos**

Os trabalhos envolvidos nesta dissertação de mestrado não se limitaram ao desenvolvimento estrito do projeto, mas para além disto foi buscada a formação de recursos humanos, a partir da inserção do estudante em parcerias, projetos, estágio docência e no curso de disciplinas com o objetivo de ultrapassar a própria pesquisa, mas ensinar a dinâmica do ensino e da formação de redes e colaborações científicas, que hoje se fazem ferramentas indispensáveis para o desenvolvimento da ciência brasileira.

Neste sentido, durante o período de mestrado o estudante passou por uma extensa formação em metodologias de microscopia eletrônica, envolvendo as instituições UFG, UFRJ e FIOCRUZ.

Além disto, o estudante durante sua formação como mestre em biodiversidade animal buscou utilizar ao máximo a estrutura de alto potencial da UFG, realizando: a síntese e caracterização das nanopartículas de óxido de ferro no Laboratório de colóides e materiais nanoestruturado e na central analítica, ambos do instituto de química da UFG; as fotomicrografias no laboratório de

morfologia comparada do ICB-UFG; e participando na geração de redes de parceria com o LabMic e o CRTI, ambos da UFG.

Para além dos vínculos institucionais, as avaliações das informações obtidas nesta dissertação contaram com a participação de pesquisadoras da Universidade Federal de São Carlos, a partir do envolvimento no projeto de pesquisa aprovado em parceria FAPEG e FAPESP.

Esta dinâmica de envolvimento em parcerias, resultou em produtos, tais quais a publicação do artigo “Treatment of cosmetic industry wastewater by flotation with *Moringa oleifera* Lam. and aluminum sulfate and toxicity assessment of the treated wastewater”, publicado na revista *Environmental Science and Pollution Research* (fator de impacto: 4,223), fruto de uma parceria com o laboratório de pesquisa, desenvolvimento e inovação de bioprodutos da faculdade de farmácia da UFG, além da apresentação de 7 pôsteres e 1 apresentação oral nos eventos internacionais da *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, e da participação em 4 resumos publicados no 71º Congresso Nacional de Botânica.

Em suma, o período de realização desta dissertação passou pelos passos de projeto, planejamento, execução, publicação e parcerias, capacitando um recurso humano com qualificação para dar continuidade à sua formação e atuação profissional com qualidade e perspectiva científica das ações diversas e desafiadoras no cotidiano.

### **Bibliografia geral**

- Aich, A., Chattopadhyay, B., Mukhopadhyay, S.K., 2017. Immunolocalization of metallothionein in hepatocytes of guppy fish (*Poecilia reticulata*) exposed to tannery effluent: A biomarker study. *Chemosphere* 169, 460–466.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.099>
- Almeida, S. dos S., Rocha, T.L., Qualhato, G., Oliveira, L. de A.R., Amaral, C.L. do, Conceição, E.C. da, Sabóia-Morais, S.M.T. de, Bailão, E.F.L.C., 2019. Acute exposure to environmentally relevant concentrations of benzophenone-3 induced genotoxicity in *Poecilia reticulata*. *Aquat. Toxicol.* 216, 105293. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105293>
- Anila, P.A., Sutha, J., Nataraj, D., Ramesh, M., 2021. In vivo evaluation of Nano-palladium toxicity on larval stages and adult of zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 765, 144268.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144268>
- Anna, J.S., Castro, J.M., Darraz, L.A., Elías, F.D., Cárcamo, J.G., Luquet, C.M., 2021. Exposure to hydrocarbons and chlorpyrifos alters the expression of nuclear receptors and antioxidant, detoxifying, and immune response proteins in the liver of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111394>
- Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34, 458–479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>
- Antunes, A.M., Rocha, T.L., Pires, F.S., de Freitas, M.A., Leite, V.R.M.C., Arana, S., Moreira, P.C., Sabóia-Morais, S.M.T., 2017. Gender-specific histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to

- glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid. *J. Appl. Toxicol.* 37, 1098–1107. <https://doi.org/10.1002/jat.3461>
- Assis, M.B. da S., Werneck, I.H.S.R., Moraes, G.N., Semaan, F.S., Pacheco Pereira, R., 2019. Citrate-capped iron oxide nanoparticles: ultrasound-assisted synthesis, structure and thermal properties. *Mater. Res. Express* 6, 045064. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aaff2a>
- Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Kaya, H., Yilmaz, S., Camas, M., 2016. Chronic exposure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to iron oxide nanoparticles: Effects of particle morphology on accumulation, elimination, hematology and immune responses. *Aquat. Toxicol.* 177, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.005>
- Auwal, S.M., Abidin, N.Z., Zarei, M., Tan, C.P., Saari, N., 2019. Identification, structure-activity relationship and in silico molecular docking analyses of five novel angiotensin I-converting enzyme (ACE)inhibitory peptides from stone fish (*Actinopyga lecanora*) hydrolysates. *PLoS One* 14, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197644>
- Bach, N.C., Marino, D.J.G., Natale, G.S., Somoza, G.M., 2018. Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere* 202, 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.110>
- Baumann, J., Köser, J., Arndt, D., Filser, J., 2014. The coating makes the difference: Acute effects of iron oxide nanoparticles on *Daphnia magna*. *Sci. Total Environ.* 484, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.023>

- Bee, A., Massart, R., Neveu, S., 1995. Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Magn. Mater.* 149, 6–9. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(95\)00317-7](https://doi.org/10.1016/0304-8853(95)00317-7)
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- Blinova, I., Kanarbik, L., Irha, N., Kahru, A., 2017. Ecotoxicity of nanosized magnetite to crustacean *Daphnia magna* and duckweed *Lemna minor*. *Hydrobiologia* 798, 141–149. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2540-6>
- Bonifacio, A.F., Hued, A.C., 2019. Single and joint effects of chronic exposure to chlorpyrifos and glyphosate based pesticides on structural biomarkers in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere* 236, 124311. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.042>
- Borggaard, O.K., Gimsing, A.L., 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Manag. Sci.* 64, 441–456. <https://doi.org/10.1002/ps.1512>
- Cottet, M., Descloux, S., Guédant, P., Godon, A., Cerdan, P., Vigouroux, R., 2015. Total iron concentrations in waters and fish tissues in the Nam Theun 2 Reservoir area (Lao PDR). *Environ. Monit. Assess.* 187. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4745-6>
- Dasmahapatra, A.K., Dasari, T.P.S., Tchounwou, P.B., 2018. Graphene-Based Nanomaterials Toxicity in Fish, in: *How to Recruit Voluntary Donors in the Third World?* pp. 1–58. [https://doi.org/10.1007/398\\_2018\\_15](https://doi.org/10.1007/398_2018_15)
- Deacon, A.E., Ramnarine, I.W., Magurran, A.E., 2011. How reproductive ecology contributes to the spread of a globally invasive fish. *PLoS One* 6.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024416>

Duke, S.O., 2018. The history and current status of glyphosate. *Pest Manag.*

*Sci.* 74, 1027–1034. <https://doi.org/10.1002/ps.4652>

Escarrone, A.L.V., Caldas, S.S., Primel, E.G., Martins, S.E., Nery, L.E.M., 2016.

Uptake, tissue distribution and depuration of triclosan in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to freshwater. *Sci. Total Environ.* 560–561, 218–224.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.039>

Fahmi, U., Andriani, I., Salmah, S., Hatta, T.H., Omar, S.B.A., Sari, D.K., 2019.

Histopathology of liver and intestine of pangkulan bare fish (*Oryzias matanensis*) Polluted by nickel and iron in Lake Matano, South Sulawesi.

*IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 370. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/370/1/012078>

Filho, J.S., Sousa, C.C.N., Silva, C.C., Sabóia-Morais, S.M.T., Grisolia, C.K.,

2013. Mutagenicity and Genotoxicity in Gill Erythrocyte Cells of *Poecilia reticulata* Exposed to a Glyphosate Formulation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 91, 583–587. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1103-7>

Fiorilli, S., Rivoira, L., Calì, G., Appendini, M., Bruzzoniti, M.C., Coisson, M.,

Onida, B., 2017. Iron oxide inside SBA-15 modified with amino groups as reusable adsorbent for highly efficient removal of glyphosate from water.

*Appl. Surf. Sci.* 411, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.03.206>

Gandahi, N.S., Gandahi, J.A., Yang, P., Tarique, I., Vistro, W.A., Haseeb, A.,

Huang, Y., Yu, L., Bai, X., Chen, Q., 2020. Ultrastructural Evidence of Melanomacrophagic Centers and Lipofuscin in the Liver of Zebrafish

(*Denio rerio*). *Zebrafish* 17, 83–90. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1826>

Geng, Y., Jiang, L., Zhang, D., Liu, B., Zhang, J., Cheng, H., Wang, L., Peng,

- Y., Wang, Y., Zhao, Y., Xu, Y., Liu, X., 2021. Glyphosate, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate ammonium in agricultural groundwater and surface water in China from 2017 to 2018: Occurrence, main drivers, and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 769, 144396. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144396>
- Ghosh, G., Gaikwad, P.S., Panicker, L., Nath, B.B., Mukhopadhyaya, R., 2016. Unfolding and inactivation of proteins by counterions in protein-nanoparticles interaction. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 145, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.053>
- Guerra, F.D., Attia, M.F., Whitehead, D.C., Alexis, F., 2018. Nanotechnology for Environmental Remediation: Materials and Applications. *Molecules* 23, 1760. <https://doi.org/10.3390/molecules23071760>
- Guilherme, S., Santos, M.A., Barroso, C., Gaivão, I., Pacheco, M., 2012. Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): Considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology* 21, 1381–1390. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0892-5>
- Guimarães, A.T.B., Estrela, F.N., Pereira, P.S., de Andrade Vieira, J.E., de Lima Rodrigues, A.S., Silva, F.G., Malafaia, G., 2021. Toxicity of polystyrene nanoplastics in *Ctenopharyngodon idella* juveniles: A genotoxic, mutagenic and cytotoxic perspective. *Sci. Total Environ.* 752, 141937. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141937>
- Guo, H., Barnard, A.S., 2013. Naturally occurring iron oxide nanoparticles: morphology, surface chemistry and environmental stability. *J. Mater. Chem. A* 1, 27–42. <https://doi.org/10.1039/C2TA00523A>

- Hai, J., Piraux, H., Mazarío, E., Volatron, J., Ha-Duong, N.T., Decorse, P., Lomas, J.S., Verbeke, P., Ammar, S., Wilhelm, C., El Hage Chahine, J.-M., Hémadi, M., 2017. Maghemite nanoparticles coated with human serum albumin: combining targeting by the iron-acquisition pathway and potential in photothermal therapies. *J. Mater. Chem. B* 5, 3154–3162. <https://doi.org/10.1039/C7TB00503B>
- Harayashiki, C.A.Y., Junior, A.S.V., Machado, A.A. de S., Cabrera, L. da C., Primel, E.G., Bianchini, A., Corcini, C.D., 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquat. Toxicol.* 142–143, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.006>
- Harman, D., 1956. Aging: A Theory on Free Radical Radiation Chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Hassan, S.S.M., Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2018. Removal of pyrene and benzo(a)pyrene micropollutant from water via adsorption by green synthesized iron oxide nanoparticles. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 015006. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aaa6f0>
- Hauser-Davis, R.A., Silva-Junior, D.R., Linde-Arias, A.R., Vianna, M., 2021. Cytosolic and Metallothionein-Bound Hepatic Metals and Detoxification in a Sentinel Teleost, *Dules auriga*, from Southern Rio de Janeiro, Brazil. *Biol. Trace Elem. Res.* 199, 744–752. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02195-8>
- Houslay, T.M., Earley, R.L., Young, A.J., Wilson, A.J., 2019. Habituation and individual variation in the endocrine stress response in the Trinidadian guppy (*Poecilia reticulata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 270, 113–122.

<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.10.013>

Hrycay, E.G., Bandiera, S.M., 2015. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer, in: *Advances in Pharmacology*. Elsevier Inc., pp. 35–84.

<https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.03.003>

Hued, A.C., Oberhofer, S., Bistoni, M.D.L.Á., 2012. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, cyprinodontiformes). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 107–117.

<https://doi.org/10.1007/s00244-011-9686-7>

Jaworski, E.G., 1972. Mode of Action of N-Phosphonomethylglycine: Inhibition of Aromatic Amino Acid Biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 20, 1195–1198. <https://doi.org/10.1021/jf60184a057>

Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.* 18, 260–267. <https://doi.org/10.1002/tox.10123>

Karami-Mohajeri, S., Ahmadipour, A., Rahimi, H.R., Abdollahi, M., 2017. Adverse effects of organophosphorus pesticides on the liver: A brief summary of four decades of research. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 68, 261–275. <https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-2989>

Ko, J.Y., Kang, N., Lee, J.H., Kim, J.S., Kim, W.S., Park, S.J., Kim, Y.T., Jeon, Y.J., 2016. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from an enzymatic hydrolysate of flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) muscle as a potent anti-hypertensive agent. *Process Biochem.* 51, 535–541.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.01.009>

Künstner, A., Hoffmann, M., Fraser, B.A., Kottler, V.A., Sharma, E., Weigel, D., Dreyer, C., 2016. The genome of the trinidadian guppy, *Poecilia reticulata*, and variation in the Guanapo population. *PLoS One* 11.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169087>

Lai, W., Xu, D., Li, J., Wang, Z., Ding, Y., Wang, X., Li, X., Xu, N., Mai, K., Ai, Q., 2021. Dietary polystyrene nanoplastics exposure alters liver lipid metabolism and muscle nutritional quality in carnivorous marine fish large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *J. Hazard. Mater.* 419.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126454>

Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 147, 222–231.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.09.009>

Li, M.-H., Xu, H.-D., Liu, Y., Chen, T., Jiang, L., Fu, Y.-H., Wang, J.-S., 2016. Multi-tissue metabolic responses of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to glyphosate-based herbicide. *Toxicol. Res. (Camb)*. 5, 1039–1052.

<https://doi.org/10.1039/C6TX00011H>

Ma, J., Li, X., 2015. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. *Chemosphere* 128, 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.017>

Ma, J., Zhu, J., Wang, W., Ruan, P., Rajeshkumar, S., Li, X., 2019. Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. *Environ. Pollut.* 252, 1288–1300.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.040>

- Macêdo, A.K.S., Santos, K.P.E. dos, Brighenti, L.S., Windmüller, C.C., Barbosa, F.A.R., Ribeiro, R.I.M. de A., Santos, H.B. dos, Thomé, R.G., 2020. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. *Sci. Total Environ.* 735, 139505. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139505>
- Marques, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2014. Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods - Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 166, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.07.009>
- Martens, U., Böttcher, D., Talbot, D., Bornscheuer, U., Abou-Hassan, A., Delcea, M., 2019. Maghemite nanoparticles stabilize the protein corona formed with transferrin presenting different iron-saturation levels. *Nanoscale* 11, 16063–16070. <https://doi.org/10.1039/C9NR04967C>
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75–88. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>
- Martins, A.W.S., Silveira, T.L.R., Remião, M.H., Domingues, W.B., Dellagostin, E.N., Junior, A.S.V., Corcini, C.D., Costa, P.G., Bianchini, A., Somoza, G.M., Robaldo, R.B., Campos, V.F., 2021. Acute exposition to Roundup Transorb® induces systemic oxidative stress and alterations in the expression of newly sequenced genes in silverside fish (*Odontesthes humensis*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-021->

15239-w

Mesnager, R., Benbrook, C., Antoniou, M.N., 2019. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food Chem. Toxicol.* 128, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053>

Mijošek, T., Filipović Marijić, V., Dragun, Z., Krasnići, N., Ivanković, D., Erk, M., 2019. Evaluation of multi-biomarker response in fish intestine as an initial indication of anthropogenic impact in the aquatic karst environment. *Sci. Total Environ.* 660, 1079–1090. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.045>

Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047>

Mohapatra, S., Kumar, R., Sundaray, J.K., Patnaik, S.T., Mishra, C.S.K., Rather, M.A., 2021. Structural damage in liver, gonads, and reduction in spawning performance and alteration in the haematological parameter of *Anabas testudineus* by glyphosate- a herbicide. *Aquac. Res.* 52, 1150–1159. <https://doi.org/10.1111/are.14973>

Mohmood, I., Ahmad, I., Asim, M., Costa, L., Lopes, C.B., Trindade, T., Duarte, A.C., Pereira, E., 2015. Interference of the co-exposure of mercury with silica-coated iron oxide nanoparticles can modulate genotoxicity induced by their individual exposures-a paradox depicted in fish under in vitro conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 3687–3696. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3591-3>

Mohmood, I., Lopes, C.B., Lopes, I., Ahmad, I., Duarte, A.C., Pereira, E., 2013.

- Nanoscale materials and their use in water contaminants removal-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 1239–1260. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1415-x>
- Moraes, J.S., Nornberg, B.F.S., Castro, M.R. de, Vaz, B. dos S., Mizuschima, C.W., Marins, L.F.F., Martins, C. de M.G., 2020. Zebrafish (*Danio rerio*) ability to activate ABCC transporters after exposure to glyphosate and its formulation Roundup Transorb®. *Chemosphere* 248, 125959. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125959>
- Mosiagin, I.P., Furasova, A.D., Kozlova, M.A., Osmolowsky, M.G., Osmolovskaya, O.M., 2015. Thermodynamic parameters of bovine serum albumin adsorption at the surface of various nanoparticles. *Russ. J. Gen. Chem.* 85, 2654–2656. <https://doi.org/10.1134/S1070363215110249>
- Moura, F.R., Lima, R.R.S., Cunha, A.P.S., Costa Marisco, P., Aguiar, D.H., Sugui, M.M., Senhorin, A.P., Senhorin, V.D.G., 2017. Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 56, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.019>
- Mozsár, A., Boros, G., Sály, P., Antal, L., Nagy, S.A., 2015. Relationship between Fulton's condition factor and proximate body composition in three freshwater fish species. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 315–320. <https://doi.org/10.1111/jai.12658>
- Muckenthaler, M.U., Galy, B., Hentze, M.W., 2008. Systemic Iron Homeostasis and the Iron-Responsive Element/Iron-Regulatory Protein (IRE/IRP) Regulatory Network. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 197–213. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521>

- Muraro, P.C.L., Mortari, S.R., Vizzotto, B.S., Chuy, G., dos Santos, C., Brum, L.F.W., da Silva, W.L., 2020. Iron oxide nanocatalyst with titanium and silver nanoparticles: Synthesis, characterization and photocatalytic activity on the degradation of Rhodamine B dye. *Sci. Rep.* 10, 3055.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59987-0>
- Murussi, C.R., Costa, M.D., Leitemperger, J.W., Guerra, L., Rodrigues, C.C.R., Menezes, C.C., Severo, E.S., Flores-Lopes, F., Salbego, J., Loro, V.L., 2016. Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 445–455.  
<https://doi.org/10.1007/s10695-015-0150-x>
- Navarro, C.D.C., Martinez, C.B.R., 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 165, 83–90.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.06.003>
- Naz, S., Hussain, R., Ullah, Q., Chatha, A.M.M., Shaheen, A., Khan, R.U., 2021. Toxic effect of some heavy metals on hematology and histopathology of major carp (*Catla catla*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 6533–6539.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-10980-0>
- Nuridin, I., Johan, M.R., Yaacob, I.I., Ang, B.C., Andriyana, A., 2014. Synthesis, characterisation and stability of superparamagnetic maghemite nanoparticle suspension. *Mater. Res. Innov.* 18, S6-200-S6-203.  
<https://doi.org/10.1179/1432891714Z.0000000001017>
- Nuridin, I., Yaacob, I.I., Johan, M.R., Ang, B.C., 2012. Characterization and stability monitoring of maghemite nanoparticle suspensions. *Adv. Mater.*

Res. 576, 398–401.

<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.576.398>

Nwonumara, G.N., Okogwu, O.I., 2020. Oxidative and biochemical responses as indicators of chemical stress in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) juvenile exposed to glyphosate. *Sci. African* 8, e00373.

<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00373>

OECD, 2019. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Guidel. Test. Chem.

<https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>

OECD, 1992. Guidelines for the Testing of Chemicals: 203 - Fish, Acute Toxicity Test. OECD Libr. <https://doi.org/10.1787/9789264070684-en>

Ojo, O.A., Olayide, I.I., Akalabu, M.C., Ajiboye, B.O., Ojo, A.B., Oyinloye, B.E., Ramalingam, M., 2021. Nanoparticles and their biomedical applications. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 11, 8431–8445.

<https://doi.org/10.33263/BRIAC111.84318445>

Parente, C.E.T., Lino, A.S., Carvalho, G.O., Pizzochero, A.C., Azevedo-Silva, C.E., Freitas, M.O., Teixeira, C., Moura, R.L., Ferreira Filho, V.J.M., Malm, O., 2021. First year after the Brumadinho tailings' dam collapse: Spatial and seasonal variation of trace elements in sediments, fishes and macrophytes from the Paraopeba River, Brazil. *Environ. Res.* 193.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110526>

Park, H., May, A., Portilla, L., Dietrich, H., Münch, F., Rejek, T., Sarcletti, M., Banspach, L., Zahn, D., Halik, M., 2020. Magnetite nanoparticles as efficient materials for removal of glyphosate from water. *Nat. Sustain.* 3,

129–135. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0452-6>

- Peillex, C., Pelletier, M., 2020. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *J. Immunotoxicol.* 17, 163–174. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2020.1804492>
- Peixoto, M.M., Bauerfeldt, G.F., Herbst, M.H., Pereira, M.S., da Silva, C.O., 2015. Study of the Stepwise Deprotonation Reactions of Glyphosate and the Corresponding p K a Values in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. A* 119, 5241–5249. <https://doi.org/10.1021/jp5099552>
- Pereira, A.C., Gonçalves, B.B., Brito, R. da S., Vieira, L.G., Lima, E.C. de O., Rocha, T.L., 2020. Comparative developmental toxicity of iron oxide nanoparticles and ferric chloride to zebrafish (*Danio rerio*) after static and semi-static exposure. *Chemosphere* 254, 126792. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126792>
- Pereira, P., Raimundo, J., Barata, M., Araújo, O., Pousão-Ferreira, P., Canário, J., Almeida, A., Pacheco, M., 2015. A new page on the road book of inorganic mercury in fish body-tissue distribution and elimination following waterborne exposure and post-exposure periods. *Metallomics* 7, 525–535. <https://doi.org/10.1039/c4mt00291a>
- Pestovsky, Y.S., Martínez-Antonio, A., 2017. The use of nanoparticles and nanoformulations in agriculture. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 17, 8699–8730. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.15041>
- Pfanner, N., Craig, E.A., Hönlinger, A., 1997. Mitochondrial Preprotein Translocase. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 25–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.25>
- Prado, Y., Daffé, N., Michel, A., Georgelin, T., Yaacoub, N., Grenèche, J.-M., Choueikani, F., Otero, E., Ohresser, P., Arrio, M.-A., Cartier-dit-Moulin, C.,

Saintavit, P., Fleury, B., Dupuis, V., Lisnard, L., Fresnais, J., 2015.

Enhancing the magnetic anisotropy of maghemite nanoparticles via the surface coordination of molecular complexes. *Nat. Commun.* 6, 10139.

<https://doi.org/10.1038/ncomms10139>

Qualhato, G., Rocha, T.L., de Oliveira Lima, E.C., e Silva, D.M., Cardoso, J.R.,

Grisolia, C.K., de Saboia-Morais, S.M., 2017a. Genotoxic and mutagenic assessment of iron oxide (maghemite- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticle in the guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 183, 305–314.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.061>

Qualhato, G., Rocha, T.L., de Oliveira Lima, E.C., e Silva, D.M., Cardoso,

J.R.J.R., Grisolia, C.K., de Saboia-Morais, S.M., Lima, E.C. de O., Silva, D.M., Cardoso, J.R.J.R., Koppe Grisolia, C., Sabóia-Morais, S.M.T., 2017b. Genotoxic and mutagenic assessment of iron oxide (maghemite- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticle in the guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 183, 305–314.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.061>

Qualhato, G., Sabóia-Morais, S.M.T., Silva, L.D., Rocha, T.L., 2018.

Melanomacrophage response and hepatic histopathologic biomarkers in the guppy *Poecilia reticulata* exposed to iron oxide (maghemite) nanoparticles. *Aquat. Toxicol.* 198, 63–72.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.014>

Rehman, T., Naz, S., Hussain, R., Chatha, A.M.M., Ahmad, F., Yamin, A.,

Akram, R., Naz, H., Shaheen, A., 2021. Exposure to heavy metals causes histopathological changes and alters antioxidant enzymes in fresh water fish (*Oreochromis niloticus*). *Asian J. Agric. Biol.* 2021, 1–11.

<https://doi.org/10.35495/ajab.2020.03.143>

- Richard, S., Prévot-D'Alvise, N., Bunet, R., Simide, R., Couvray, S., Coupé, S., Grillasca, J.P., 2014. Effect of a glyphosate-based herbicide on gene expressions of the cytokines interleukin-1 $\beta$  and interleukin-10 and of heme oxygenase-1 in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 294–299. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1180-7>
- Rivoira, Luca, Appendini, M., Fiorilli, S., Onida, B., Del Bubba, M., Bruzzoniti, M.C., 2016. Functionalized iron oxide/SBA-15 sorbent: investigation of adsorption performance towards glyphosate herbicide. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 21682–21691. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7384-8>
- Rivoira, L., Appendini, M., Fiorilli, S., Onida, B., Del Bubba, M., Bruzzoniti, M.C., 2016. Functionalized iron oxide/SBA-15 sorbent: investigation of adsorption performance towards glyphosate herbicide. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 21682–21691. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7384-8>
- Rocha, T.L., Santos, A.P.R. dos, Yamada, Á.T., Soares, C.M. de A., Borges, C.L., Bailão, A.M., Sabóia-Morais, S.M.T., 2015. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.016>
- Rodrigues, L. de B., Gonçalves Costa, G., Thá, E.L., Silva, L.R., Oliveira, R., Leme, D.M., Cestari, M.M., Grisolia, C.K., Valadares, M.C., Oliveira, G.A.R., 2019. Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 842, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.002>
- Rolshausen, G., Phillip, D.A.T.T., Beckles, D.M., Akbari, A., Ghoshal, S.,

- Hamilton, P.B., Tyler, C.R., Scarlett, A.G., Ramnarine, I., Bentzen, P., Hendry, A.P., 2015. Do stressful conditions make adaptation difficult? Guppies in the oil-polluted environments of southern Trinidad. *Evol. Appl.* 8, 854–870. <https://doi.org/10.1111/eva.12289>
- Roos, A.J., Blair, A., Rusiecki, J.A., Hoppin, J.A., M., S., Dosemeci, M., Dosemeci, M., Alavanja, M.C., Sandler, D.P., 2005. Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Environ. Health Perspect.* 113, 49–54.
- Samanta, P., Kumari, P., Pal, S., Mukherjee, A., Ghosh, A., 2018. Histopathological and ultrastructural alterations in some organs of *Oreochromis niloticus* exposed to glyphosate-based herbicide, excel mera 71. *J. Microsc. Ultrastruct.* 6, 35. [https://doi.org/10.4103/jmau.jmau\\_8\\_18](https://doi.org/10.4103/jmau.jmau_8_18)
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K., Senapati, T., Ghosh, A.R., 2019. Effects of Glyphosate-Based Herbicide (Excel Mera 71) on Digestive Enzymes and Recovery Pattern in Teleostean Fishes. *Proc. Zool. Soc.* 72, 54–60. <https://doi.org/10.1007/s12595-017-0255-6>
- Sánchez, J.A.A., Klosterhoff, M.C., Romano, L.A., Martins, C.D.M.G., 2019. Histological evaluation of vital organs of the livebearer *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) exposed to glyphosate: A comparative analysis of Roundup® formulations. *Chemosphere* 217, 914–924. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.020>
- Santos, A.P.R., Rocha, T.L., Borges, C.L., Bailão, A.M., de Almeida Soares, C.M., de Sabóia-Morais, S.M.T., 2017. A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 168, 933–943.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.116>

- Santos, T.R.T., Andrade, M.B., Silva, M.F., Bergamasco, R., Hamoudi, S., 2019. Development of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> decorated graphene oxides for glyphosate removal from water. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 40, 1118–1137. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1411397>
- Savassi, L.A., Paschoalini, A.L., Arantes, F.P., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2020. Heavy metal contamination in a highly consumed Brazilian fish: immunohistochemical and histopathological assessments. *Environ. Monit. Assess.* 192. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08515-8>
- Sayadi, M.H., Mansouri, B., Shahri, E., Tyler, C.R., Shekari, H., Kharkan, J., 2020. Exposure effects of iron oxide nanoparticles and iron salts in blackfish (*Capoeta fusca*): Acute toxicity, bioaccumulation, depuration, and tissue histopathology. *Chemosphere* 247, 125900. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125900>
- Schatz, G., 1996. The Protein Import System of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271, 31763–31766. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.50.31763>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Shahidi, S., 2019. Magnetic nanoparticles application in the textile industry—A review. *J. Ind. Text.* <https://doi.org/10.1177/1528083719851852>
- Sheel, R., Kumari, P., Panda, P.K., Ansari, M.D.J., Patel, P., Singh, S., Kumari, B., Sarkar, B., Mallick, M.A., Verma, S.K., 2020. Molecular intrinsic

proximal interaction infer oxidative stress and apoptosis modulated in vivo biocompatibility of P.niruri contrived antibacterial iron oxide nanoparticles with zebrafish. *Environ. Pollut.* 267, 115482.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115482>

Shiogiri, N.S., Paulino, M.G., Carraschi, S.P., Baraldi, F.G., Cruz, C., Fernandes, M.N., 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34, 388–396.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.007>

Silva, G.S., Matos, L.V., Freitas, J.O. da S., Campos, D.F., Val, V.M.F.A., 2019. Gene expression, genotoxicity, and physiological responses in an Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (CUVIER 1818), exposed to Roundup® and subsequent acute hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 222, 49–58.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.010>

Simeonidis, K., Mourdikoudis, S., Kaprara, E., Mitrakas, M., Polavarapu, L., 2016. Inorganic engineered nanoparticles in drinking water treatment: A critical review. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2, 43–70.

<https://doi.org/10.1039/c5ew00152h>

Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 112–120.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.01.012>

Singh, M., Barman, A.S., Devi, A.L., Devi, A.G., Pandey, P.K., 2019. Iron mediated hematological, oxidative and histological alterations in freshwater

fish *Labeo rohita*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 87–97.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.129>

Sobjak, T.M., Romão, S., do Nascimento, C.Z., dos Santos, A.F.P., Vogel, L., Guimarães, A.T.B., 2017. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. *Chemosphere* 182, 267–275.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.031>

Söffker, M., Tyler, C.R., 2012. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish a critical review on effects and possible consequences. *Crit. Rev. Toxicol.* 42, 653–668.

<https://doi.org/10.3109/10408444.2012.692114>

Solomon, K.R., 2020. Estimated exposure to glyphosate in humans via environmental, occupational, and dietary pathways: an updated review of the scientific literature. *Pest Manag. Sci.* 76, 2878–2885.

<https://doi.org/10.1002/ps.5717>

Sonne, C., Bach, L., Søndergaard, J., Rigét, F.F., Dietz, R., Mosbech, A., Leifsson, P.S., Gustavson, K., 2014. Evaluation of the use of common sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) organ histology as bioindicator for element exposure in the fjord of the mining area Maarmorilik, West Greenland. *Environ. Res.* 133, 304–311.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.05.031>

Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J., 2013. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem. Toxicol.* 59, 129–136.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>

- Trigueiro, N.S.D.S.N.S. de S., Gonçalves, B.B.B.B., Dias, F.C.F.C., de Oliveira Lima, E.C.E.C.E.C.E.C.E.C., Rocha, T.L.T.L., Sabóia-Morais, S.M.T.S.M.T., de Souza Trigueiro, N.S., Gonsalves, B.B., Dias, F.C.F.C., de Oliveira Lima, E.C.E.C.E.C.E.C.E.C., Rocha, T.L.T.L., Teixeira Saboia-Morais, S.M., Trigueiro, N.S.D.S.N.S. de S., Gonçalves, B.B.B.B., Dias, F.C.F.C., Lima, E.C.O., Rocha, T.L.T.L., Sabóia-Morais, S.M.T.S.M.T., de Oliveira Lima, E.C.E.C.E.C.E.C.E.C., Rocha, T.L.T.L., Sabóia-Morais, S.M.T.S.M.T., 2021. Co-exposure of iron oxide nanoparticles and glyphosate-based herbicide induces DNA damage and mutagenic effects in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 81, 103521. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103521>
- Trump, B.F., Smuckler, E.A., Benditt, E.P., 1961. A method for staining epoxy sections for light microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 5, 343–348. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(61\)80011-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(61)80011-7)
- Unal, B., Toprak, M.S., Durmus, Z., Sözeri, H., Baykal, A., 2010. Synthesis, structural and conductivity characterization of alginic acid-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite. *J. Nanoparticle Res.* 12, 3039–3048. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9898-1>
- Uren Webster, T.M., Laing, L. V., Florance, H., Santos, E.M., 2014. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 48, 1271–1279. <https://doi.org/10.1021/es404258h>
- Valdiglesias, V., Fernández-Bertólez, N., Kiliç, G., Costa, C., Costa, S., Fraga, S., Bessa, M.J., Pásaro, E., Teixeira, J.P., Laffon, B., 2016. Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *J. Trace*

- Elem. Med. Biol. 38, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.03.017>
- Valsami-Jones, E., Lynch, I., 2015. How safe are nanomaterials? *Science* (80-.). 350, 388–389. <https://doi.org/10.1126/science.aad0768>
- Villarroel, M.J., Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 2003. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53, 857–864. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00546-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00546-0)
- Weber, A.A., Sales, C.F., Faria, F.S., Melo, R.M.C., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2020. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 190. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>
- Wolf, J.C., Wheeler, J.R., 2018. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquat. Toxicol.* 197, 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.013>
- Woo, K., Hong, J., Choi, S., Lee, H.-W., Ahn, J., Kim, C.S., Lee, S.W., 2004. Easy Synthesis and Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Mater.* 16, 2814–2818. <https://doi.org/10.1021/cm049552x>
- Xu, P., Zeng, G.M., Huang, D.L., Feng, C.L., Hu, S., Zhao, M.H., Lai, C., Wei, Z., Huang, C., Xie, G.X., Liu, Z.F., 2012. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: A review. *Sci. Total Environ.* 424, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2012.02.023>
- Yakar, A., Ünlü, A., Yeşilçayır, T., Bıyık, İ., 2020. Kinetics and thermodynamics of textile dye removal by adsorption onto iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol. Environ. Eng.* 5. <https://doi.org/10.1007/s41204-020-0068-0>

- Yang, C.-H., Kung, T.-A., Chen, P.-J., 2019. Differential alteration in reproductive toxicity of medaka fish on exposure to nanoscale zerovalent iron and its oxidation products. *Environ. Pollut.* 252, 1920–1932.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.154>
- Yeh, K.-Y., Lai, C.-Y., Lin, C.-Y., Hsu, C.-C., Lo, C.-P., Her, G.M., 2017. ATF4 overexpression induces early onset of hyperlipidaemia and hepatic steatosis and enhances adipogenesis in zebrafish. *Sci. Rep.* 7, 16362.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16587-9>
- Yoboue, E.D., Sitia, R., Simmen, T., 2018. Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. *Cell Death Dis.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0033-4>
- Zhang, Y., Zhu, L., Zhou, Y., Chen, J., 2015. Accumulation and elimination of iron oxide nanomaterials in zebrafish (*Danio rerio*) upon chronic aqueous exposure. *J. Environ. Sci.* 30, 223–230.  
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.08.024>
- Zheng, T., Jia, R., Cao, L., Du, J., Gu, Z., He, Q., Xu, P., Yin, G., 2021. Effects of chronic glyphosate exposure on antioxidative status, metabolism and immune response in tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 239, 108878.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108878>
- Zhu, X., Tian, S., Cai, Z., 2012. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *PLoS One* 7, e46286.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046286>