



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

THUANNE BRAÚLIO HENNIG

MECANISMOS DE AÇÃO TÓXICA DE MISTURAS DE NANOPESTICIDA COM
NANOPLÁSTICO SOBRE DIFERENTES MODELOS TOXICOLÓGICOS
AQUÁTICOS

FLORIANÓPOLIS
2025

Thuanne Braúlio Hennig

**Mecanismos de ação tóxica de misturas de nanopesticida com nanoplástico sobre
diferentes modelos toxicológicos aquáticos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do
grau de Doutora em Engenharia Ambiental

Orientador: Prof. William Gerson Matias, Dr.

Coorientador: Rodrigo Costa Puerari, Dr.

Florianópolis

2025

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Hennig, Thuanne Braúlio

MECANISMOS DE AÇÃO TÓXICA DE MISTURAS DE NANOPESTICIDA
COM NANOPLÁSTICO SOBRE DIFERENTES MODELOS TOXICOLÓGICOS
AQUÁTICOS / Thuanne Braúlio Hennig ; orientador, William
Gerson Matias, coorientador, Rodrigo Costa Puerari ,
2025.

150 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Toxicologia aquática. 3.
Toxicidade de misturas. 4. Nanopartículas. 5. Nanoatrazina
e Poliestireno. I. Matias, William Gerson . II. Puerari ,
Rodrigo Costa . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.
IV. Título.

Thuanne Braúlio Hennig

**Mecanismos de ação tóxica de misturas de nanopesticida com nanoplástico sobre
diferentes modelos toxicológicos aquáticos**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 08 de agosto de 2025, pela
banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Claudia Bueno dos Reis Martinez, Dra.
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

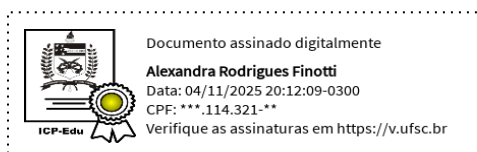
Profa. Cristiane Funghetto Fuzinato, Dra.
Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Profa. Silvia Pedroso Melegari, Dra
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

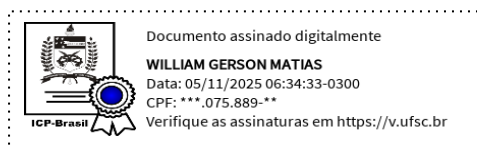
Prof. Nelson Libardi Junior, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Luís Carlos Iuñes Oliveira Filho, Dr. (membro suplente)
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado
para obtenção do título de Doutora em Engenharia Ambiental.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof.(a) William Gerson Matias, Dr.(a)
Orientador

Florianópolis, 2025

Com todo o meu amor, dedico este trabalho à minha
irmã, Tainá, meu laço mais profundo e inquebrável.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde e sustento espiritual que me permitiram concluir mais esta etapa.

Aos meus pais, Oberti e Almerinda, à minha irmã, Tainá, e ao meu cunhado, Gerson, por estarem sempre ao meu lado, oferecendo apoio incondicional e acreditando no meu potencial. Sou grata pelo incentivo constante e por me impulsionarem a crescer.

Aos meus amigos do coração Gil, Ana Carla, Gabriel Barro, Nani, Maria Constância, Gabriel Tochetto, Leandro Pitareli, Taise, Bruno, Leandro Gilio, Mauta, Cokreti, Marcos, Pedro, Alexandre, Régis e Ingrid que estiveram presentes ao longo da pós-graduação, nos momentos de dificuldade e também nas alegrias. Obrigada por me lembrarem, tantas vezes, do valor da leveza e da amizade.

Aos amigos que foram minha família em Montreal, Luana, Bianca, Marcela, Mariana, Clara, Fabrício, Victor, Hudson, Derick e, em especial, Fernanda, Guiqi e Alexandre, pelo apoio e parceria fundamentais para a realização da pesquisa na UQÀM.

Aos colegas e amigos do PPGEA e da UFSC, Heloísa, Amanda, Beatriz, Ketley e Mirella, pelo apoio mútuo, companheirismo e pelos momentos que tornaram a jornada mais leve.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), Alana, Cassiana e Raphaella, pela convivência harmoniosa e colaboração indispensável. Estendo um agradecimento especial ao Felipe, parceiro desde a graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária na UFFS, com quem compartilho aprendizados e conquistas na ecotoxicologia.

Ao professor William Gerson Matias, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisadores do LABTOX. Pela confiança, contribuições e aprendizado ao longo do doutorado.

Aos professores Alcir Dafre e aos meus supervisores do doutorado sanduíche na UQÀM, Philippe Juneau e David Dewez, pela valiosa oportunidade de realizar parte da pesquisa no Canadá e pelas contribuições essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

À FUMDES/UNIEDU pela bolsa de Doutorado e ao CNPq pela bolsa de Doutorado Sanduíche. À UFSC e à UQÀM, bem como a todos os técnicos e professores dessas instituições, cujo apoio, conhecimento e colaboração foram fundamentais para a realização desta tese.

Por fim, com muito carinho e reconhecimento, agradeço a mim mesma por não desistir, mesmo diante dos desafios mais intensos. Por cada esforço silencioso, cada escolha difícil feita com coragem e propósito. Por seguir com integridade, resiliência e determinação. Este trabalho também é fruto da minha força, da minha dedicação e do compromisso com os sonhos que cultivo com tanto amor.

“Os rios sabem disto: não é preciso ter pressa.
Haveremos de chegar lá um dia.”

Alan Alexander Milne

RESUMO

A nanotecnologia vem sendo amplamente empregada na produção de novos insumos agrícolas. A atrazina nanoencapsulada em um biopolímero (nATZ) foi desenvolvida com os objetivos de reduzir os efeitos adversos do ingrediente ativo (i.a.) ao ambiente bem como aumentar a sua eficiência. Pela novidade da nanosubstância, poucos são os estudos que reportam sua toxicidade e mecanismos de ação tóxica, que pode representar risco a organismos não-alvo. Além disso, ao mesmo tempo em que ocorre o problema ambiental por causa dos (nano)pesticidas, ocorre também a contaminação ambiental por plásticos. No meio ambiente, os plásticos podem estar presentes em escala nanométrica, resultando em impactos adversos para organismos de diversos ecossistemas, além de poderem interagir com outras substâncias presentes no ambiente, tal como a própria nATZ, resultando em efeitos ainda desconhecidos para a biota. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos individuais e em mistura dos dois contaminantes de preocupação emergente, a nATZ e o nanoplastico de poliestireno (nPPS), em organismos aquáticos de diferentes grupos. Com o objetivo de compreender de forma mais ampla a toxicidade do nanopesticida para organismos não-alvo, este estudo foi desenvolvido em quatro etapas. Inicialmente, foi realizada uma revisão sistemática da literatura sobre os efeitos da nATZ em espécies não-alvo, com a estimativa de concentrações protetivas por meio da construção de uma Curva de Sensibilidade das Espécies (SSD). Na sequência, avaliou-se a influência do nPPS na toxicidade da nATZ sobre a macrófita *Lemna minor*, utilizando uma abordagem multigeracional. Em seguida, investigaram-se os efeitos tóxicos da nATZ e do nPPS, isoladamente e em mistura, sobre o microcrustáceo *Daphnia magna* e a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*. Por fim, os dados de toxicidade obtidos nesta tese, juntamente com informações recentes da literatura, foram reunidos para aprimorar a SSD elaborada na primeira etapa, tornando-a mais robusta e confiável para a avaliação de risco ecológico. Como resultado da primeira etapa do estudo, foi verificado que modelos celulares e as algas não demonstram sensibilidade à nATZ, enquanto microcrustáceos e nematoides demonstraram maior sensibilidade à substância, representando uma preocupação para os ecossistemas aquáticos e terrestres. A concentração protetiva para 95% das espécies não-alvo descritas na SSD contemplou todas as espécies analisadas. A segunda etapa do estudo revelou que a exposição ao nPPS não afetou o crescimento nem gerou estresse oxidativo em *L. minor* durante nove gerações. Por outro lado, o nATZ causou toxicidade crescente, reduzindo o crescimento e aumentando o estresse oxidativo, com geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e inibição da catalase (CAT). O nPPS não alterou a toxicidade do nATZ no crescimento, mas intensificou alguns efeitos bioquímicos em determinadas gerações e concentrações. Na terceira etapa do estudo, testes agudos mostraram que, individualmente, a nATZ é mais tóxica que o nPPS, com a mistura apresentando efeitos sinérgicos. Na exposição crônica, ambos causaram impactos no crescimento e reprodução de *D. magna*, com forte influência da nATZ nos afetando os parâmetros de crescimento e reprodução, nos cenários de mistura. Para *A. fischeri*, a toxicidade da mistura foi semelhante à do nPPS. A última etapa do trabalho reuniu todos os dados até o momento gerados para a toxicidade da nATZ, em uma curva SSD mais robusta, revelou que espécies fotossintetizantes são as mais sensíveis à nATZ. Espécies de solo mostraram menor sensibilidade, possivelmente por menor biodisponibilidade do contaminante nesse compartimento. Mesmo com redução na concentração agrícola proporcionada pela nanotecnologia, a nATZ continua representando risco ambiental significativo para organismos aquáticos não-alvo.

Palavras-chave: Toxicologia aquática; Toxicidade de misturas; Nanopartículas; Nanoatrazina; Poliestireno.

ABSTRACT

Nanotechnology has been widely used in the production of new agricultural inputs. Nanoencapsulated atrazine in a biopolymer (nATZ) was developed with the objectives of reducing the adverse effects of the active ingredient (a.i.) on the environment and increasing its efficiency. Due to the novelty of the nanosubstance, few studies report its toxicity and toxic mechanisms of action, which may pose a risk to non-target organisms. In addition, while the environmental problem caused by (nano)pesticides occurs, environmental contamination by plastics also occurs. In the environment, plastics can be present on a nanometric scale, resulting in adverse impacts on organisms in various ecosystems, in addition to being able to interact with other substances present in the environment, such as nATZ itself, resulting in effects that are still unknown to biota. In this context, the present study aims to evaluate the individual and mixed effects of two emerging contaminants of concern, nATZ and polystyrene nanoplastics (nPPS), on aquatic organisms from different groups. In order to gain a broader understanding of the toxicity of nanopesticides to non-target organisms, this study was conducted in four stages. Initially, a systematic review of the literature on the effects of nATZ on non-target species was carried out, with protective concentrations estimated by constructing a Species Sensitivity Curve (SSC). Next, the influence of nPPS on the toxicity of nATZ on the macrophyte *Lemna minor* was evaluated using a multigenerational approach. Then, the toxic effects of nATZ and nPPS, alone and in mixture, on the microcrustacean *Daphnia magna* and the marine bacterium *Aliivibrio fischeri* were investigated. Finally, the toxicity data obtained in this thesis, together with recent information from the literature, were compiled to improve the SSD developed in the first stage, making it more robust and reliable for ecological risk assessment. As a result of the first stage of the study, it was found that cell models and algae do not show sensitivity to nATZ, while microcrustaceans and nematodes showed greater sensitivity to the substance, representing a concern for aquatic and terrestrial ecosystems. The protective concentration for 95% of the non-target species described in the SSD covered all species analyzed. The second stage of the study revealed that exposure to nPPS did not affect growth or generate oxidative stress in *L. minor* over nine generations. On the other hand, nATZ caused increasing toxicity, reducing growth and increasing oxidative stress, with the generation of reactive oxygen species (ROS) and inhibition of catalase (CAT). nPPS did not alter the toxicity of nATZ on growth, but intensified some biochemical effects in certain generations and concentrations. In the third stage of the study, acute tests showed that, individually, nATZ is more toxic than nPPS, with the mixture showing synergistic effects. In chronic exposure, both caused impacts on the growth and reproduction of *D. magna*, with a strong influence of nATZ affecting growth and reproduction parameters in the mixture scenarios. For *A. fischeri*, the toxicity of the mixture was similar to that of nPPS. The final stage of the study brought together all the data generated to date on nATZ toxicity in a more robust SSD curve, revealing that photosynthetic species are the most sensitive to nATZ. Soil species showed lower sensitivity, possibly due to the lower bioavailability of the contaminant in this compartment. Even with the reduction in agricultural concentration provided by nanotechnology, nATZ continues to pose a significant environmental risk to non-target aquatic organisms.

Keywords: Aquatic toxicology; Mixture toxicity; Nanoparticles; Nanoatrazine; Polystyrene.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA DA TESE.....	9
1.2 PROBLEMÁTICA.....	10
1.3 JUSTIFICATIVA	13
1.4 HIPÓTESES	14
1.5 OBJETIVOS.....	15
1.5.1 Objetivo geral.....	15
1.5.2 Objetivos específicos.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 NANOPESTICIDAS	17
2.1.1 Atrazina nanoencapsulada	17
2.1.2 Efeitos da nATZ sobre organismos não-alvo	19
2.2 NANOPLÁSTICOS	20
2.2.1 Nanoplástico de poliestireno	21
2.2.2 Efeitos do nPPS sobre organismos não-alvo	22
2.3 TOXICIDADE DE MISTURAS NO AMBIENTE.....	23
2.3.1 Misturas de pesticida com plástico	24
3 METODOLOGIA.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 CAPÍTULO I - Uma revisão sistemática dos efeitos tóxicos de um nanopesticida em organismos não-alvo: Estimativa de concentrações protetivas usando uma abordagem de distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) - O caso da atrazina.....	31
4.2 CAPÍTULO II – A presença de nanoplásticos no ambiente pode influenciar a toxicidade de um nanopesticida para lemnas ao longo de múltiplas gerações?.....	72
4.3 CAPÍTULO III – Quais são os efeitos toxicológicos da mistura de nanoplásticos com um nanopesticida em <i>Daphnia magna</i> e <i>Aliivibrio fischeri</i> ?.....	103

4.4 CAPÍTULO IV – Quais as concentrações protetivas de um nanopesticida para espécies não-alvo? Abordagem da curva de distribuição da sensibilidade das espécies para a nanoatrazina

131

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	140
5.1 CONCLUSÕES.....	141
5.2 LIMITAÇÕES DO TRABALHO	143
5.3 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	144
REFERÊNCIAS	146

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA DA TESE

A nanotecnologia tem ganhado destaque por sua capacidade de modificar as propriedades físico-químicas de materiais, proporcionando maior eficiência e resistência em comparação com suas formas convencionais. No entanto, apesar dos avanços e benefícios proporcionados por essas nanoestruturas, crescem as preocupações quanto aos possíveis riscos ambientais associados ao seu uso, especialmente em relação à liberação de nanocontaminantes no ambiente. Nesse cenário, o Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), coordenado pelo Prof. Dr. William Gerson Matias, foi um dos pioneiros no desenvolvimento de pesquisas em nanotoxicologia no Brasil. Dentre os diversos contaminantes emergentes estudados, os (nano)pesticidas e os nanoplásticos têm recebido atenção especial do grupo, que já contribuiu significativamente para a compreensão dos efeitos tóxicos de diferentes nanomateriais, tanto isolados quanto em mistura, sobre variados organismos-modelo.

O *Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms Laboratory* (TOXEN – GRIL), da Université du Québec à Montréal (UQÀM), coordenado pelo Prof. Dr. Philippe Juneau, e o *Laboratory of Environmental & Analytical Biochemistry of Contaminants*, também da UQÀM e sob coordenação do Prof. Dr. David Dewez, desenvolvem estudos voltados à investigação dos efeitos ecotoxicológicos e dos mecanismos de ação de nanocontaminantes e outras substâncias sobre algas, cianobactérias, plantas e macrófitas aquáticas. A colaboração entre esses laboratórios da UQÀM e o LABTOX tem fortalecido as pesquisas em nanotoxicologia, ampliando redes científicas e contribuindo para o avanço do conhecimento necessário à regulação dessas substâncias.

Nesse contexto, a presente tese foi conduzida com base em uma sólida cooperação internacional entre a UFSC e a UQÀM, integrando expertises complementares nas áreas de toxicologia aquática, nanotoxicologia e toxicologia de misturas. A principal inovação da pesquisa reside na abordagem integrada adotada para avaliar os efeitos tóxicos de misturas realistas de nanocontaminantes sobre organismos aquáticos, utilizando uma combinação de métodos ecotoxicológicos tradicionais e ferramentas bioquímicas, fisiológicas e estatísticas.

Além de empregar metodologias consolidadas, o estudo aplicou análises de estresse oxidativo e respostas fotossintéticas associadas à modelagem de distribuição de espécies (SSD), com o objetivo de gerar dados ecologicamente relevantes para avaliações de risco ambiental.

Essa abordagem permitiu revelar interações sinérgicas e efeitos não aditivos entre diferentes nanocontaminantes, aspectos ainda pouco explorados na literatura científica. A originalidade da tese também se manifesta no uso de misturas baseadas em concentrações ambientais reais ou previsíveis, aproximando a pesquisa de cenários de contaminação mais representativos. O impacto transformador da tese inclui a geração de dados científicos para a formulação de políticas públicas e diretrizes regulatórias mais eficazes para o controle e monitoramento de nanocontaminantes, bem como o fortalecimento da capacidade preditiva sobre os riscos ecotoxicológicos dessas substâncias. Do ponto de vista ambiental e social, os resultados contribuem diretamente para estratégias de proteção da biodiversidade de diferentes ecossistemas e para o uso mais seguro e responsável da nanotecnologia em escala global.

1.2 PROBLEMÁTICA

A intensificação da demanda global por alimentos, associada aos impactos decorrentes das alterações climáticas e ao avanço da ocorrência e resistência de pragas agrícolas, tem impulsionado a adoção de novas técnicas na agricultura. Essas inovações visam não apenas aumentar a produtividade, mas também assegurar a resiliência dos sistemas agrícolas e a sustentabilidade a longo prazo. Dentre as inovações mais emergentes, estão os nanopesticidas. Estas formulações são constituídas por ingredientes ativos (i.a.) de uso agrícola encapsulados (em escala nanométrica) em polímeros biodegradáveis, chamados de nanocarreadores (Grillo et al., 2016; Grillo et al., 2021). O tamanho reduzido e a elevada área superficial dos nanopesticidas melhora a dispersão, condução e controle de liberação do i.a. no ambiente, aumentando sua eficácia no controle de pragas agrícolas (Cano Robles & Cantu, 2017). No entanto, mesmo que comprovados os benefícios dos nanopesticidas em termos de produtividade agrícola, quando estas formulações chegam aos diferentes compartimentos ambientais, podem causar efeitos deletérios sobre organismos não-alvo (Grillo et al., 2021).

Entre os i.a. mais utilizados na agricultura, está a atrazina, herbicida sintético da família das triazinas. Este i.a., ainda que banido da União Europeia desde 2004, continua sendo globalmente utilizado e considerado um dos contaminantes de maior incidência ambiental,

devido à sua alta comercialização, baixo custo, facilidade de aplicação e eficiência no combate a plantas daninhas (Singh et al., 2017). A atrazina é persistente no ambiente, apresenta baixa capacidade de adsorção em solos e moderada solubilidade em água. Com potencial de contaminar não somente os solos agrícolas, mas também as águas subterrâneas e superficiais (Singh et al., 2017), esta molécula também é conhecida por causar efeitos tóxicos sobre o metabolismo, comportamento, reprodução e sobrevivência de organismos não-alvo que vivem em ambientes terrestres e aquáticos (Singh et al., 2017).

Neste sentido, nanoformulações de atrazina (nATZ) têm sido desenvolvidas e estudadas com os objetivos de reduzir os efeitos adversos ao ambiente e de aumentar a eficiência do i.a. (Grillo et al., 2012; Pereira et al., 2014). Os estudos realizados com nATZ revelam que sua eficiência no controle de pragas é maior em relação a atrazina convencional, demandando quantidades menores de aplicação no campo (Takeshita et al., 2021). No entanto, ainda que incipientes, alguns estudos toxicológicos demonstraram uma maior toxicidade da nATZ em comparação com a atrazina convencional. Até o momento, isto foi verificado para microcrustáceos *Daphnia similis* (Clemente et al., 2014), nematoides *Caenorhabditis elegans* (Jacques et al., 2017) e enquitreídeos *Enchytreus crypticus* (Gomes et al., 2019), indicando que a toxicidade e os mecanismos de ação da nATZ sobre organismos não-alvo precisam de maior atenção e investigação.

Simultâneo ao problema da contaminação do solo e da água por nanopesticidas, ocorre a contaminação ambiental por plásticos. Nos últimos anos, a produção de plástico tem aumentado significativamente, alcançando 413,8 milhões de toneladas produzidas em 2023 (PLASTICSEUROPE, 2023). Associado à alta intensidade da produção de plástico no mundo, está o problema da destinação final deste material, que muitas vezes é descartado de forma irresponsável, alcançando corpos hídricos e o solo (Fadare & Okoffo, 2020). No ambiente, a degradação dos plásticos por intempéries, radiação UV, ataques químicos etc., pode originar partículas de tamanho menor, chegando à escala nanométrica, os quais são conhecidos como nanoplásticos (Horton et al., 2017).

No entanto, a entrada de nanoplásticos no ambiente também pode ocorrer por outras vias. Plásticos em escala nanométrica são amplamente utilizados na fabricação de produtos de higiene e cosméticos, e desta forma, atingem facilmente estações de tratamento de efluentes. Neste sentido, estes materiais podem ser introduzidos nos corpos hídricos via lançamento de efluentes domésticos tratados, e no solo via utilização de biossólidos e fertirrigação na agricultura (Nizzeto et al., 2016; Horton et al., 2017; Hofmann et al., 2023). Além disso, os

nanoplásticos podem ser incorporados ao solo através de práticas puramente agrícolas, como plantio de sementes encapsuladas com plástico, e a utilização de biofilmes para a proteção das culturas, que no ambiente sofrem degradação e originam nanoplásticos (Rillig, 2012; Bosker et al., 2019; Hofmann et al., 2023).

Por conta da sua baixa densidade, os nanoplásticos são facilmente transportados entre os compartimentos ambientais pela ação do vento, escoamento superficial e inundações (Horton et al., 2017). Como consequência do seu tamanho nanométrico, este material pode ser facilmente ingerido/absorvido por organismos aquáticos e terrestres, e por possuir uma elevada área superficial específica e grande reatividade, os nanoplásticos podem causar danos tóxicos severos a organismos não-alvo, como estresse metabólico, oxidativo, redução da reprodução e mortalidade, além dos efeitos de bioacumulação e biomagnificação (Jeong & Choi, 2019). Além disso, os nanoplásticos também podem atuar como vetores de outros poluentes, como pesticidas, em função da sua capacidade de adsorver outras substâncias presentes no ambiente (Horton et al., 2017).

Dentre os nanoplásticos que mais vêm sendo estudados, está o nanoplástico de poliestireno (nPPS). Este plástico é amplamente empregado na fabricação de copos, escovas de dente, armação de óculos, embalagens em geral, espuma para isolamento na construção civil, etc (PLASTICSEUROPE, 2023), e já foi detectado em escala nanométrica em solos, sedimentos e água (Wang et al., 2018). Crescentes estudos toxicológicos com este contaminante já reportaram os efeitos deletérios sobre microcrustáceos *Daphnia pulex* (Liu et al., 2011; Liu et al., 2018), nematoides *C. elegans* (Dong et al., 2018; Lei et al., 2018; Kim et al., 2019) e peixes *Danio rerio* (Li et al., 2016; Chen et al., 2017; Pitt et al., 2018). Entretanto, pela heterogeneidade na composição e nos produtos de degradação deste material, o conhecimento da toxicidade e os mecanismos de ação do nPPS sobre organismos de diferentes compartimentos ambientais ainda precisam ser melhor investigados.

Além dos fatores previamente mencionados, é preciso considerar que, quando os nanoplásticos chegam ao solo ou à água, podem encontrar outros contaminantes. Em razão das características intrínsecas dos nanopesticidas, como elevada permeabilidade e lipofilicidade, assim como a capacidade dos nanoplásticos adsorverem outras moléculas, é esperado que estes contaminantes interajam entre si ao chegar nos compartimentos ambientais, tal como já foi observado para a interação com o herbicida glifosato e microplásticos de polietileno em solo (Yang et al., 2019) e para o mesmo herbicida com polietileno e poliamida em água (Zocchi & Sommaruga, 2019). Entretanto, a grande maioria dos estudos toxicológicos com nanoplásticos

existentes até o momento não considerou a presença de outras substâncias no ambiente e os efeitos decorrentes das misturas.

Por se tratar de contaminantes persistentes no ambiente, existe ainda o risco destes compostos causarem efeitos tóxicos ao longo de múltiplas gerações de organismos. Contudo, estudos sobre os mecanismos de ação tóxica, bem como os efeitos toxicológicos multigeneracionais destes dois compostos em mistura não foram encontrados na literatura até o momento. Neste sentido, torna-se importante entender o efeito da toxicidade de nATZ e nPPS, individual e em mistura, para prever seus efeitos toxicológicos e entender os mecanismos de ação sobre organismos de diferentes grupos.

Com base nesta contextualização, as principais perguntas de pesquisa propostas nesta tese são: 1) Quais os riscos e efeitos de toxicidade da nATZ e dos nPPS sobre organismos aquáticos de diferentes grupos? E 2) Quais são os mecanismos de ação tóxica das misturas dos dois nanocontaminantes para organismos aquáticos de diferentes grupos? Para responder às perguntas, testes de toxicidade com organismos aquáticos de diferentes grupos foram conduzidos com os nanocontaminantes, individuais e em mistura, de forma a elucidar os mecanismos e efeitos de toxicidade, bem como as possíveis interações existentes entre os da mistura.

1.3 JUSTIFICATIVA

A ascensão da nanotecnologia na agricultura, especificamente na forma de nanopesticidas, tem despertado tanto interesse quanto preocupações significativas quanto aos seus impactos no meio ambiente. Além disso, a presença disseminada de nanoplásticos em diversos ecossistemas adiciona complexidade e incerteza à avaliação desses impactos. Neste contexto, compreender os efeitos toxicológicos de misturas de nanopesticidas com nanoplásticos sobre organismos de diferentes grupos taxonômicos torna-se essencial. Com esse propósito, esta pesquisa visa investigar a toxicidade e os mecanismos de ação dessas misturas sobre organismos aquáticos representativos de diferentes níveis tróficos.

A importância deste estudo reside em vários aspectos. Primeiramente, a nanotecnologia agrícola é uma área em rápido crescimento, com potencial para transformar a produção de alimentos e o controle de pragas. No entanto, os riscos associados ao uso de nanomateriais, especialmente quando combinados com outros contaminantes, exigem uma

avaliação cuidadosa para garantir a segurança ambiental. A compreensão da toxicidade e dos mecanismos de ação tóxica dessas misturas é, portanto, fundamental para o desenvolvimento de estratégias de mitigação eficazes e a formulação de diretrizes regulatórias que promovam o uso seguro de nanopesticidas e práticas adequadas de gestão de resíduos, visando reduzir a contaminação ambiental por nanoplásticos.

Outro aspecto essencial é os organismos-alvo deste estudo. A escolha dos organismos modelo bioindicadores, como bactérias marinhas (*A. fischeri*), macrófitas (*L. minor*) e microcrustáceos (*D. magna*) de água doce, além de serem mundialmente reconhecidos para esta finalidade, permitiu uma avaliação abrangente dos impactos ecológicos das misturas de nanopesticidas e nanoplásticos, contribuindo para uma compreensão mais abrangente da ecotoxicologia aquática.

Adicionalmente, esta pesquisa se alinha diretamente a diversos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, incluindo o ODS 6 (Água Potável e Saneamento), ao contribuir para a proteção dos corpos hídricos contra poluentes emergentes; o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), ao incentivar o uso seguro e consciente de tecnologias emergentes como os nanopesticidas; e o ODS 14 (Vida na Água), ao apoiar a conservação e o uso sustentável dos oceanos e ambientes aquáticos continentais. Assim, os resultados deste estudo têm o potencial de subsidiar políticas públicas, regulamentações e práticas agrícolas mais sustentáveis, promovendo a proteção ambiental e o desenvolvimento científico responsável.

1.4 HIPÓTESES

- A exposição à nanoatrazina (nATZ) representa um risco ecotoxicológico significativo para organismos não-alvo, sendo possível estimar concentrações ambientais potencialmente seguras por meio da distribuição da sensibilidade das espécies (SSD).
- A presença de nanopartículas de poliestireno (nPPS) altera significativamente os efeitos tóxicos da nATZ sobre *Lemna minor* ao longo de múltiplas gerações, intensificando o estresse oxidativo e comprometendo o crescimento da planta.

- A mistura de nATZ e nPPS causa efeitos sinérgicos e mais severos em *Daphnia magna* e *Aliivibrio fischeri* do que os contaminantes isolados, indicando interação sinérgica entre os poluentes.
- A nATZ representa risco ecológico para organismos aquáticos, especialmente para espécies fotossintetizantes.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Avaliar e entender os mecanismos de ação tóxica de nATZ e do nPPS, individual e em mistura, sobre diferentes modelos toxicológicos aquáticos.

1.5.2 Objetivos específicos

- Compreender a toxicidade de nATZ para organismos não-alvo através de uma revisão sistemática;
- Encontrar concentrações seguras de exposição à nATZ para diferentes espécies, através da abordagem da Curva de Sensibilidade das Espécies (*Species Sensitivity Distributions Curve* - SSD, em inglês);
- Avaliar a influência do nPPS na toxicidade de nATZ, em concentrações ambientalmente relevantes, ao longo de múltiplas gerações de macrófitas *Lemna minor*;
- Avaliar as toxicidades aguda e crônica de nATZ e nPPS, individual e em mistura, sobre microcrustáceos *Daphnia magna*;

- Avaliar os mecanismos de ação tóxica, através de efeitos de estresse oxidativo em microcrustáceos *Daphnia magna* e macrófitas *Lemna minor* expostas à nATZ e nPPS, individual e em mistura;
- Avaliar a toxicidade de nATZ e nPPS, individual e em mistura, sobre a bioluminescência de bactérias marinhas da espécie *Aliivibrio fischeri*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOPESTICIDAS

Atualmente, a nanotecnologia tem sido aplicada nas mais diversas áreas. Por definição, os nanomateriais são partículas de tamanho reduzido, na ordem de 1-100 nm, apresentando propriedades específicas de tamanho, forma e porosidade (Gebre & Sendeku, 2019). Em função das suas características particulares, como reatividade, tamanho reduzido, cargas elétricas superficiais, entre outras, o comportamento dos nanomateriais no ambiente é complexo e precisa ser melhor entendido (Miernicki et al., 2019).

A aplicação de nanomateriais na agricultura vem crescendo nos últimos anos, com destaque ao desenvolvimento de técnicas e produtos que visem a proteção das culturas e aumento da produtividade agrícola (Kah et al., 2014). Dentre os nanoprodutos em evidência na agricultura, estão os nanopesticidas. Os pesticidas nanoencapsulados apresentam melhor permeabilidade e demandam doses menores de aplicação em comparação às formulações convencionais, pois sua natureza nanométrica favorece a dispersão do ingrediente ativo, e, portanto, são considerados mais seguros ambientalmente (Cano Robles & Cantu, 2017).

Contudo, apesar dos avanços e vantagens previamente apresentados, os possíveis danos causados pelos nanopesticidas aos diferentes ecossistemas ainda são pouco conhecidos, tornando evidente a necessidade da realização de estudos sobre a toxicidade e mecanismos de ação tóxica, bem como a avaliação da rota e comportamento ambiental destas formulações nos diferentes ecossistemas (Albuquerque et al., 2020).

2.1.1 Atrazina nanoencapsulada

A atrazina (6-chloro-N-ethyl-N0-(1-methylethyl)-1,3,5- triazine-2,4-diamine) (Figura 1) é um herbicida sintético pertencente ao grupo das triazinas amplamente utilizado no controle de plantas daninhas (Khan & Saidak, 1981). Este i.a. ataca a planta através da inibição do sistema fotossintético (fotossistema II), resultando no seu ressecamento e morte (Nakka et al., 2017). Ainda que seu uso tenha sido banido em alguns países da União Europeia, a atrazina é um dos pesticidas mais consumidos no mundo, registrando um consumo de cerca de 90 mil toneladas de i.a. por ano (Zhang et al., 2018). Em 2023, a atrazina foi o sexto agrotóxico mais vendido no Brasil, com vendas superiores a 26 mil toneladas (IBAMA, 2023). Este i.a.

apresenta alta capacidade de escoamento em águas superficiais, é persistente em solo, tem moderada capacidade de adsorção às frações coloidais do solo (matéria orgânica e argila) e pode representar elevado potencial tóxico aos organismos não-alvo, causando danos ecológicos nas áreas onde é aplicado (Singh et al., 2017).

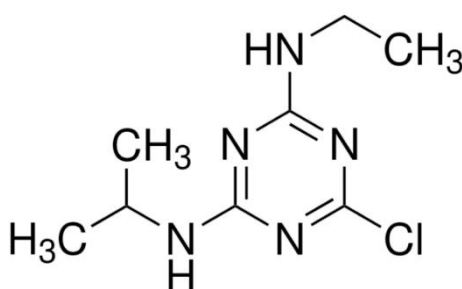


Figura 1 - Estrutura química da atrazina.

Fonte: Merck [<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/45330>]

A atrazina é frequentemente encontrada em solo, águas superficiais e águas subterrâneas (Taverna et al., 2018) e já demonstrou efeitos tóxicos para organismos de diferentes compartimentos ambientais (Singh et al., 2017). Este i.a. pode exercer efeitos de mutagenicidade, genotoxicidade, deficiência na divisão celular e na síntese lipídica, desequilíbrio hormonal, redução na reprodução, redução no crescimento em algas, anelídeos, moluscos, artrópodes, anfíbios, répteis, peixes, roedores e também para o homem, dependendo do período de exposição, intensidade de contaminação e habitat (Singh et al., 2017).

Neste sentido, com o objetivo de reduzir os efeitos adversos da atrazina ao meio ambiente, nanoformulações de atrazina (nATZ) têm sido desenvolvidas e estudadas. Entre as nanoformulações de atrazina mais estudadas, estão as nanocápsulas poli (ε-caprolactona) (PCL) contendo atrazina (Grillo et al., 2012). O nanocarreador PCL é um material biodegradável que possibilita a formulação de nanocápsulas com alta estabilidade de suspensão, impedindo a formação de agregados, com alto encapsulamento e eficiência no controle de liberação lenta do i.a. (Grillo et al., 2012)

Alguns estudos já avaliaram que a aplicação de nATZ foi mais eficiente no combate a plantas daninhas em comparação com a atrazina convencional, diminuindo a quantidade necessária de i.a. para o controle das pragas (Pereira et al., 2014; Oliveira et al., 2015a; Oliveira et al., 2015b; Sousa et al., 2018; Bombo et al., 2019). Neste sentido, os estudos relacionados à eficiência da nATZ revelam que este nanopesticida é uma alternativa promissora e eficiente no controle de plantas daninhas, permitindo reduzir a dose de utilização do herbicida e, por sua

vez, a sua entrada no ambiente (Albuquerque et al., 2020). Entretanto, apesar de conhecida a eficiência da nATZ sobre os organismos-alvo, o conhecimento do seu efeito sobre organismos não-alvo ainda é incipiente.

2.1.2 Efeitos da nATZ sobre organismos não-alvo

Alguns estudos já avaliaram a toxicidade de nATZ com diferentes organismos vivos. A genotoxicidade de nATZ foi comparada à atrazina convencional e indicou uma toxicidade significativamente menor da formulação nanoencapsulada para alface *Lactuca sativa*, em relação à atrazina convencional (Grillo et al., 2012).

A citotoxicidade de nATZ e atrazina convencional também foi comparada para algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e para microcrustáceos *D. similis*, e foi observado que a formulação nanoencapsulada apresentou uma menor toxicidade para as algas (CE_{50} Atrazina = > 97,6 mg L⁻¹ vs. CE_{50} Nanoatrazina = 274,91 mg L⁻¹) e uma maior toxicidade para os microcrustáceos (CE_{50} Atrazina = > 28 mg L⁻¹ vs. CE_{50} Nanoatrazina = 8 mg L⁻¹; Clemente et al., 2014). Os autores explicam que a maior toxicidade observada para *D. similis* pode estar relacionada à presença de outros compostos na nanoformulação, como surfactantes (Clemente et al., 2014).

Pereira et al. (2014) constataram que a nATZ foi eficiente no controle do organismo-alvo *Brassica sp.* e não causou efeitos deletérios sobre o organismo não-alvo *Zea mays*. Os autores também avaliaram que a nATZ apresentou menor mobilidade de atrazina no solo. No mesmo sentido, Oliveira et al. (2015b) observaram que a nATZ foi eficiente no combate à planta daninha *Brassica juncea*, reduzindo sua atividade fotossintética, induzindo a peroxidação lipídica e inibindo o seu crescimento. Os autores também avaliaram os efeitos da nanoformulação para a planta não-alvo *Zea mays* e não verificaram efeitos deletérios.

Gomes et al. (2019) verificaram que a nATZ (CL_{50} = 118 mg kg⁻¹; CE_{50} = 114 mg kg⁻¹) pode ser mais tóxica para organismos do solo *E. crypticus* em comparação à atrazina convencional (CL_{50} = não detectada; CE_{50} = 161 mg kg⁻¹), e os autores explicam que este efeito pode ser decorrente das características da nanopartícula, como o tamanho e as formas de liberação do i.a., favorecendo a absorção do nanomaterial pelos organismos que vivem no solo.

Para a espécie de peixe *Prochilodus lineatus* a toxicidade da nATZ foi menor do que a observada para a atrazina convencional indicando, através da avaliação de biomarcadores hematológicos, glicêmicos, íons plasmáticos e atividade de enzimas branquiais e do fígado,

entre outros *endpoints*, que o nanoencapsulamento do i.a. protegeu os organismos não-alvo dos efeitos do nanopesticida (Andrade et al., 2019).

Oliveira et al. (2015b) encontraram que a nATZ foi eficiente no controle do organismo alvo *Raphanus raphanistrum*, e que apresentou menor citotoxicidade às células de fibroblasto de rato 3T3, bem como menor fitotoxicidade à *Zea mays*, em comparação à atrazina convencional.

Albuquerque et al. (2021) encontraram que a nanoformulação de atrazina afetou significativamente a ação das enzimas β -esterase e da glutatona ($0,002 \text{ mg L}^{-1}$), além de ter causado danos de nível reprodutivo (também na concentração de $0,002 \text{ mg L}^{-1}$) às larvas do inseto *Chironomus sancticaroli*, enquanto a atrazina convencional não causou efeitos deletérios sobre os organismos expostos.

Os estudos apresentados indicam que a toxicidade da nATZ pode variar conforme a espécie empregada e conforme o compartimento ambiental. Neste sentido, é evidente a necessidade de mais estudos para o melhor entendimento da toxicidade e dos mecanismos de ação deste poluente emergente em diferentes ecossistemas.

2.2 NANOPLÁSTICOS

A produção e consumo de plástico no mundo têm aumentado de forma substancial nos últimos anos (PLASTICSEUROPE, 2023). Esse elevado consumo de plástico faz derivar um problema secundário, relacionado ao destino destes materiais no meio ambiente.

A poluição ambiental por plásticos é um problema que persiste há décadas e é fruto da falta de consciência ambiental na utilização e descarte correto destes materiais (Fadare & Okoffo, 2020).

Os nanoplásticos no ambiente podem ter origem primária ou secundária. Os nanoplásticos de ordem primária são aqueles intencionalmente produzidos nesta escala, os quais são amplamente empregados em produtos de cuidados pessoais, cosméticos, higiene e acabam chegando ao meio ambiente, principalmente, através do lançamento de efluentes em corpos hídricos (Andrady, 2011; Nizzeto et al., 2016). Os nanoplásticos de ordem secundária são produtos do processo de degradação de materiais plásticos maiores, e que no ambiente ficam expostos às intempéries e a outros fatores que propiciam a sua fragmentação em

partículas de menor tamanho (Horton et al., 2017). Além disso, os nanoplásticos também podem chegar aos compartimentos ambientais através do uso de plásticos na agricultura. Em meio agrícola, os plásticos são amplamente empregados no encapsulamento de sementes e também estão presentes nos biofilmes, material utilizado para cobrir as culturas com a intenção de protegê-las da infestação de plantas daninhas. Quando exposto às intempéries, este material plástico tende a se degradar podendo gerar fragmentos em escala manométrica (Rillig, 2012).

Devido à baixa densidade e ao tamanho reduzido das partículas, os nanoplásticos podem ser transportados entre os compartimentos ambientais pela ação do vento, do escoamento superficial e das inundações (Horton et al., 2017). Também em razão do tamanho reduzido das partículas, este material pode ser facilmente ingerido/absorvido por organismos que ficam expostos à presença deste material, podendo causar danos tóxicos severos (Jeong & Choi, 2019). Além disso, como consequência da elevada área superficial das partículas e por se tratar de polímeros orgânicos, os nanoplásticos também podem atuar como vetores de outros poluentes, como pesticidas, em função da sua capacidade de adsorver outros contaminantes presentes no ambiente (Horton et al., 2017).

Muitos polímeros sintéticos comumente usados na composição dos plásticos, como polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) e cloreto de polivinil (PVC), são altamente persistentes, tendem a fragmentar-se no ambiente e podem acumular-se nos compartimentos ambientais e interagir com outros poluentes presentes no ambiente (Ng et al., 2019).

2.2.1 Nanoplástico de poliestireno

Derivado do monômero estireno, o polímero de estireno (poliestireno; Figura 2) é um plástico amplamente empregado na produção de diversos produtos cotidianos e, em alguns casos, indispensáveis. A principal forma de uso deste material é na forma de isopor (PLASTICSEUROPE, 2023).

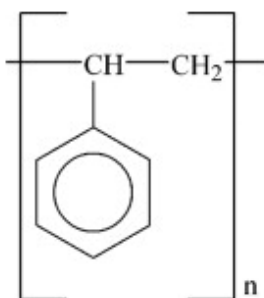


Figura 2 - Estrutura química do poliestireno.

Fonte: McKeen (2008)

Por ser um material amplamente consumido, é também amplamente descartado. No ambiente, este material pode ser facilmente fragmentado, dando origem a nanopartículas ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) de poliestireno. Por apresentar uma densidade muito baixa e tamanho reduzido das partículas, este material pode ser facilmente transportado entre o solo e a água. Também por conta da sua hidrofobicidade e por apresentar uma estrutura amorfa, o poliestireno apresenta alta afinidade por compostos orgânicos, inclusive por (nano)pesticidas (Wagner & Lambert, 2018), podendo atuar como um vetor de outros contaminantes.

Considerando a dificuldade técnica de detecção destes materiais no meio ambiente, é estimado que sejam encontradas no ambiente concentrações de nPPS em cerca de $\leq 10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Lenz et al., 2016). Mesmo em baixas concentrações, a presença deste material no ambiente tem chamado a atenção sobre os problemas de ordem ecológica que podem surgir a partir da exposição de organismos vivos a este tipo de contaminação.

2.2.2 Efeitos do nPPS sobre organismos não-alvo

Alguns estudos já avaliaram a toxicidade de nanoplásticos para diferentes organismos não-alvo. Bhattacharya et al. (2014) verificaram que os nanoplásticos de PE podem ser facilmente adsorvidos pelas folhas de algas, afetando o seu processo fotossintético, além de indicar possíveis impactos aos seus consumidores primários na cadeia trófica. No mesmo sentido, Xiao et al. (2022) avaliaram que concentrações ambientalmente relevantes de nPPS (menores do que $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram absorvidas pelas frondes e pelas raízes de macrófitas *Lemna minor*, no entanto, sem representar efeitos de toxicidade claros às plantas.

Della Torre et al. (2014) observaram que os ouriços do mar podem absorver com facilidade os nPPS. Os autores indicam que as células lipídicas destes organismos conseguem reter os nanoplásticos principalmente em função do tamanho reduzido das partículas. Na mesma

linha, Canesi et al. (2016) encontraram que o nPPS é capaz de causar danos às células de bivalves por conta da facilidade de penetração dos nanomateriais nas membranas.

Moluscos *Mytilus edulis*, quando expostos à nPPS, absorveram quase que diretamente os nanocompostos através de seu intestino (Ward & Kach, 2009). Os nPPS foram tóxicos para o *Mytilus galloprovincialis* (Brandts et al., 2018). De acordo com os autores, o nPPS afetou a expressão de genes e reduziu as atividades enzimáticas no organismo, causando, além de efeitos neurotóxicos, efeitos oxidativos.

O nPPS também causou neurotoxicidade pela inibição da acetilcolinesterase em peixes *D. rerio* (Chen et al., 2017). Estudos avaliando a toxicidade de nPPS sobre microcrustáceos *D. pulex* revelaram efeitos drásticos dos nPPS sobre a reprodução e sobrevivência desses organismos aquáticos (Cui et al., 2017).

Fadare et al. (2019) verificaram a toxicidade de nPPS para neonatos de *D. magna* e observaram que os nanomateriais causaram maior toxicidade ($CE_{50} \text{ Nanopoliestireno} = 10 \text{ mg L}^{-1}$), a partir da ocorrência de mortalidade destes organismos. No estudo de Besseling et al. (2014) o nPPS causou redução na reprodução bem como malformações nos neonatos de *D. magna* a partir da concentração de 150 mg L^{-1} . Vaz et al. (2021) também avaliaram a toxicidade de nanopartículas de poliestireno sobre *D. magna* e encontraram que as nanopartículas após a sonicação (dispersão de partículas por ultrassom) foram menos tóxicas do que as que não foram submetidas ao processo de sonicação ($EC_{50} = 1,28 \text{ mmol}$ vs. $EC_{50} \text{ Sonicação} = 2,77 \text{ mmol}$), mas que ambas nanoformulações causaram danos agudos aos organismos expostos. Em um estudo mais recente, Bandeira et al. (2025) observaram efeitos de letalidade de nPPS sobre *D. magna* a partir da concentração de 75 mg L^{-1} .

2.3 TOXICIDADE DE MISTURAS NO AMBIENTE

Na maioria das vezes, os diferentes compartimentos ambientais concentram uma abundância de substâncias, podendo estas ser poluentes ou não (González-Doncel et al., 2020). De maneira geral, estas substâncias acabam interagindo entre si, e em casos de poluição, as misturas de poluentes no ambiente podem originar interações complexas, resultando em alterações ambientais que frequentemente podem atingir os organismos que ficam expostos a estes cenários de contaminação (Yin et al., 2020).

As interações de poluentes no ambiente podem originar diferentes efeitos toxicológicos, dependendo da concentração de cada poluente, da natureza do poluente, do tempo de exposição etc. Neste sentido, Rodea-Palomares et al. (2015) classificaram as principais interações toxicológicas em categorias diferentes que ajudam a entender os efeitos e interações dos poluentes no meio ambiente. De acordo com o estudo, 1) efeito aditivo pode ocorrer quando o efeito resultante da interação for equivalente à soma dos efeitos individuais dos poluentes envolvidos; 2) efeito sinérgico ocorre quando o efeito resultante da interação entre os poluentes é maior que a soma dos efeitos individuais dos poluentes envolvidos na mistura; 3) efeito antagônico, que ocorre quando o efeito de um dos poluentes da mistura é inibido pela presença de outro poluente.

Em razão da crescente utilização de nanopesticidas aplicados à proteção das culturas, assim como em razão do consumo e descarte de elevada quantidade de plástico, estes produtos inevitavelmente chegarão aos diversos compartimentos ambientais e poderão interagir entre si. Neste sentido, fica evidente a necessidade de compreender melhor os efeitos tóxicos e mecanismos de ação desta mistura em um cenário de contaminação da água.

2.3.1 Misturas de pesticida com plástico

Cada vez mais formulações de pesticidas baseadas em nanotecnologia vêm sendo empregadas no campo, caracterizando uma potencial fonte de poluição. Simultâneo a isto, o consumo de plástico, que vem crescendo progressivamente com o passar dos anos, também tem gerado um problema ambiental relevante em função da sua destinação inadequada, que, ao chegar aos compartimentos ambientais, é degradado lentamente, gerando partículas muito pequenas, de difícil remoção, que podem servir inclusive como carreadoras de outros contaminantes. Dada a emergência destes poluentes e a sua ocorrência no ambiente, é esperado que contaminantes desta natureza se encontrem e interajam entre si, causando efeitos tóxicos e mecanismos de ação diferentes daqueles causados pelos contaminantes individualmente.

Garrido et al. (2019) observaram que a toxicidade da mistura de pesticida, um organoclorado, o clorpirifós, com microplásticos de PE sobre microalgas foi menor em relação à toxicidade individual do pesticida. Os autores apresentam que os microplásticos conseguem adsorver moléculas orgânicas, tais como os organofosforados, com facilidade, deixando o i.a. menos biodisponível para as algas no ambiente. Horton et al. (2017), ao avaliarem a toxicidade combinada de dimetoato e deltametrina, dois pesticidas, com microplásticos de PS, verificaram

que a mistura dos poluentes não afetou a sobrevivência de microcrustáceos *D. magna*. Por outro lado, a mistura do herbicida glifosato com microplásticos de PE afetou a sobrevivência de *D. magna* (Zocchi & Sommaruga, 2019). Os autores também atribuem os seus achados às características do microplástico, que possui capacidade de adsorver outros poluentes orgânicos e carregá-los para o interior dos organismos via processos de ingestão/adsorção. Santos et al. (2022) encontraram que a combinação do herbicida fenmedifan com nanoplásticos afetou drasticamente alguns biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo em peixes *Danio rerio* em comparação com a exposição individual aos contaminantes.

Como é possível observar, são escassos os estudos a respeito da toxicidade e mecanismos de ação de misturas entre pesticidas e plásticos no ambiente, e as ocorrências de estudos que relacionam a atrazina com plásticos são ainda menores. Até o momento, somente dois estudos reportando a toxicidade da mistura de atrazina com plásticos, em micro e nanoescala, no ambiente foram encontrados.

Cheng et al. (2020) avaliaram a toxicidade da mistura do respectivo herbicida com microplásticos de PE, amplamente utilizados em biofilmes aplicados à agricultura. Os autores avaliaram o mecanismo de ação individual e combinada destes dois elementos sobre minhocas *Eisenia andrei* em um solo natural, e constataram que efeitos de estresse oxidativo e de expressão gênica foram potencializados quando as minhocas foram expostas aos contaminantes em mistura. Além disso, os autores também encontraram que a bioacumulação de atrazina nos organismos foi maior após a exposição em mistura do que após a exposição à atrazina isoladamente. Os autores relacionam o sinergismo observado à capacidade de aderência da molécula ao microplástico que, ao ser ingerido pelas minhocas, propiciou um aumento na acumulação de atrazina nos organismos, potencializando os efeitos tóxicos deste i.a. (Cheng et al., 2020).

Wang et al. (2023) usaram nematoides da espécie *C. elegans* como modelo animal para avaliação da toxicidade combinada de hidroxiatrazina, metabólito de transformação da atrazina, e nPPS em função do desenvolvimento de neurônios motores. De acordo com o estudo, a exposição combinada resultou em alterações na locomoção dos organismos e potencializou a neurodegeneração, em relação à exposição aos compostos individuais. Além disso, foi observado que os neurônios que respondem ao estresse também foram afetados através da exposição aos compostos combinados, indicando um efeito sinérgico de neurotoxicidade.

Neste sentido, ainda que previamente conhecidos alguns dos mecanismos de ação individuais da atrazina e dos nanoplásticos, o efeito destes poluentes, especialmente da nATZ

e do nPPS em mistura, ainda é desconhecido. Esta lacuna ainda em aberto na toxicologia ambiental indica que existem muitas questões a respeito do potencial tóxico de misturas de nanocontaminantes em ambiente aquático que precisam ser estudadas.

3 METODOLOGIA

As hipóteses propostas nesta tese foram respondidas por meio de quatro linhas de investigação distintas, estruturadas de forma a atender aos objetivos específicos previamente delineados. A fim de proporcionar uma visão integrada e didática da condução deste trabalho, foi elaborado o esquema conceitual apresentado na Figura 3. Esse esquema detalha, de maneira sistemática, cada capítulo da tese, relacionando-os aos respectivos objetivos abordados, aos experimentos e análises conduzidos em cada etapa e à síntese dos principais resultados obtidos, permitindo visualizar a conexão lógica entre as diferentes fases do estudo.

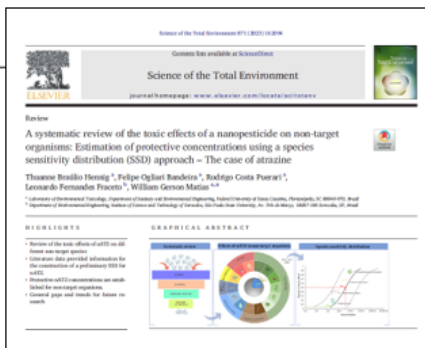
ESQUEMA CONCEITUAL DE TESE

Capítulo 1

Uma revisão sistemática dos efeitos tóxicos de um nanopesticida em organismos não alvo: Estimativa de concentrações protetivas usando uma abordagem de distribuição de sensibilidade de espécies - O caso da atrazina.

Objetivo: Compreender a toxicidade de nATZ para organismos não-alvo, bem como estimar um cenário seguro de exposição a este nanopesticida para diferentes espécies.

- Busca em bases de dados: Toxicidade de nATZ sobre espécies não-alvo (n = 3197);
- Triagem de estudos;
- Análise dos artigos (n = 14);
- Elaboração da curva de distribuição de sensibilidade das espécies;
- Estimativa das concentrações protetivas.

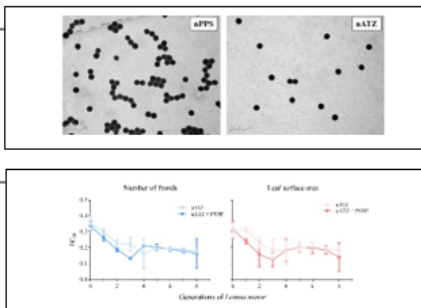


Capítulo 2

A presença de nanoplásticos no ambiente influencia na toxicidade de um nanopesticida para macrófitas *Lemna minor* ao longo de múltiplas gerações?

Objetivo: Avaliar se concentrações ambientais de nPPS podem causar alguma alteração na toxicidade de nATZ para macrófitas em nível multigeracional.

- Síntese e caracterização de nPPS;
- Aquisição e caracterização de nATZ;
- Manutenção do cultivo de *L. minor*;
- Testes de toxicidade com *L. minor* com a geração parental e 8 gerações subsequentes;
- Análise da taxa de crescimento ao longo das gerações;
- Análise de estresse oxidativo em termos de EROs, CAT, MDA e pigmentos.

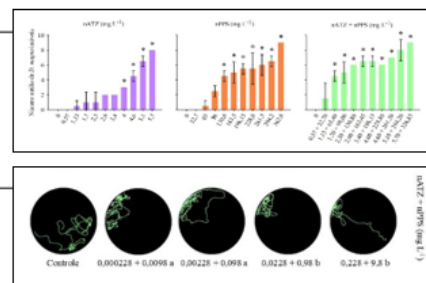


Capítulo 3

Quais são os efeitos toxicológicos da mistura de nanoplásticos com um nanopesticida em *Daphnia magna* e *Aliivibrio fischeri*?

Objetivo: Analisar os efeitos tóxicos da nATZ e nPPS, individual e em mistura, sobre a espécie de microcrustáceo *Daphnia magna* e sobre a espécie de bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*.

- Síntese e caracterização de nPPS;
- Aquisição e caracterização de nATZ;
- Aquisição de *A. fischeri*;
- Manutenção do cultivo de *D. magna*;
- Testes de toxicidade com *D. magna*;
- Método de Abbott (1992) para entender a interação dos nanocontaminantes;
- Análise da letalidade, reprodução, crescimento e comportamento de natação de *D. magna*;
- Análise de estresse oxidativo em termos de EROs, CAT, SOD e GPx;
- Testes de toxicidade com *A. fischeri*.



Capítulo 4

Quais as concentrações protetivas de um nanopesticida para espécies não alvo? Abordagem da curva de distribuição da sensibilidade das espécies para a nanoatrazina

Objetivo: Compreender a análise de risco ecológico para nanopesticidas, bem como trazer maior robustez para os dados de toxicidade, risco e sensibilidade das espécies quando expostas à nATZ.

- Compreender as ferramentas de análise de risco ecológico para nanopesticidas.
- Agregar novos valores de toxicidade à SSD para a nATZ elaborada no Capítulo I a partir de novos dados de literatura e dados de toxicidade gerados nesta tese.

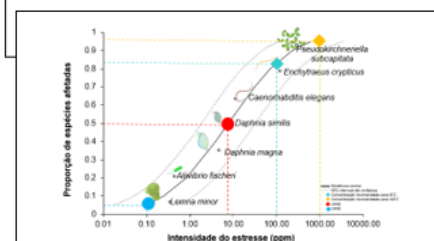


Figura 3 - Representação esquemática das etapas e ações relativas ao desenvolvimento do presente projeto de tese.

O primeiro capítulo foi elaborado com o objetivo de compreender a toxicidade de nATZ para organismos não-alvo, bem como estimar um cenário seguro de exposição a este nanopesticida para diferentes espécies. Para isto, um estudo de revisão sistemática, intitulado “*A systematic review of the toxic effects of a nanopesticide on non-target organisms: Estimation of protective concentrations using a species sensitivity distribution (SSD) approach – The case of atrazine*” (<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162094>) foi conduzido e publicado, em Fevereiro de 2023, no periódico *Science of the Total Environment* (Fator de Impacto 8,2; Figura 4), como sendo o primeiro artigo desta tese.

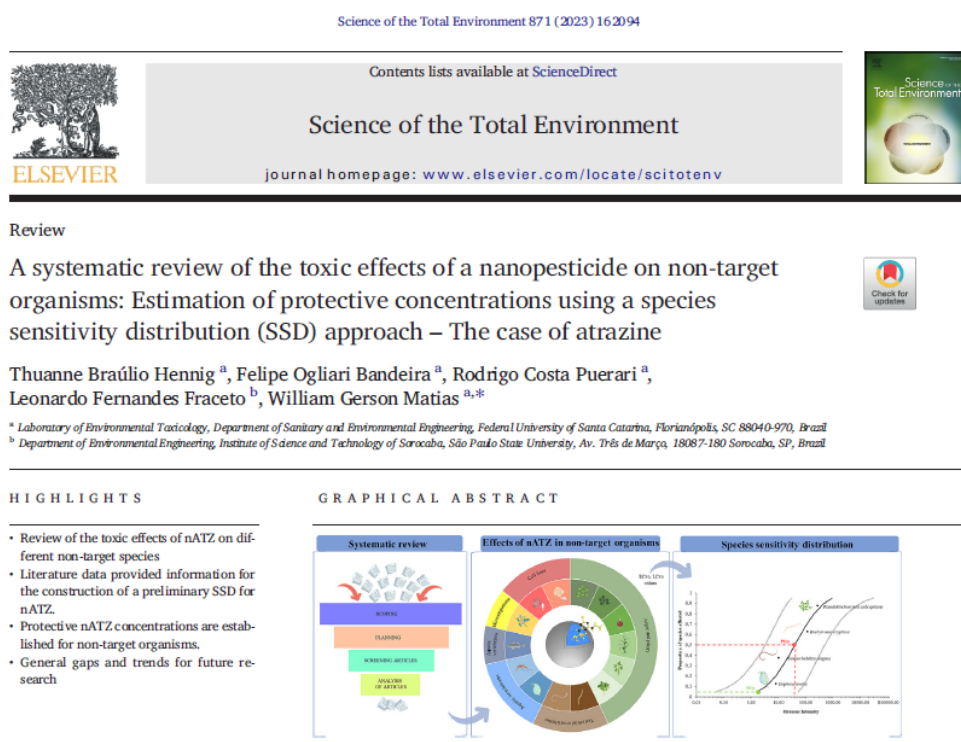


Figura 4 - Imagem da primeira página do artigo *A systematic review of the toxic effects of a nanopesticide on non-target organisms: Estimation of protective concentrations using a species sensitivity distribution (SSD) approach – The case of atrazine*.

O segundo capítulo foi elaborado com o objetivo de avaliar a influência do nPPS na toxicidade de nATZ, em concentrações ambientalmente relevantes, ao longo de múltiplas gerações de macrófitas *Lemna minor*. Os parâmetros analisados ao longo das nove semanas de experimento foram a taxa de crescimento das plantas em termos de número de frondes e área superficial. Além disso, foram avaliados também parâmetros bioquímicos e fisiológicos que refletem sobre o estresse oxidativo e saúde das plantas. Todos os experimentos que constituem

o segundo capítulo foram conduzidos ao longo do período de doutorado sanduíche na *Université du Québec à Montréal* – UQÀM, nos laboratórios *Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms Laboratory* (TOXEN - GRIL) e *Laboratory of Environmental & Analytical Biochemistry of Contaminants*, sob supervisão dos professores Dr. Philippe Juneau e Dr. David Dewez, respectivamente.

O terceiro capítulo deste projeto foi estruturado para responder ao objetivo de avaliar a toxicidade, de nATZ e nPPS, individual e em mistura, sobre microcrustáceos *D. magna* e bactérias marinhas *A. fisheri*. Para *D. magna*, parâmetros de letalidade e biomarcadores de estresse oxidativo foram obtidos para exposições agudas, onde os organismos foram expostos aos contaminantes individuais e em mistura. Testes de toxicidade crônica com *D. magna* também foram conduzidos. Os parâmetros analisados após a exposição crônica dos microcrustáceos foram reprodução em termos de quantidade de neonatos gerados, número de posturas e tamanho dos organismos, além do comportamento de natação e biomarcadores de estresse oxidativo. Além disso, nesta etapa de desenvolvimento da tese, também foram analisados os efeitos de toxicidade de nATZ e nPPS, individual e em mistura, sobre a bioluminescência de bactérias marinhas *A. fisheri*.

O quarto capítulo, foi elaborado com o objetivo de reformular a curva SSD gerada no primeiro capítulo para a nATZ com novas espécies, dando origem a um estudo atualizado com maior discussão a respeito da análise de risco ecológico e concentrações protetivas de nanopesticidas para espécies não-alvo. Este capítulo, intitulado “Quais as concentrações protetivas de um nanopesticida para espécies não-alvo? Abordagem da curva de distribuição da sensibilidade das espécies para a nanoatrazina” foi apresentado no Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, em 2024, em Belém do Pará, e foi publicado nos anais do mesmo evento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CAPÍTULO I - Uma revisão sistemática dos efeitos tóxicos de um nanopesticida em organismos não-alvo: Estimativa de concentrações protetivas usando uma abordagem de distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) - O caso da atrazina.

RESUMO

Nanopesticidas, como a atrazina nanoencapsulada (nATZ), têm sido estudados e desenvolvidos como alternativas ecologicamente corretas para controlar ervas daninhas em campos, exigindo doses mais baixas. Esta revisão contém uma revisão histórica e sistemática da literatura sobre a toxicidade do nATZ para espécies não-alvo. Além disso, o estudo estabelece concentrações protetivas para organismos não-alvo estimadas por meio de uma abordagem de curva de distribuição de sensibilidade das espécies (*Species Sensitivity Distributions Curve* - SSD, em inglês). Através da busca sistemática, foram identificadas 3197 publicações. Dessas, 14 estudos abordaram "a toxicidade do (nano)atrazina para organismos não-alvo". Dados cronológicos e geográficos sobre a publicação de artigos, caracterização da nATZ (tipo de nanocarreador, tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta), design experimental (espécies de teste, tempo de exposição, medidas, metodologia, concentrações testadas) e efeitos tóxicos são resumidos e discutidos. Os dados levantados indicam que modelos celulares e as algas não demonstram sensibilidade à nATZ, enquanto muitos invertebrados terrestres e aquáticos, vertebrados aquáticos, microrganismos e plantas apresentaram alta sensibilidade à nATZ. Os resultados da curva SSD indicaram que *D. similis* é a espécie mais sensível à nATZ, seguida por *C. elegans*, *E. crypticus* e *P. subcapitata*. No entanto, as limitações em termos de número de espécies e parâmetros de toxicidade disponíveis para elaborar a SSD refletem lacunas no conhecimento a respeito dos efeitos da nATZ em diferentes ecossistemas.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; Nanoherbicida; Espécies não-alvo; Concentrações protetivas; Avaliação de risco.

1 INTRODUÇÃO

A atrazina (6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina) é um herbicida triazínico usado no controle pré e pós-emergente de ervas daninhas em várias culturas (Trebst, 2008). Ela atua na fotossíntese, inibindo o fotossistema II, reduzindo assim a produção de biomassa e promovendo o estresse oxidativo na planta (Machado et al., 2006). Embora a atrazina seja eficaz no controle de ervas daninhas em culturas, sua alta persistência nos solos ($DT_{50} = 52,3 \pm 1,1$ dias em solo arenoso e $DT_{50} = 35,5 \pm 3,8$ dias em solo argiloso) potencial moderado de lixiviação ($K_d = 0,65 \pm 0,03$ L kg⁻¹ em solo arenoso e $K_d = 2,01 \pm 0,02$ L kg⁻¹ em solo argiloso), sugere que seu uso indiscriminado pode contaminar o solo e os recursos hídricos, representando riscos para organismos não-alvo, bem como para a saúde humana (Kah et al., 2014; Albuquerque et al., 2021). Por esse motivo, a atrazina foi proibida na Europa em 2004 (Ackerman, 2007), mas continua sendo amplamente utilizada em outras partes do mundo, com um consumo anual entre 70.000 e 90.000 toneladas, sendo o segundo ingrediente ativo (i.a.) mais usado no mundo para o controle de ervas daninhas (Singh et al., 2017).

Estudos recentes têm relatado o potencial da nanotecnologia na melhora da produtividade agrícola, aumento na eficiência do i.a. e soluções para problemas agrícolas e ambientais (Hofmann et al., 2020). Carreadores de pesticidas em nanoescala têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar a eficiência do i.a. contra as pragas agrícolas, promovendo uma liberação lenta e controlada, bem como proteger o i.a. contra a degradação prematura da molécula (Kah et al., 2014; Wang et al., 2022b). As principais vantagens relatadas para o uso de nanopesticidas são a redução na dose e na frequência de aplicação no campo, evitando altas taxas de aplicação e reduzindo o desperdício e os riscos de exposição de organismos não-alvo (Pascoli et al., 2018; Takeshita et al., 2021).

Tecnologias envolvendo sistemas de nanocarreadores para conduzir atrazina (polímero biodegradável poli-ε-caprolactona – PCL, quitosana e nanocarreadores de lipídeos sólidos - SLNs, por exemplo) têm sido desenvolvidas e testadas. A eficácia da atrazina nanoencapsulada (nATZ), também chamada de nanoatrazina, contra plantas daninhas foi avaliada com a espécie alvo *Brassica juncea* em testes de campo (Takeshita et al., 2021) e em casa de vegetação (Bombo et al., 2019; Oliveira et al., 2015; Caixeta Oliveira et al., 2015a; Takeshita et al., 2021). Além disso, outras espécies foram utilizadas em testes de casa de vegetação, como *Bidens pilosa* (Preisler et al., 2020; Sousa et al., 2018), *Amaranthus viridis* (Sousa et al., 2018), *Digitaria insularis* (Sousa et al., 2020) e *Raphanus raphanistrum* (Takeshita et al., 2021). Os

estudos de eficácia revelam que a nATZ pode ser muito eficiente no controle de plantas daninhas, causando efeitos deletérios às espécies testadas, mesmo em concentrações dez vezes menores do que as recomendadas para formulações convencionais de atrazina (Oliveira et al., 2015, Caixeta Oliveira et al., 2015a; Sousa et al., 2018; Takeshita et al., 2021), demonstrando efeitos ainda mais pronunciados em situações realistas no campo em comparação com os testes de casa de vegetação (Takeshita et al., 2021). No entanto, embora a eficácia da nATZ seja conhecida, o conhecimento sobre os efeitos toxicológicos de sua aplicação é incipiente, e concentrações seguras para a exposição de espécies não-alvo ainda são desconhecidas.

O cálculo da curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) é uma abordagem probabilística cumulativa que organiza parâmetros de toxicidade mensuráveis de várias espécies ao longo de uma curva log-normal (Posthuma et al., 2002). Com essa abordagem, é possível estimar concentrações ambientalmente seguras para a aplicação de substâncias (concentrações protetivas - PCs) para proteger diferentes ecossistemas (Kim et al., 2020). Alguns estudos relataram a toxicidade da nATZ para organismos não-alvo de diferentes compartimentos ambientais (Andrade et al., 2019; Albuquerque et al., 2021; Oliveira et al., 2015; Gomes et al., 2022, Gomes et al., 2019; Grillo et al., 2012; Jacques et al., 2017), o que contribuiu para a construção de uma curva SSD da nATZ para organismos não-alvo. Assim, os objetivos desta revisão são: a) revisar a literatura sobre os efeitos da nATZ em organismos não-alvo; e b) gerar uma curva SSD com dados da literatura, para estimar as PCs para organismos não-alvo. Além disso, esta revisão apresenta dados cientométricos (ou seja, número e cronologia de publicações, distribuição de estudos no mundo), desenhos experimentais (ou seja, organismos modelo, tempo de exposição e pontos finais avaliados), toxicidade e risco da nATZ, bem como resultados adversos, lacunas de pesquisa e recomendações para futuras pesquisas. A partir desta revisão sistemática, novas perspectivas são abertas quanto ao entendimento da toxicidade de outros pesticidas nanoencapsulados e para o desenvolvimento de nanopesticidas mais seguros para a promoção de uma agricultura mais sustentável.

2 METODOLOGIA

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão da literatura sobre a toxicidade da nATZ foi realizada através das bases de dados *Web of Science*, *Science Direct*, *Scopus*, *PubMed* e *Google Scholar* (Figura 1). Os seguintes termos foram utilizados nas buscas: "Nanoatrazina", "Nanopesticida atrazina", "Nanoherbicida atrazina", "Atrazina nanoencapsulada", "Toxicidade da nanoatrazina", "Toxicidade do nanoherbicida" e "Toxicidade do nanopesticida atrazina". Ao todo, foram encontradas 3197 publicações, distribuídas em Web of Science (n = 78), Science Direct (n = 440), Scopus (n = 53), PubMed (n = 96) e Google Scholar (n = 2530). Somente artigos de pesquisa que apresentaram resultados de toxicidade da nATZ para organismos não-alvo, escritos em inglês, foram incluídos na revisão. Capítulos de livros, teses, dissertações, protocolos, trabalhos apresentados em congressos e outros eventos, relatórios técnicos, artigos de revisão e artigos de pesquisa duplicados foram excluídos da revisão. Aplicando esses critérios de seleção, um total de 14 artigos publicados até junho de 2022 foi selecionado. Cada artigo foi analisado rigorosamente, e os seguintes dados foram compilados: a) nanocarreador; b) tamanho da nanopartícula; c) índice de polidispersão; d) potencial zeta; e) organismo de teste; f) tempo de exposição; g) medidas; h) metodologia; i) concentrações testadas; j) resumo dos efeitos; e k) referências.

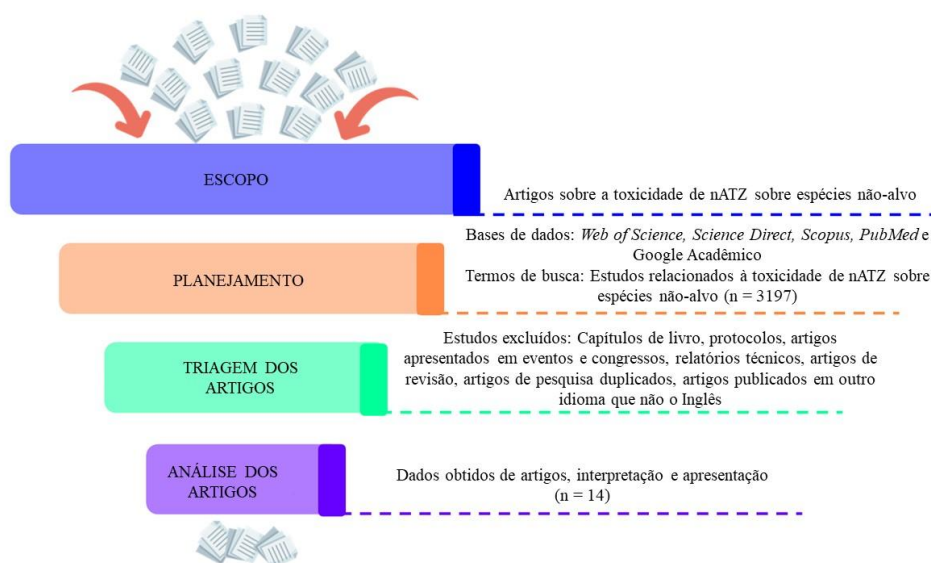


Figura 1 - Metodologia da revisão sistemática da toxicidade da atrazina nanoencapsulada (nATZ) para espécies não-alvo.

2.2 CURVA DE DISTRIBUIÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS ESPÉCIES (SSD)

A SSD foi gerada com base nos dados obtidos na revisão da literatura. Os artigos sobre a toxicidade da nATZ para organismos não-alvo foram analisados rigorosamente e apenas aqueles que apresentaram parâmetros toxicológicos mensuráveis, obtidos por meio de testes de toxicidade, foram selecionados. Entre os artigos encontrados, apenas três identificaram parâmetros de toxicidade mensuráveis da nATZ, totalizando quatro espécies não-alvo.

Dados de concentração efetiva para 50% dos organismos expostos (CE_{50}) foram preferencialmente utilizados. No entanto, quando este parâmetro não estava disponível no estudo, a concentração letal para 50% dos organismos expostos (CL_{50}) foi utilizada para gerar a curva SSD. Utilizando o programa Gerador de Distribuição de Sensibilidade de Espécies da USEPA (USEPA, 2005), esses dados foram distribuídos ao longo de uma curva de distribuição log-normal ($R^2 = 0,886$). Os intervalos de predição foram calculados com base em estimativas de erro médio quadrático (EMQ), soma de quadrados corrigida (CSSQ), seguidas do cálculo da média geral, erro de ponto e intervalos de predição (IP) usando o valor crítico T (USEPA, 2005). As concentrações que protegem 95 e 50% (PC_{95} e PC_{50} , respectivamente) das espécies não-alvo expostas à nATZ foram obtidas a partir da análise da curva SSD.

3 VISÃO GERAL

Os artigos publicados sobre a toxicidade da nATZ para organismos não-alvo ao longo dos anos são mostrados na Figura 2 e na Tabela 1. O primeiro artigo sobre o tema foi publicado em 2012 (Grillo et al., 2012), indicando que a toxicidade de nanopesticidas é um campo de pesquisa recente. O estudo comparou a toxicidade da nATZ e de outros pesticidas nanoencapsulados (ametryn e simazina) com suas respectivas formulações livres e constatou que a nanoencapsulação reduziu a toxicidade das substâncias para as diferentes linhagens celulares testadas. Estudos publicados entre 2014 e 2017 também fizeram comparações de toxicidade entre nATZ e atrazina livre (Clemente et al., 2014), e até mesmo compararam a toxicidade da atrazina carregada em nanocápsulas e em nanoesferas (Pereira et al., 2014). Outros estudos também compararam a toxicidade da nATZ e da atrazina livre com outros pesticidas, encapsulados ou não, como simazina e paraquate (Jacques et al., 2017), bem como misturas de pesticidas (atrazina + simazina) com suas formulações individuais livres (Oliveira et al., 2015).

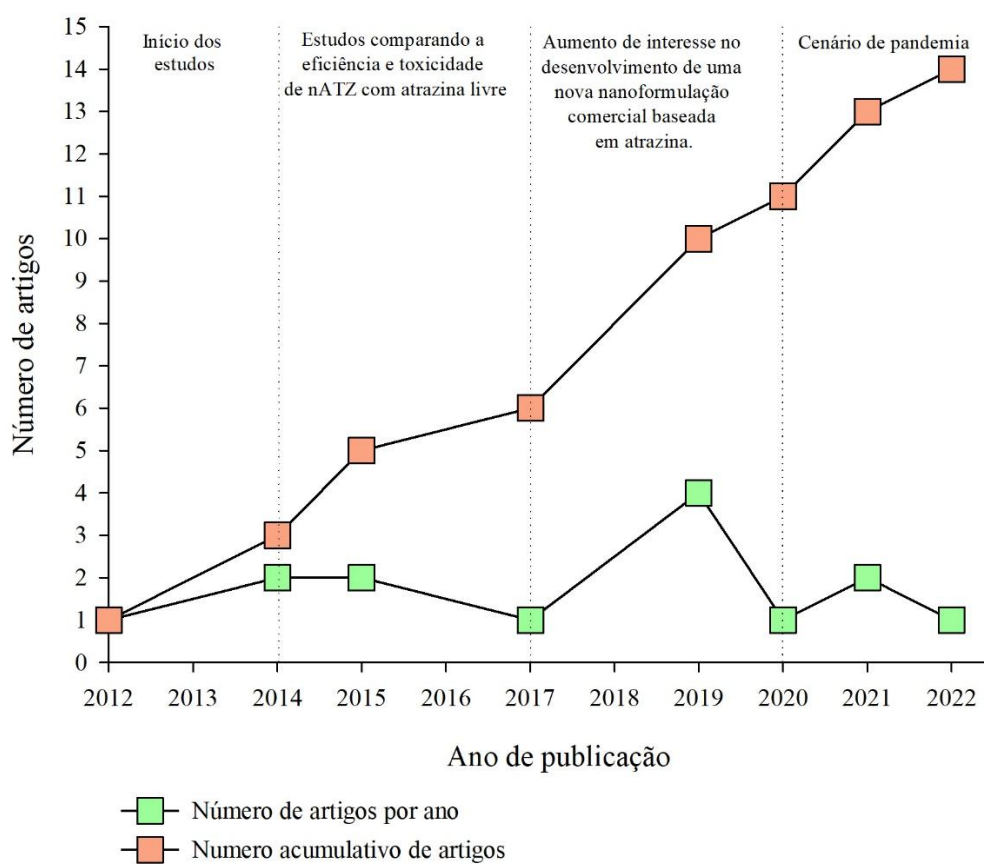


Figura 2 - Cronologia do número absoluto e acumulativo de artigos sobre a toxicidade da atrazina nanoencapsulada (nATZ) para organismos não-alvo.

Tabela 1 - Revisão sistemática dos efeitos da atrazina nanoencapsulada (nATZ) em espécies não-alvo

Grupo de espécies	Espécies teste	Nanocarreador	Tamanho da nanopartícula	pH	PID	Potencial zeta	Constante de liberação (K)	Tempo de exposição	Avaliações	Metodologia	Concentrações testadas	Efeitos da nATZ	Referências
Alga e planta	<i>Allium cepa</i>	PCL	160 - 250 nm	n.a.	< 0,2	-30 mV	0,00068 min ⁻¹	24 h	Genotoxicidade	n.a.	1, 10 e 100 mg L ⁻¹	↓ Índice mitótico	(Grillo et al., 2012)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	PCL	160-250 nm	7,5	n.a.	-30 mV	n.a.	96 h	Inibição do crescimento	OECD 201	Concentrações crescentes espaçadas por um fator de 2	CE ₅₀ = 274,91 (220,90 – 333,82) µg L ⁻¹ ;	(Clemente et al., 2014)
	<i>Allium cepa</i>	PCL	408,5 ± 2,5 nm	6,75 ± 2,2	< 0,2	-30 mV	0,015 min ⁻¹	2 h	Genotoxicidade	n.a.	0,7, 2,1, 6,3, 18,9, e 56,7 µg mL ⁻¹	↑ Danos ao DNA nas células; Ocorrência de aberrações cromossômicas;	(Pereira et al., 2014)
	<i>Zea mays</i>							14 d	Parâmetros fisiológicos e morfológicos	n.a.	2,5 kg ha ⁻¹	Efeitos não foram observados.	
	<i>Zea mays</i>	PCL	240,7 ± 2,9 nm	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1, 2, 4 e 8 d (pós-emergência) e 3 semanas (pré-emergência)	Parâmetros fisiológicos	Oliveira et al. (2015a)	0,1 e 1 mg mL ⁻¹	↓ Fotossistema II pós-emergência; ↓ Taxa de assimilação líquida de CO ₂ pós-emergência;	(Caixeta Oliveira et al., 2015)
									Parâmetros bioquímicos	Camejo et al. (1998)	0,1 e 1 mg mL ⁻¹	↑ LPO pós-emergência; Não foram observados efeitos na pré-emergência.	
	<i>Zea mays</i>	SLN	255,4 ± 3 nm	5,8 ± 0,8	< 0,15	n.a.	0,40 ± 0,03 min ⁻¹	7 e 13 d	Parâmetros fisiológicos e/ou morfológicos	n.a.	0,3 e 3 kg ha ⁻¹	Efeitos não foram observados.	(Oliveira et al., 2015)
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	PCL	270 ± 13 nm	7,2	0,16 ± 0,09	-27 mV	n.a.	24 h	Parâmetros fisiológicos	Lichtenthaler et al. (1983), Boisvert et al. (2006), Strasser et al. (2000), Scognamiglio et al. (2009)	200 nM	↓ Fluorescência fotoquímica.	(Scognamiglio et al., 2019)
	<i>Glycine max</i>	PCL	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	17 d	Parâmetros fisiológicos e/ou morfológicos	n.a.	0,1 e 1 mg mL ⁻¹	↓ Atividade do fotossistema II; ↓ Condutância estomática nas folhas; ↓ Desenvolvimento da raiz; ↓ Parte aérea;	(Preisler et al., 2020)

								60 d	Parâmetros fisiológicos e/ou morfológicos	n.a.	0,1 e 1 mg mL ⁻¹	↓ Atividade do fotossistema II; ↓ Condutância estomática nas folhas; ↓ Raiz e parte aérea.	
	<i>Lactuca sativa</i>	PCL	120 ± 10 nm	n.a.	n.a.	-28 ± 4 mV	n.a.	2, 4 e 6 semanas (depois de 14 d de exposição)	Parâmetros fisiológicos	Lichtenthaler (1987), Wang e Luo (1990), Mosa et al. (2018)	0,25; 1,38; 2,7 mg kg solo ⁻¹	Murchamento, amarelecimento e necrose das folhas; ↓ Biomassa de brotos e raízes; ↓ Desempenho fotossintético;	(Wu et al., 2021)
									Parâmetros bioquímicos	Ma et al. (2016)	0,25; 1,38; 2,7 mg kg solo ⁻¹	↓ Proteína; ↑ ROS e MDA; ↑ SOD, APX, CAT, POD, GST e PPO após exposição prolongada;	
									Deslocamento de nutrientes	Ma et al. (2016)	0,25; 1,38; 2,7 mg kg solo ⁻¹	Interrompeu a absorção de nutrientes minerais; ↓K, Mg, B, Cu após exposição prolongada.	
Invertebrados terrestres	<i>Caenorhabditis elegans</i>	PCL	227,8 ± 8,4 nm	n.a.	0,16 ± 0,03	-7,24 ± 0,1 mV ^a	n.a.	48 h	Sobrevivência	n.a.	0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 mg mL ⁻¹	CL ₅₀ = 0,0102 mg mL ⁻¹ ;	(Jacques et al., 2017)
									Reprodução	n.a.	0,01; 0;05 mg mL ⁻¹	Efeitos não foram observados;	
									Inibição do crescimento	n.a.	0,01; 0;05 mg mL ⁻¹	↓ Reduziu tamanho do corpo.	
	<i>Enchytraeus crypticus</i>	PCL	236 ± 9 nm	n.a.	0,11 ± 0,04	-33 ± 1 mV	n.a.	2 d	Comportamento	ISO 17512-2 (2008)	1, 5, 10, 50, 100 e 200 mg kg ⁻¹	Efeitos não foram observados;	(Gomes et al., 2019)
								28 d	Sobrevivência	OECD 220 (2016)	1, 5, 10, 50, 100 e 200 mg kg ⁻¹	CL ₅₀ = 118 (68-168) mg kg ⁻¹ ;	
								28 d	Reprodução	OECD 220 (2016)	1, 5, 10, 50, 100 e 200 mg kg ⁻¹	CE ₅₀ = 114 (73-156) mg kg ⁻¹	
							46 d	Ciclo de vida total	Bicho et al. (2015)	1, 5, 10, 50, 100 e 200 mg kg ⁻¹	↓ Eclosão e produção de juvenis.		
	<i>Enchytraeus crypticus</i>	PCL	272,2 ± 3,9 nm	n.a.	0,14 ± 0,08	-28,2 ± 1,6 mV	n.a.	3 e 7 d	Expressão gênica	OECD 220 (2016)	100 à 200 mg kg ⁻¹	Ativação de genes de desintoxicação; Os processos metabólicos de lipídios foram afetados;	(Gomes et al., 2022)

A geração de metabólitos
precursores e energia foi
afetada;
Morte celular;
Os processos do sistema
imunológico foram
afetados;
A maturação das proteínas
foi afetada.

Invertebrados aquáticos	<i>Daphnia similis</i>	PCL	160 - 250 nm	7,5	n.a.	-30 mV	n.a.	24 e 48 h	Imobilidade	OECD 202 (1984)	Concentrações crescentes espaçadas por um fator de 1,8	CE _{50-24h} = 22,83 (17,63– 29,93) mg L ⁻¹ ; CE _{50-48h} = 8,00 (5,22–11,13) mg L ⁻¹	(Clemente et al., 2014)
	<i>Chironomus sanctiacaroli</i>	SLN	297 ± 7 nm	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	96 h (agudo) e 10 d (subcrônico)	Imobilidade	OECD 219 (2004), OECD 218 (2004), OECD 233 (2010)	2, 470, 950 e 1900 µg L ⁻¹ (agudo) 2 µg L ⁻¹ (subcrônico)	Mortalidade significativa a partir de 2 µg L ⁻¹ ;	(Albuquerque et al., 2021)
									Parâmetros morfológicos	Arambourou et al. (2012, 2014)	2, 470, 950 e 1900 µg L ⁻¹ (agudo) 2 µg L ⁻¹ (subcrônico)	↑ Deformidade do mento; ↑ Dentes com Köhn Gap;	
									Parâmetros bioquímicos	Bradford (1976), Ellman et al. (1961), Valle et al. (2006), Keen et al. (1976)	2, 470, 950 e 1900 µg L ⁻¹ (agudo) 2 µg L ⁻¹ (subcrônico)	↓ Atividades de EST-α e EST-β (exposição aguda); ↓ Atividades de AChE e EST-α (exposição subcrônica).	
Vertebrados aquáticos	<i>Prochilodus lineatus</i>	PCL	342 - 490 nm	7,8 ± 0,15	n.a.	n.a.	n.a.	24 e 96 h	Genotoxicidade	Singh et al. (1988), Vieira et al. (2016)	2 e 20 µg L ⁻¹	↑ Danos genotóxicos; ↓ Hemoglobina;	(Andrade et al., 2019)
									Parâmetros fisiológicos	Gibbs and Somero (1989), Tellis et al. (2013), Vijayavel et al. (2007), Vitale et al. (1999)	2 e 20 µg L ⁻¹	↑ Na+ ↓ K+ ↓ Ca2+ ↑ Na+/K+-ATPase ↑ H+-ATPase ↓ Ca2+-ATPase	
									Parâmetros bioquímicos	Beutler et al. (1963), McCord e Fridovich (1969), Hopkins e Tudhope (1973), Keen et al. (1976), Camejo et al. (1998), Levine et al. (1994)	2 e 20 µg L ⁻¹	↓ CAT atividade	

Microrganismos	Comunidade da rizosfera microbiana	PCL	120 ± 10 nm	n.a.	n.a.	-28 ± 4 mV	n.a.	2, 4 e 6 semanas	Capacidade metabólica	Echavarri-Bravo et al. (2015)	0,25; 1,38; 2,7 mg kg ⁻¹	↓ Capacidade metabólica;	(Zhai et al., 2020)
									Estrutura e composição das comunidades bacterianas da rizosfera	Zhai et al. (2016), Zhai et al. (2017)	0,25; 1,38; 2,7 mg kg ⁻¹	Alterou a estrutura das comunidades bacterianas na rizosfera;	
									Gêneros bacterianos degradantes e genes funcionais	Garland e Mills (1991)	0,25; 1,38; 2,7 mg kg ⁻¹	↑ A proporção de consórcios bacterianos atuando na degradação do nATZ.	
Linhagens celulares	Células de linfócitos humanos	PCL	160 - 250 nm	n.a.	< 0.2	-30 mV	0,00068 min ⁻¹	1 h	Genotoxicidade	Tice (1988)	100 mg mL ⁻¹	Danos ao DNA.	(Grillo et al., 2012)
	Células de linfócitos humanos	PCL	160 - 250 nm	7.5	n.a.	-30 mV	n.a.	72 h	Citotoxicidade	n.a.	1 mg mL ⁻¹	Efeitos não foram observados.	(Clemente et al., 2014)
	Células de fibroblastos de rato 3T3	SLN	255.4 ± 3 nm	n.a.	< 0.15	n.a.	0,40 ± 0,03 min ⁻¹	24 h	Citotoxicidade	Ensaio MTT	15,6; 31,25 e 62,5 µg mL ⁻¹	↓ Viabilidade celular.	(Oliveira et al., 2015)

PDI - índice de polidispersidade; n.a. - não apresentado; a - Avaliado em solução salina (NaCl), aumento da força iônica; ↑ aumento; ↓ diminuição

Até o momento, 2019 foi o ano mais relevante em termos do número de publicações relacionadas à toxicidade da nATZ para organismos não-alvo (Andrade et al., 2019; Gomes et al., 2019; Preisler et al., 2020; Scognamiglio et al., 2019). O maior número de publicações em 2019 pode ter sido associado aos resultados promissores da eficiência da nATZ no controle de plantas daninhas verificados em vários estudos realizados até 2019 (Bombo et al., 2019; Caixeta Oliveira et al., 2015a; Oliveira et al., 2015; Preisler et al., 2020; Schnoor et al., 2018; Sousa et al., 2018). Os resultados desses estudos podem ter incentivado uma melhor investigação do nanopesticida para o desenvolvimento de novas formulações comerciais. De 2020 a 2022, o número de publicações diminuiu em comparação com 2019 (Albuquerque et al., 2021; Gomes et al., 2022; Wu et al., 2021; Zhai et al., 2020), provavelmente devido às limitações dos laboratórios em conduzir e acessar recursos de nanotecnologia para o desenvolvimento de pesquisas, ou mesmo devido à pandemia de COVID-19, que dificultou as pesquisas sobre tópicos não relacionados à doença (Gao et al., 2021).

A distribuição geográfica dos estudos sobre a toxicidade da nATZ para organismos não-alvo é mostrada na Figura 3. Os estudos a respeito da toxicidade de nATZ foram realizados em quatro países. Este número é muito baixo em comparação com o número de países que possuem programas de pesquisa na área de nanotecnologia (> 60) e nanotoxicologia (> 25) (Hatice, 2019; Rocco et al., 2012).

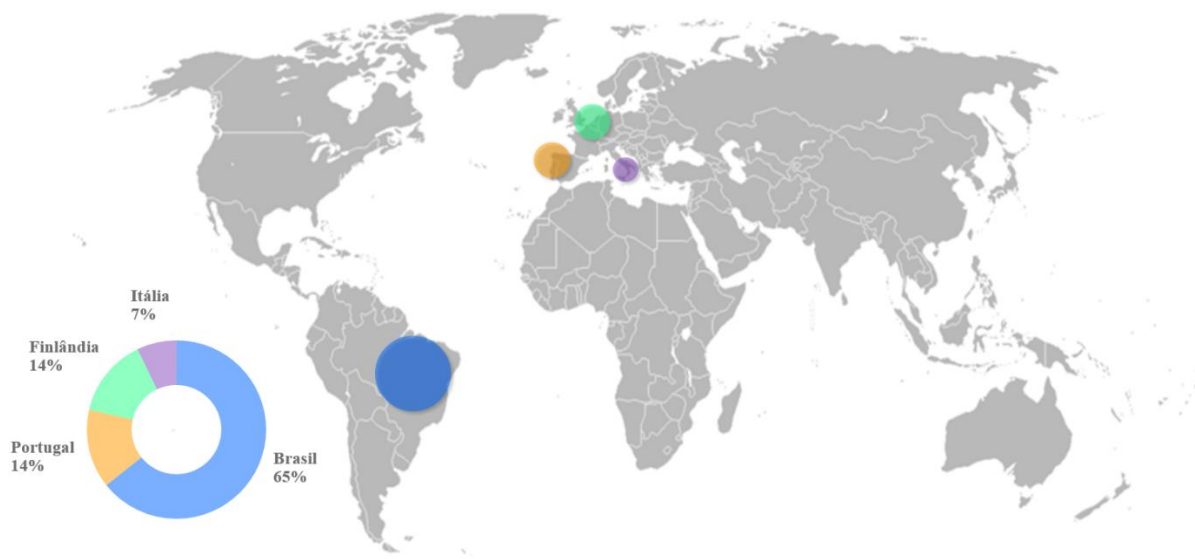


Figura 3 - Distribuição global de artigos a respeito da toxicidade da atrazina nanoencapsulada (nATZ) para organismos não-alvo.

Entre os estudos que avaliam a toxicidade da nATZ para organismos não-alvo relatados nesta revisão, cerca de 65% (8 estudos) foram realizados no Brasil (Albuquerque et al., 2021;

Andrade et al., 2019; Clemente et al., 2014; Grillo et al., 2012; Jacques et al., 2017; Oliveira et al., 2015; Pereira et al., 2014; Preisler et al., 2020). De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a atrazina está entre os dez principais i.a. comercializados nos últimos dez anos (IBAMA, 2020). Concentrações de atrazina de 2,7 a 9,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram encontradas em águas superficiais em várias regiões do Brasil, superando o limite regulatório de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), o que pode prejudicar a saúde humana e a proteção dos ecossistemas (Caldas et al., 2019; Della-Flora et al., 2019; Loro et al., 2015). Nesse sentido, a evidente preocupação com o alto consumo de atrazina no Brasil e a poluição ambiental devido ao seu uso podem ter motivado o estudo da atrazina nanocarreada como estratégia para reduzir a entrada do i.a. no meio ambiente.

Por outro lado, apesar da proibição da atrazina na União Europeia em 2004 (Ackerman, 2007), alguns grupos de pesquisa europeus reconhecem a eficiência desse herbicida no combate a ervas daninhas e consideram o uso da nATZ como uma alternativa para reduzir os danos da atrazina ao meio ambiente. Possivelmente por esse motivo, pesquisadores de Portugal (Gomes et al., 2022, Gomes et al., 2019), Finlândia (Wu et al., 2021; Zhai et al., 2020) e Itália (Scognamiglio et al., 2019) estudaram a toxicidade da nATZ para organismos não-alvo em comparação com a da atrazina livre.

A falta de estudos em países com registros de alto uso de atrazina revela a necessidade de investigar alternativas para o uso do i.a. com menos danos ao meio ambiente. Nos Estados Unidos, por exemplo, são aplicadas 24.000 toneladas de atrazina por ano. Embora muitos estudos tenham encontrado atrazina em concentrações máximas de 0,1047 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Callicott and Hooper-Bùi, 2019), 1,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Glinski et al., 2018), 0,00529 – 0,012 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Battaglin et al., 2018) e 0,183 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Battaglin et al., 2016) em águas superficiais nos Estados Unidos, valores inferiores ao limite de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ permitido pela USEPA (2009), níveis mais altos de poluição já foram detectados. Por exemplo, Hansen et al. (2019) encontraram concentrações de atrazina da ordem de 175,74 $\mu\text{g L}^{-1}$ em águas superficiais nos Estados Unidos, o que é cerca de 58 vezes maior do que o limite permitido pela USEPA (2009). Da mesma forma, o consumo de atrazina na China é superior a 10.000 toneladas por ano, contaminando todos os compartimentos ambientais (Wang et al., 2020a), incluindo as águas superficiais, onde foram encontradas concentrações acima de 4,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tan et al., 2020). Esse valor é o dobro do limite permitido pelo Ministério da Saúde do país (2007). Até o momento, nenhum estudo sobre o desenvolvimento de estratégias para reduzir a contaminação ambiental por atrazina, por meio

da nanotecnologia para o desenvolvimento de nanopesticidas à base de atrazina, foi realizado nesses países.

4 ATRAZINA NANOENCAPSULADA (nATZ)

A nATZ tem mostrado boas propriedades, como estabilidade (potencial zeta de -30 mV), tamanho menor (diâmetro efetivo de cerca de 260 nm), boa polidispersão (índice de polidispersão abaixo de 0,2), indicando excelente homogeneidade de partículas e permeabilidade, e eficiência de liberação satisfatória (56,5%), resultando em maior produtividade agrícola com danos relativamente menores ao meio ambiente (Grillo et al., 2012). Essas propriedades impedem a degradação prematura da molécula, facilitando a interação, absorção e translocação interna pelas plantas daninhas, resultando em alta eficiência de ação através de doses e frequência de aplicação menores (Albuquerque et al., 2020).

Os sistemas de nanocarreadores, em geral, melhoram as propriedades físico-químicas dos pesticidas e promovem uma melhoria na adesão foliar da substância (Yu et al., 2019). Os nanocarreadores favorecem a assimilação rápida do pesticida pela planta, reduzindo as perdas de degradação (devido a fatores ambientais como luz, temperatura, umidade, microrganismos, pH) e lixiviação, consequentemente reduzindo os níveis de i.a. no solo e na água (Duhan et al., 2017). Alguns nanocarreadores podem atravessar barreiras biológicas e se translocar facilmente através de sistemas vasculares, resultando em uma melhoria significativa no transporte e eficácia do i.a. (Falsini et al., 2019; Lowry et al., 2019;) e, consequentemente, influenciando em sua toxicidade para organismos não-alvo.

No caso da nATZ, os estudos relatados nesta revisão utilizaram materiais de PCL e SLN como nanocarreadores para a atrazina (nATZ_PCL e nATZ_SLN, respectivamente). O PCL é um poliéster alifático capaz de formar micro e nanopartículas. Seu uso como carreador de atrazina demonstrou resultados igualmente satisfatórios para o controle de ervas daninhas como a nATZ (Grillo et al., 2012). O SLN, outra alternativa usada como carreador de atrazina, consiste em lipídios que são sólificados em temperatura ambiente. O SLN é igualmente eficiente ao PCL em termos de encapsulamento e modo de ação da atrazina (Oliveira et al., 2015). Ambos os materiais são biodegradáveis, oferecem alta estabilidade coloidal, não representam toxicidade e, portanto, são nanocarreadores adequados para pesticidas (Grillo et al., 2012; Oliveira et al., 2015).

Em geral, os estudos de nATZ_PCL apresentaram tamanho médio de 236 ± 88 nm, índice de polidispersão (IPD) de $0,16 \pm 0,03$, estabilidade medida pelo potencial zeta de -27 ± 7 mV e pH de $7,15 \pm 0,38$. Os estudos de nATZ_SLN apresentaram tamanho médio de cerca de 276 ± 30 nm, $IPD < 0,15$ e pH de $5,8 \pm 0,8$ (o potencial zeta não foi apresentado nos artigos). Apesar da falta de intervalos de confiança estimados em relação ao tamanho da nanopartícula, IPD, potencial zeta e valores de pH, o que reduz a confiabilidade das estimativas e dificulta a comparação com os valores obtidos em outros estudos, esses parâmetros revelam alta estabilidade de suspensão, ausência de formação de agregados e bom perfil de liberação controlada de nanocápsulas (Grillo et al., 2012). Essas propriedades apresentadas para nATZ ajudam a explicar sua eficácia no controle de plantas daninhas (Bombo et al., 2019; Oliveira et al., 2015; Caixeta Oliveira et al., 2015a; Preisler et al., 2020; Sousa et al., 2020; Sousa et al., 2018; Takeshita et al., 2021), resultando na possibilidade de aplicação de concentrações dez vezes menores do que as recomendações dos fabricantes para formulações convencionais de atrazina (Oliveira et al., 2015; Preisler et al., 2020; Sousa et al., 2018; Takeshita et al., 2021). Todos os estudos sobre a eficácia da nATZ o sugerem como uma alternativa promissora e sustentável para o controle de plantas daninhas, mas ainda são necessários estudos sobre sua toxicidade e riscos.

5 ESQUEMA EXPERIMENTAL

5.1 ORGANISMOS MODELO

Os grupos de organismos modelos utilizados nos estudos de toxicidade de nATZ foram resumidos nas Figuras 4 e 5. A maioria dos estudos foi realizado usando apenas um organismo modelo (64,29%; 9 estudos). Por outro lado, alguns estudos foram realizados com dois (28,57%; 4 estudos) e três modelos (7,14%; 1 estudo), concordando com o fato de que testes multi-espécies podem ter maior relevância ambiental devido à previsão de efeitos em ambientes naturais heterogêneos, com diferentes espécies, e níveis tróficos dos ecossistemas (van Gestel, 2012; Figura 4A). Além disso, alguns estudos avaliaram simultaneamente a toxicidade de nATZ, usando organismos não-alvo, e a eficácia de nATZ, usando plantas daninhas como organismos-alvo (21,43%; 3 estudos; Figura 4B), mostrando alta eficiência no controle de plantas daninhas e baixo potencial tóxico da substância para organismos não-alvo.



Figura 4 - Número de espécies não-alvo em cada estudo relatado na revisão sistemática (A) Número de estudos com espécies alvo junto com espécies não-alvo (B) Número de estudos com testes *in vitro* junto com testes *in vivo* (C).

Modelos *in vivo*

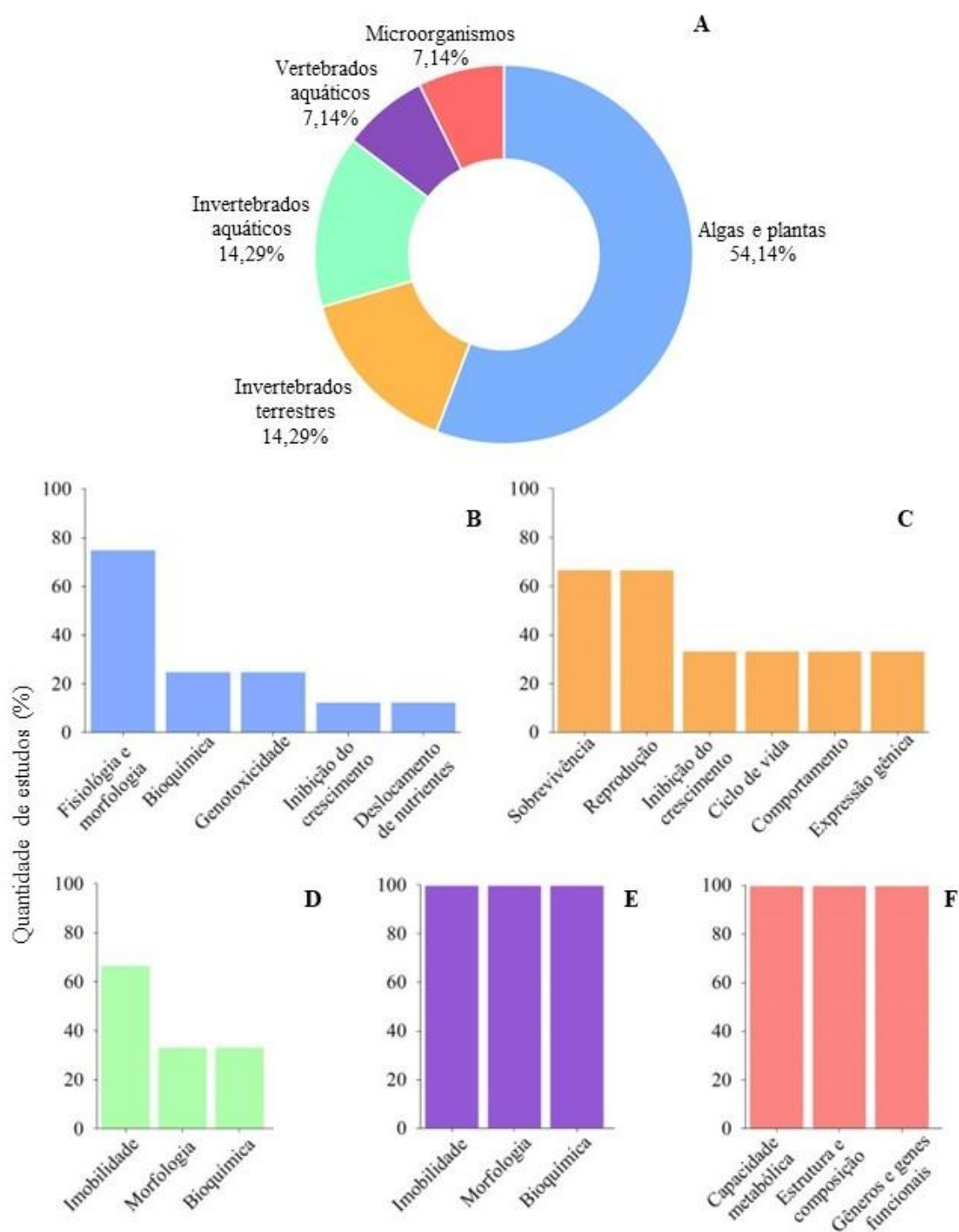


Figura 5 - Grupos de modelos *in vivo* utilizados em estudos de toxicidade da atrazina nanoencapsulada (nATZ) (A). Parâmetros avaliados em estudos de toxicidade de nATZ com algas e plantas (B), invertebrados terrestres (C), invertebrados aquáticos (D), vertebrados aquáticos (E) e microorganismos (F).

A maioria dos estudos foi realizada apenas *in vivo*, devido ao fato de que o uso de modelos animais permitem prever melhor o potencial efeito nos ecossistemas e na saúde humana do que estudos com modelos celulares ou tecidos isolados (van Gestel, 2012). Entre os estudos *in vivo*, os organismos modelo mais utilizados foram plantas e algas (57,14%; 8 estudos), invertebrados edáficos (14,29%; 2 estudos), invertebrados aquáticos (14,29%; 2 estudos), vertebrados aquáticos (7,14%; 1 estudo) e microorganismos do solo (7,14%; 1 estudo), conforme mostrado na Figura 5.

A atrazina atua inibindo o fotossistema II, comprometendo o desenvolvimento de organismos que dependem da fotossíntese (Hess, 2000). Faz sentido que plantas e algas estejam entre os modelos mais utilizados para a avaliação da toxicidade da nATZ, uma vez que o desenvolvimento de plantas e algumas espécies de algas dependem da fotossíntese (Scognamiglio et al., 2019) e podem ser afetados pelo controle de plantas daninhas através do uso da nATZ em campos agrícolas.

Da mesma forma, entender os efeitos toxicológicos dos (nano)pesticidas em invertebrados do solo e microorganismos não-alvo é igualmente importante, uma vez que estes organismos estão na linha de frente à exposição a essas substâncias no solo (Gomes et al., 2019). Esta exposição é capaz de prejudicar os serviços ambientais prestados por estes organismos, nomeadamente a decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e a melhoria da estrutura física do solo (Mekonen Ertiban, 2019; van Gestel, 2012).

Em ambientes aquáticos, altos níveis de atrazina já foram encontrados em águas superficiais de diferentes países, provavelmente devido ao uso exacerbado de formulações comerciais que contém este i.a. (Albuquerque et al., 2021). A preocupação com os efeitos da nATZ em organismos aquáticos envolve a proteção das funções ecológicas por eles fornecidas, bem como a prevenção dos efeitos de bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia trófica, que pode facilmente chegar à escala de consumo humano (Iavicoli et al., 2017; Li et al., 2019).

Além dos testes *in vivo*, alguns dos estudos relatados nesta revisão também envolveram testes *in vitro* (21,43%; 3 estudos; Figura 4C). O princípio da substituição, redução e refinamento (Princípio dos 3R's, em inglês, *Replacement, Reduction and Refinement*) está sendo introduzido em estudos toxicológicos para melhorar os métodos e estimular a substituição de testes *in vivo* por testes *in vitro* sempre que possível (Flecknell, 2002; Reis et al., 2015). No entanto, os testes *in vitro* nem sempre podem ser considerados, por exemplo, na regulamentação sobre o uso de algumas substâncias, como no caso dos pesticidas (Ilyushina et al., 2019). Em

alguns países, pelo menos um teste *in vivo* é exigido em combinação com testes *in vitro* (Booth et al., 2017) para avaliar o efeito da exposição de organismos a substâncias em diferentes níveis (Reis et al., 2015).

Entre os estudos que incluíram testes *in vitro*, as linhagens celulares utilizadas foram células de fibroblastos Rat 3T3 (33,33%; 1 estudo) e células de linfócitos humanos (66,67%; 2 estudos). A primeira linhagem é mais utilizada em ensaios de citotoxicidade e carcinogenicidade, devido à sua sensibilidade e baixo custo. No entanto, para estudos que requerem maior semelhança com os efeitos prováveis de ocorrer em humanos, as linhas celulares humanas são mais adequadas (Boncler et al., 2019). As células de linfócitos humanos têm se mostrado muito eficientes para avaliar a imunidade adaptativa em testes de geno e citotoxicidade (Yuan et al., 2019). Porém, ainda que alguns estudos avaliando a toxicidade da nATZ por meio de testes *in vitro* tenham sido realizados, os efeitos tóxicos relatados até o momento ainda são escassos, revelando a necessidade de melhor compreender o modo de ação dos nanopesticidas, como a nATZ, em nível celular.

5.2 TEMPO DE EXPOSIÇÃO E PARÂMETROS AVALIADOS

Os estudos classificaram seus testes *in vivo* em termos de duração da exposição como curta (42,86%; 6 estudos), média (21,43%; 3 estudos), curta-média-longa (21,43%; 3 estudos), curta-média (14,29%; 2 estudos) ou curta-longa (14,29%; 2 estudos). Os efeitos tóxicos dependentes do tempo foram observados na maioria dos estudos relatados nesta revisão (78,57%; 11 estudos), indicando que o tempo de exposição é um dos principais fatores que influenciam a toxicidade e o risco dos pesticidas para os organismos não-alvo.

Normalmente, o tempo de exposição para cada espécie utilizada em testes ecotoxicológicos é estabelecido por protocolos internacionalmente padronizados. Os métodos padronizados para testes de toxicidade permitem a comparação das respostas obtidas em diferentes laboratórios (Alves e Cardoso, 2016). Poucos estudos (35,71%; 5 estudos) realizaram testes avaliando a toxicidade da nATZ de acordo com protocolos padronizados, dificultando comparações e reduzindo a confiabilidade dos dados.

Entre os estudos *in vivo* (Figura 5A), aqueles que utilizaram plantas (Figura 5B) para avaliar a toxicidade da nATZ focaram principalmente na avaliação de parâmetros fisiológicos e morfológicos (75%; 6 estudos), parâmetros bioquímicos (25%; 2 estudos), genotoxicidade (25%; 2 estudos), inibição de crescimento (12,5%; 1 estudo) e deslocamento de nutrientes

(12,5%; 1 estudo). A maioria dos estudos que utilizaram plantas adotou métodos padronizados para avaliar o potencial tóxico de contaminantes, por meio de avaliações fisiológicas e morfológicas, especificamente no caso de exposição precoce ou subletal de plantas (Knauer e Hommen, 2012; Renzi et al., 2014).

Nos estudos com invertebrados terrestres (Figura 5C), os parâmetros avaliados foram sobrevivência (66,67%; 2 estudos), reprodução (66,67%; 2 estudos), inibição de crescimento (33,33%; 1 estudo), ciclo de vida completo (33,33%; 1 estudo), comportamento (33,33%; 1 estudo) e expressão gênica (33,33%; 1 estudo), mostrando uma defasagem em relação aos parâmetros bioquímicos, que podem refletir o modo de ação tóxico no organismo (Gupta, 2014; Ryan et al., 2007). Por outro lado, os artigos com invertebrados aquáticos (Figura 5D), além da imobilidade (66,67%; 2 estudos), avaliaram parâmetros morfológicos (33,33%; 1 estudo) e bioquímicos (33,33%; 1 estudo) após a exposição à nATZ. No entanto, mesmo que esses sejam parâmetros essenciais, há uma lacuna no conhecimento sobre os efeitos da nATZ na reprodução de invertebrados aquáticos, e consequentemente na sobrevivência das espécies e garantia de suas funções ecossistêmicas.

O único estudo com vertebrados aquáticos (Figura 9E) avaliou a imobilidade e parâmetros morfológicos e bioquímicos. O único estudo que avaliou a toxicidade do nATZ em microorganismos do solo (Figura 5F) avaliou a capacidade metabólica, estrutura e composição da comunidade microbiana, e a degradação de gêneros e genes funcionais após exposição à nATZ. Embora esses estudos tenham avaliado parâmetros relevantes da toxicidade do nATZ, também revelaram que a investigação da toxicidade e do risco da nATZ precisa ser melhor explorada para mais espécies de vertebrados e microorganismos do solo e da água.

Todos os estudos que incluíram testes *in vitro* (Figura 4C) foram conduzidos por curtos períodos de exposição. Testes com células humanas (66,67%; 2 estudos) avaliaram a genotoxicidade e citotoxicidade, enquanto os estudos com linhagens celulares animais avaliaram apenas a citotoxicidade (33,33%; 1 estudo), utilizando metodologias clássicas. Testes de longo prazo com linhagens celulares podem estar fora do alcance de muitos sistemas *in vitro*, devido às restrições de tempo durante as quais uma população celular pode ser mantida vital e estável em culturas (Poteser, 2017), explicando a escassez de testes *in vitro* de longo prazo.

6 TOXICIDADE DE nATZ PARA MODELOS *IN VIVO*

6.1 ALGAS E PLANTAS

As microalgas são consideradas modelos adequados para avaliações toxicológicas e têm sido empregadas em estudos de toxicidade de nanopesticidas. Clemente et al. (2014) expuseram a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* por 96 horas a concentrações crescentes de nATZ_PCL e descobriram que a concentração de 274,91 (220,90 – 333,82) $\mu\text{g L}^{-1}$ inibiu 50 % do crescimento das algas (CE_{50}). De acordo com os autores, a parede celular desta espécie é densa e pode bloquear a entrada de nanopartículas, explicando a baixa toxicidade da nATZ_PCL. Scognamiglio et al. (2019) avaliaram a toxicidade da nATZ_PCL para *Chlamydomonas reinhardtii* a 200 nM (0,043 $\mu\text{g L}^{-1}$) por 24 horas e verificaram que a nATZ_PCL não afetou o crescimento e a pigmentação (expresso em termos de conteúdo de clorofila). O único efeito observado foi a inibição da fluorescência das plantas, mas isso não afetou a atividade fotossintética e os processos vitais de *C. reinhardtii*.

O grupo de organismos mais utilizado nos testes de toxicidade da nATZ foi o de plantas. Grillo et al. (2012) avaliaram efeitos genotóxicos de concentrações crescentes de nATZ_PCL (1, 10 e 100 mg L^{-1}) para *Allium cepa*. As plantas foram expostas à contaminação por 24 horas e os danos celulares foram avaliados através do índice mitótico. Foi observado uma queda não significativa no índice mitótico, abaixo de 22%, para todas as concentrações testadas, indicando baixa citotoxicidade. Aberrações cromossômicas não foram observadas, provavelmente devido à encapsulação do i.a. Por outro lado, Pereira et al. (2014) encontraram que concentrações crescentes de nATZ_PCL aumentaram o dano ao DNA e causaram aberrações cromossômicas em células vegetais, com efeitos mais acentuados em 18,9 e 56,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses efeitos foram possivelmente causados pela interação das partículas com a superfície das raízes das plantas ou pela absorção acentuada pelas raízes, causando alterações celulares devido ao modo de ação do i.a em *A. cepa*.

Pereira et al. (2014) também avaliaram os efeitos da nATZ_PCL em *Zea mays*. As plantas foram expostas à concentração de atrazina recomendada para aplicação em campo (em torno de 2,5 kg ha^{-1}), o que resultou em germinação de cerca de 90 %, não causando efeitos no crescimento dos brotos e raízes. Oliveira et al. (2015) avaliaram a toxicidade da nATZ_SLN para *Z. mays* em plantas pré e pós-emergentes, e também não encontraram quaisquer efeitos do nanopesticida na germinação e desenvolvimento dos brotos e raízes das plantas. Neste caso, é

possível que a glutathione S-transferase (GST), uma enzima presente em *Z. mays*, tenha atuado na detoxificação e degradação da molécula (Oliveira et al., 2015; Pereira et al., 2014). Em outro estudo, Caixeta Oliveira et al. (2015a) expuseram *Z. mays* à nATZ_PCL e observaram que plantas pós-emergentes tratadas com 1 mg mL⁻¹ apresentaram reduções de cerca de 15 % na atividade do fotossistema II e 21 % na taxa de assimilação de CO₂, além de um aumento de 1,8 vezes na peroxidação lipídica (LPO). No entanto, após 4 e 8 dias da aplicação, esses sintomas desapareceram, sugerindo que os efeitos negativos da nATZ_PCL podem ser transitórios em plantas de *Z. mays* devido à sua capacidade de detoxificação.

Preisler et al. (2020) avaliaram os efeitos residuais de curto e longo prazo da nATZ_PCL em *Glycine max* na fase de pré e pós-emergência das plantas. Os resultados indicaram que a nATZ_PCL causou mortalidade de pelo menos 80 % em plantas expostas em ambas as concentrações testadas (0,1 e 1 mg L⁻¹). Para plantas pós-emergentes, o menor tempo de exposição à nATZ_PCL reduziu o rendimento efetivo do fotossistema II em > 94 %, a condutância estomática nas folhas em > 80 % e o crescimento das raízes e brotos em > 63 e 88 %, respectivamente. Os efeitos residuais de longo prazo da nATZ_PCL mostraram reduções no fotossistema II variando de 40 a 72 %, condutância estomática de 50 a 80 %, e desenvolvimento das raízes e brotos de cerca de 50 %. Esses resultados mostraram que a nATZ_PCL pode comprometer as plantas *G. max* pré-emergentes. Estes resultados também estão de acordo com o estudo de Pereira et al. (2014), indicando que os efeitos deletérios da nATZ_PCL em algumas espécies de plantas não-alvo podem ser temporários.

Em contraste, Wu et al. (2021) expuseram *Lactuca sativa* a 0,25, 1,38 ou 2,7 mg kg⁻¹ de nATZ_PCL por curto e longo prazos, e descobriram que longos períodos de exposição parecem agravar os efeitos da nATZ_PCL nesta espécie. Efeitos fisiológicos como murcha das folhas, amarelamento, necrose, diminuições na biomassa dos brotos e raízes e diminuições no conteúdo de clorofila e carotenoides (indicadores de desempenho fotossintético) foram mais aparentes com o aumento das concentrações e do tempo de exposição da planta, mostrando um claro efeito tóxico da nATZ_PCL. Entre os parâmetros bioquímicos, concentrações de nATZ_PCL, juntamente com o aumento do tempo de exposição, causaram uma redução no conteúdo de proteína e aumento no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na produção de malondialdeído (MDA), provavelmente devido ao dano fotossintético às plantas. Consequentemente, isso resultou em aumento na atividade de enzimas defensivas (Superóxido Dismutase - SOD, Ascorbato peroxidase - APx, Catalase - CAT, Polifenol oxidase - PPO, Peroxidase - POD e Glutathione S-transferase - GST), que podem ter atuado no equilíbrio de

EROs das plantas expostas. Após longa exposição, as plantas também apresentaram reduções em macro e micronutrientes (K, Mg, B, Fe e Cu) e diminuições na translocação de Zn das raízes das plantas para os brotos, possivelmente por conta do dano aos mecanismos de captação nutricional das plantas causado pela exposição à nATZ_PCL. Todas essas respostas observadas em experimentos de exposição de longo prazo indicam que o tempo influencia diretamente nos efeitos da nATZ sobre as plantas, o que poderia estar relacionado ao perfil de liberação lenta da nATZ.

É importante também destacar que todos os estudos conduzidos com algas e plantas relatados nesta revisão compararam a toxicidade da nATZ com a toxicidade da atrazina convencional. Entre as 8 espécies estudadas (Tabela 1), a nATZ_PCL demonstrou maior toxicidade, em comparação com a atrazina convencional para fluorescência de *Z. mays* (Caixeta Oliveira et al., 2015b), com um efeito mais pronunciado imediatamente após a aplicação, e também para a espécie *G. max* (Preisler et al., 2020). De acordo com os autores, esses efeitos são devido à permeabilidade da nATZ_PCL nas plantas, que pode ter contribuído para efeitos mais drásticos. Para microalgas *P. subcapitata*, a toxicidade da nATZ_PCL ($CE_{50} = 274,91 \mu\text{g L}^{-1}$; Clemente et al., 2014) foi 2–5 vezes menor do que a toxicidade da atrazina convencional ($CE_{50} = 97,06 \mu\text{g L}^{-1}$; Clemente et al., 2014; $CE_{50} = 60,70 \mu\text{g L}^{-1}$; Chin et al., 2019). Por outro lado, a toxicidade da atrazina convencional para cinco espécies de microalgas *Chlorella* ($CE_{50\text{-médio}} = 465,68 \mu\text{g L}^{-1}$; Chin et al., 2019) parece ser quase o dobro em comparação com a nATZ_PCL ($CE_{50} = 274,91 \mu\text{g L}^{-1}$; Clemente et al., 2014). Essa diferença na toxicidade da nATZ_PCL e da atrazina convencional para diferentes espécies pode estar relacionada à sua parede celular dos organismos, que pode representar uma barreira à entrada de substâncias. No entanto, a escassez de estudos avaliando a toxicidade da nATZ limita a comparação de formulações entre espécies.

6.3 INVERTEBRADOS AQUÁTICOS

Clemente et al. (2014) avaliaram a toxicidade da nATZ_PCL para o microcrustáceo *Daphnia similis*. Os organismos foram expostos a concentrações crescentes da substância por 24 e 48 horas. A nATZ causou imobilização de 50 % dos organismos expostos às concentrações de 22,83 (17,63–29,93) mg L^{-1} e 8,00 (5,22–11,13) mg L^{-1} após 24 e 48 horas, respectivamente. Esses resultados indicaram que a toxicidade da nATZ_PCL tende a ser maior em exposições de longo prazo, afetando a biodisponibilidade da atrazina. Os autores atribuíram a toxicidade ao

efeito combinado do i.a. com outros compostos, como copolímeros contendo derivados de poli(ϵ -caprolactona) presentes na nanoformulação que podem ser liberados ao longo do tempo e da degradação do nanocarreador.

Albuquerque et al. (2021) utilizaram o macroinvertebrado *Chironomus sancticaroli* para avaliar a toxicidade da nATZ_PCL. Os organismos foram expostos por 96 horas a concentrações crescentes de nATZ no teste agudo e por 10 dias à dose de aplicação no campo no teste subcrônico. Imobilidade, mortalidade e biomarcadores morfológicos e bioquímicos foram avaliados nas exposições agudas e subcrônicas. Em ambos os testes, foi observada mortalidade dos macroinvertebrados a partir da concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Nos testes agudos, a imobilidade e a mortalidade aumentaram com o aumento das concentrações. Os biomarcadores morfológicos revelaram que as concentrações crescentes aumentaram a porcentagem de deformidade do mento e a ocorrência de dentes com anomalia de Köhn. Em relação aos biomarcadores bioquímicos, os autores descobriram que a exposição aguda reduziu a atividade de isoenzimas esterases (EST- α e EST- β) com o aumento das concentrações e aumentou a atividade de GST. A exposição subcrônica reduziu a acetilcolinesterase (AChE), a atividade de EST- α , mas não teve efeito sobre as atividades de EST- β e GST. Os autores atribuíram a toxicidade da nATZ ao efeito combinado da atrazina com outros compostos presentes no nanoencapsulamento com SLN.

Ao comparar a toxicidade da nATZ_PCL com a atrazina convencional, Clemente et al. (2014) descobriram que a nATZ_PCL [$\text{CE}_{50} = 8,00 (5,22-11,13) \text{ mg L}^{-1}$] foi 3,5 vezes mais tóxica do que a atrazina convencional ($\text{CE}_{50} > 28 \text{ mg L}^{-1}$) para *D. similis*, possivelmente por conta da presença de copolímeros na nanoformulação, que pode ter agravado a toxicidade, como mencionado anteriormente. Essas conclusões são consistentes com os resultados de Palma et al. (2009), que relataram uma CE_{50} de $35,5 \text{ mg L}^{-1}$ para *Daphnia magna*. Albuquerque et al. (2021) também compararam a toxicidade das duas formulações em *C. sancticaroli* e descobriram que a toxicidade da nATZ_PCL (50 % de letalidade a $2 \mu\text{g L}^{-1}$) pode ser 5 vezes maior do que a da atrazina convencional (10 % de letalidade a $2 \mu\text{g L}^{-1}$) em cenários de exposição aguda. Dessa forma, os microcrustáceos *Daphnia sp.* e insetos bentônicos, como *C. sancticaroli*, parecem ser mais sensíveis à nATZ_PCL em comparação com a atrazina convencional.

6.4 VERTEBRADOS AQUÁTICOS

Até o momento, apenas um estudo (Andrade et al., 2019) avaliando a toxicidade da nATZ em vertebrados aquáticos foi publicado. Peixes da espécie *Prochilodus lineatus* foram expostos por 24 e 96 horas à concentrações variadas de nATZ_PCL. Biomarcadores fisiológicos indicaram que a nATZ_PCL causou uma redução nos níveis de hemoglobina nos peixes na exposição de longo prazo. Isso pode ser explicado pela morte prematura dos glóbulos vermelhos, causada pela ação do i.a., afetando a capacidade de transporte de oxigênio no sangue (Akinrotirni et al., 2010). Além disso, os biomarcadores fisiológicos indicaram um aumento de Na^+ no plasma com o aumento das concentrações de nATZ após exposição de curto prazo, coincidindo com o aumento da atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase nas brânquias. Essa correlação sugere que a atividade enzimática nas brânquias favorece a absorção de Na^+ através do epitélio branquial, resultando no aumento no nível de íons no plasma. Também houve uma redução de K^+ no plasma com aumento da concentração de nATZ após exposição mais longa, e também uma redução de Ca^{2+} para a menor concentração, em ambos os períodos de exposição, também coincidindo com a redução da enzima Ca^{2+} -ATPase, sugerindo uma deficiência na absorção deste íon pelas brânquias. A concentração crescente de nATZ combinada com exposição de longo prazo reduziu a atividade de CAT e, conseqüentemente, a capacidade de desintoxicação do organismo. Através do ensaio do cometa alcalino, os autores descobriram também que o dano genotóxico aumentou em todos os cenários de exposição de concentração e tempo, possivelmente devido à interação do i.a. com as bases de purina do DNA dos organismos (adenina e guanina).

No mesmo estudo, Andrade et al. (2019) compararam a toxicidade da nATZ_PCL e da atrazina convencional para *P. lineatus* e os resultados indicaram que a nATZ_PCL foi menos tóxica. Embora não tenham sido apresentados valores de toxicidade, tornando a comparação direta com outros estudos inviável, os autores observaram que a atrazina convencional causou alterações bioquímicas relevantes, como aumento da glicemia, alterações nos antioxidantes e defesa celular, e aumento da frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares em eritrócitos, que não foram observadas para a nATZ_PCL.

6.5 MICROORGANISMOS

Até o momento, o único estudo de toxicidade com microorganismos reportado para a nATZ foi conduzido por Zhai et al. (2020). Plantas de *Lactuca sativa* foram cultivadas e a rizosfera das plantas foi exposta a baixas, médias e altas concentrações de nATZ_PCL, por diferentes períodos de exposição. De acordo com os autores, a exposição de longo prazo combinada com concentrações crescentes de nATZ_PCL resultou em uma redução na atividade metabólica das bactérias da rizosfera e em alterações na estrutura da comunidade bacteriana. Os filos bacterianos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* apresentaram as maiores mudanças na estrutura pela exposição à nATZ_PCL. Por outro lado, o estudo também mostrou que a exposição de longo prazo favoreceu a proliferação e a ação de genes funcionais na degradação da nATZ_PCL. Os gêneros *Arthrobacter* e *Pseudomonas* contribuíram para a degradação da nATZ_PCL na exposição de curto e médio prazo, enquanto, na exposição de longo prazo, *Rhizobium*, *Aminobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* e *Clostridium* atuaram na degradação da nATZ_PCL. Segundo os autores, a nATZ_PCL perturbou a comunidade bacteriana da rizosfera de *L. sativa* envolvendo mais espécies bacterianas e genes funcionais no processo de degradação do i.a., reduzindo o metabolismo da comunidade bacteriana. Nesse sentido, o uso repetido da nATZ_PCL pode prejudicar a atividade metabólica da comunidade bacteriana, e impactar negativamente a fertilidade do solo (Liu et al., 2019).

Ao comparar a toxicidade da nATZ_PCL com a atrazina convencional, Zhai et al. (2020) concluíram que a nanoformulação causou efeitos mais drásticos na capacidade metabólica das comunidades bacterianas da rizosfera e causou maiores mudanças na composição da comunidade, em comparação com os efeitos observados para a atrazina convencional. Outros estudos também relataram efeitos negativos da atrazina convencional no metabolismo e alteração na comunidade microbiana na rizosfera de culturas como milho, soja e nabo (Shahid et al., 2019; Huang et al., 2022), no entanto, a falta de valores para os parâmetros de toxicidade avaliados limita a comparação desses estudos com o que foi relatado para a nATZ_PCL.

7 TOXICIDADE DE nATZ PARA MODELOS *IN VITRO*

7.1 CÉLULAS HUMANAS

O estudo de Grillo et al. (2012) avaliou a genotoxicidade da nATZ_PCL em células de linfócitos humanos expostas a uma concentração de 100 mg mL^{-1} . O teste cometa indicou que a substância causou danos significativos no DNA das células expostas. Por outro lado, Clemente et al. (2014) avaliaram a citotoxicidade de nATZ_PCL também expondo células de linfócitos humanos a uma concentração de 1 mg mL^{-1} . Através do índice mitótico, os autores descobriram que a nATZ_PCL não causou danos às células. A diferença entre os efeitos observados nos dois estudos pode ser atribuída às concentrações de exposição e às abordagens analíticas empregadas nos estudos.

Ambos os estudos com células de linfócitos humanos também avaliaram a toxicidade da atrazina convencional. Grillo et al. (2012) descobriram que os *scores* de danos causados pela nATZ ($0,9 \pm 0,002$) foram 1,5 vezes menores do que os apresentados para a atrazina convencional ($1,4 \pm 0,002$) em termos de danos ao DNA celular. Clemente et al. (2014) descobriram que a nATZ não causou danos às células em termos do índice mitótico na concentração máxima testada, enquanto a atrazina convencional mostrou efeito significativo nas células (valores do índice mitótico não reportados). Esses efeitos são, possivelmente, devido à liberação lenta e controlada do i.a. propiciada pela nanoformulação, minimizando o efeito tóxico. Clemente et al. (1997), Ribas et al. (1998), Tennant et al. (2001) e Zeljezic et al. (2006) também descobriram que a atrazina convencional pode causar danos severos ao DNA das células linfocitárias humanas.

7.2 CÉLULAS ANIMAIS

Oliveira et al. (2015) utilizaram células de fibroblastos Rat 3T3 para avaliar a citotoxicidade da nATZ. As células foram expostas a concentrações crescentes de nATZ_SLN em ensaio MTT. Os resultados indicaram viabilidade celular de 80 % para células expostas à maior concentração testada, sugerindo baixa toxicidade da nATZ_SLN. De acordo com Clemente et al. (2014), a liberação lenta do i.a. e consequente baixa biodisponibilidade de atrazina para as células durante o período de teste, pode explicar a ausência ou baixa toxicidade

da nATZ_SLN. Nesse sentido, segundo Oliveira et al. (2015), a nanoencapsulação do a.i. pode promover um efeito protetor às células.

O estudo de Oliveira et al. (2015) analisou a citotoxicidade da nATZ (viabilidade celular de 80 %) e da atrazina convencional (viabilidade celular de 64 %) para células de fibroblastos de camundongo Balb-c 3T3 e constatou que a nATZ causou menos danos celulares. Kmetič et al. (2008) descobriram que células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) expostas à atrazina convencional podem ter sua viabilidade drasticamente reduzida (viabilidade celular de 45 %), representando uma citotoxicidade aproximadamente 2 vezes maior do que a relatada para a nATZ no estudo de Oliveira et al. (2015).

8 CURVA DE DISTRIBUIÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS ESPÉCIES (SSD)

Os valores dos parâmetros de toxicidade utilizados para elaborar a SSD estão mostrados na Tabela 2. Métodos consolidados para a elaboração de SSD (como os da Austrália e Nova Zelândia) foram utilizados como base, onde pelo menos cinco espécies e três grupos taxonômicos precisavam ser apresentados (NEPC, 2011). Com base nos estudos disponíveis para a toxicidade da nATZ, apenas dados de toxicidade de quatro espécies, de grupos taxonômicos distintos, apresentaram valores de toxicidade para a construção do SSD (Figura 6).

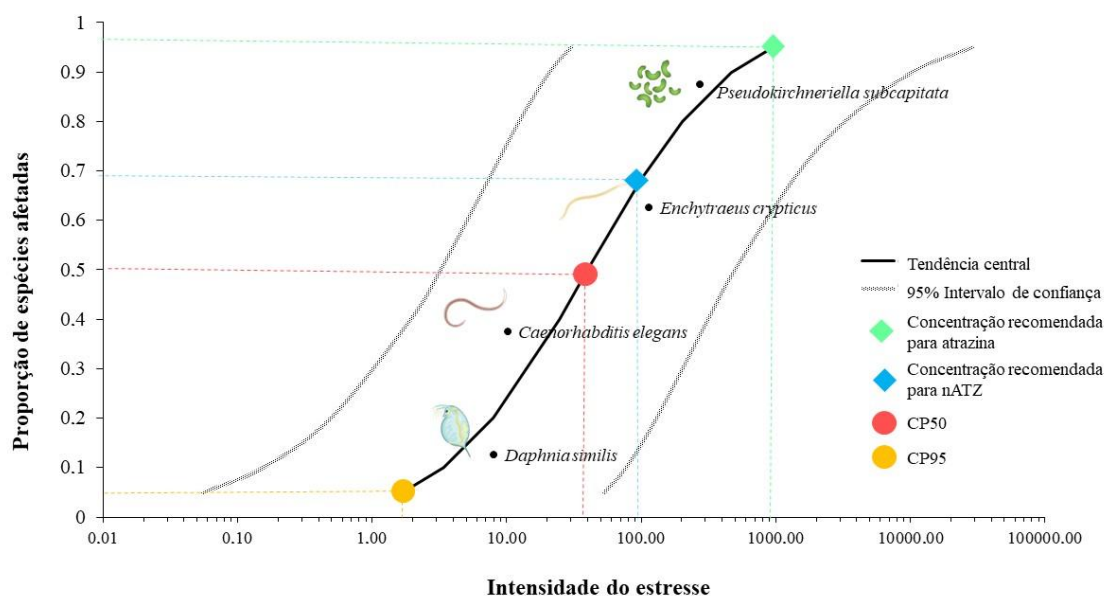


Figura 6 - Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) da atrazina nanoencapsulada (nATZ) com base nos valores dos parâmetros toxicológicos (CE_{50} e CL_{50}) de quatro espécies de grupos taxonômicos distintos expostos em diferentes compartimentos ambientais. CP₉₅: concentrações protetivas para 95% das espécies expostas. CP₅₀: concentrações protetivas para 50% das espécies expostas.

Entre as espécies não-alvo expostas à nATZ relatadas nesta revisão, a espécie mais sensível foi *D. similis* (microcrustáceo), seguida por *C. elegans* (nematóide), *E. crypticus* (enquitréide) e a menos sensível foi *P. subcapitata* (alga). A CP₉₅ foi de 1,71 (0,05 - 53,11) ppm e representou a proteção de todas as espécies descritas na curva, uma vez que os efeitos da nATZ, expressos pelos valores de toxicidade, começaram somente na concentração de 8 ppm, para *D. similis*. A CP₅₀ foi de 39,99 (3,21 - 497,43) ppm, revelando proteção apenas para *E. crypticus* e *P. subcapitata*, já que as concentrações que causaram algum efeito nessas espécies foram quase 3 e 7 vezes maiores do que a CP₅₀. A proteção dessas espécies é muito importante devido à função que estes organismos desempenham em seus respectivos ecossistemas. A espécie de enquitréides *E. crypticus* pertence à classe dos oligoquetas, vive na água dos poros do solo e é essencial para os serviços ecossistêmicos do solo em termos de ciclagem de nutrientes, decomposição de matéria orgânica, além do seu papel ecológico como consumidor e presa no ecossistema terrestre (Castro-Ferreira et al., 2012; Didden, 1993). No compartimento aquático, a microalga *P. subcapitata* é um organismo fotossintético unicelular que está na base da cadeia alimentar aquática, desempenhando um papel importante nos ecossistemas aquáticos (Casado et al., 2013).

É possível que a toxicidade de nATZ não tenha sido tão pronunciada para *E. crypticus* devido ao modo de exposição da espécie ao nanopesticida no solo. Em geral, o solo pode reter contaminantes orgânicos, como a nATZ, tornando-a menos biodisponível para os enquitreídeos (Domene et al., 2012). Com relação à baixa toxicidade da nATZ para *P. subcapitata*, embora seja uma espécie fotossintética, portanto suscetível ao modo de ação específico da nATZ, a densa parede celular dessa espécie pode ter proporcionado uma barreira, dificultando a internalização da nATZ e, conseqüentemente, ao seu modo de ação, causando baixa toxicidade (Clemente et al., 2014).

Por outro lado, microcrustáceos *D. similis* e nematoides *C. elegans* parecem ser mais suscetíveis à ingestão de nATZ, pela natureza do compartimento ambiental que habitam, sofrendo efeitos da ingestão do material nanocarreador. A proteção desses organismos aquáticos e terrestres é muito importante, pois ocupam um lugar importante na cadeia alimentar, consumindo microrganismos e servindo de alimento para organismos maiores (Lv et al., 2017; Williams et al., 2000).

De acordo com o fabricante da atrazina, a dose típica aplicada no campo é de 2.000 g ha⁻¹, o que equivale a cerca de 1.000 mg L⁻¹ (Pereira et al., 2014; Preisler et al., 2020), capaz de afetar quase 100% das espécies expostas (Figura 6). Em um cenário mais protetivo de aplicação de nATZ, com uma dose 10 vezes menor em comparação com a recomendada (Caixeta Oliveira et al., 2015a; Oliveira et al., 2015; Sousa et al., 2018; Takeshita et al., 2021), 68% das espécies expostas ainda seriam prejudicadas, de acordo com a SSD. No entanto, essas constatações devem ser avaliadas com cautela, já que esse não é um cenário realista, pois não é possível presumir que a quantidade de (nano)pesticida aplicada estará totalmente biodisponível para as espécies.

Em consonância com isso, devido aos problemas ambientais e de saúde pública associados à atrazina, a União Europeia proibiu a substância (Hénault-Ethier, 2016), e outros países estabeleceram limites para sua ocorrência na água. Por exemplo, a Organização Mundial da Saúde estabelece um limite máximo de 1 ppm para a ocorrência de atrazina em águas superficiais, enquanto na Austrália (NHMRC/NRMMC, 2011) o nível máximo é de 0,02 ppm, nos EUA (USEPA, 2009) é de 0,003 ppm e na China (Ministério da Saúde, 2007) e no Brasil (CONAMA, 2005) é de 0,002 ppm. De acordo com a SSD deste estudo, essas concentrações de atrazina podem ser consideradas protetivas e capazes de promover a perpetuação das espécies descritas na análise de sensibilidade, pois estão abaixo do valor de CP₉₅. Entretanto,

para aumentar a certeza sobre a segurança dos limites estabelecidos pela legislação, é necessário melhorar a qualidade da curva SSD por meio da inclusão de mais espécies.

A curva SSD elaborada neste estudo tem algumas limitações em termos do número de espécies, bem como em termos das diferenças dos parâmetros de toxicidade usados (CE_{50} e CL_{50}), sugerindo que é necessária uma interpretação cuidadosa dos resultados. Entretanto, até o momento, não foi encontrado na literatura nenhuma curva SSD para espécies expostas à nATZ. Nesse sentido, o presente estudo é o ponto de partida para um melhor conhecimento sobre o risco e a proteção de espécies não-alvo à exposição à nATZ.

Apesar das limitações mencionadas, a CP_{95} para nATZ derivado da curva SSD do presente estudo (1,71 ppm) está dentro da faixa de valores de CP_{95} encontrados para a para atrazina livre (Dreier et al., 2021; Frampton et al., 2006; Pathiratne e Kroon, 2016; Spilsbury et al., 2020). Por exemplo, o CP_{95} para atrazina variou de 0,0014 a 0,028 ppm em curvas SSDs construídas com espécies aquáticas (Dreier et al., 2021; Pathiratne e Kroon, 2016; Spilsbury et al., 2020) a 5,39 ppm em curvas SSDs construídas com espécies de invertebrados terrestres (Frampton et al., 2006). Os valores mais baixos de CP_{95} encontrados nos estudos de Dreier et al. (2021), Pathiratne e Kroon (2016) e Spilsbury et al. (2020), em comparação com o CP_{95} deste estudo, provavelmente se devem à inclusão de um número maior de espécies com alta sensibilidade a herbicidas em suas curvas SSD, como algas verdes, macrófitas e cianobactérias.

9 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

De acordo com esta revisão, a aplicação de nATZ é uma estratégia eficiente para o controle de plantas daninhas em cultivos agrícolas. Entretanto, apesar de exigir aplicações menos frequentes e doses menores, em comparação com a atrazina convencional, os efeitos tóxicos da nATZ foram observados em várias espécies. Nos modelos de algas e células, a toxicidade da nATZ não foi significativa, enquanto nas plantas a toxicidade dependeu das características fisiológicas da espécie e do tempo de exposição. Um efeito transitório de toxicidade foi observado para algumas espécies não-alvo, expresso pela redução da toxicidade com o aumento do tempo de exposição, o que pode estar relacionado à capacidade de desintoxicação das espécies. Por outro lado, resultados com outras espécies indicaram um aumento na toxicidade do nanopesticida com o aumento do tempo de exposição, o que pode estar relacionado à liberação lenta do i.a. no ambiente (e sua maior biodisponibilidade por um

tempo maior), bem como à deficiência de desintoxicação das espécies. Esse comportamento de toxicidade foi observado em invertebrados terrestres e aquáticos e até mesmo em vertebrados aquáticos e microrganismos do solo.

A curva SSD revelou que os microcrustáceos e nematoides podem ser mais sensíveis à nATZ. Isso é motivo de preocupação com relação à exposição dos ecossistemas aquáticos e terrestres à substância. Além de estarem na base da cadeia trófica de seus respectivos ecossistemas, esses organismos têm outros serviços ecossistêmicos importantes, como a detoxicação de ambientes aquáticos, no caso dos microcrustáceos, e a decomposição de matéria orgânica e o controle biológico, no caso dos nematoides. Portanto, a perda desses organismos constituiria um prejuízo irreparável para os ecossistemas.

A concentração protetiva para 95% dos organismos foi protetiva para todas as espécies descritas na curva SSD. Além disso, as concentrações ambientais de atrazina estabelecidas por algumas regulamentações em todo o mundo, não representam risco para as espécies. Por outro lado, as concentrações recomendadas de nATZ para aplicações em campo representariam um risco para cerca de 70% das espécies avaliadas na SSD. Ainda que esta SSD apresente algumas limitações, ela pode ser um ponto de partida para futuras avaliações de risco ecológico e para definir limites regulatórios para esse nanopesticida.

A comparação entre a toxicidade da nATZ e da atrazina convencional ainda é limitada devido à escassez de dados na literatura sobre a toxicidade da nATZ. No entanto, parece que as plantas, os microcrustáceos e os insetos bentônicos parecem ser mais afetados pela nATZ em comparação com os efeitos relatados para a atrazina convencional. Por outro lado, algumas espécies de plantas e algas, peixes e linhagens de células animais e humanas foram marcadas pela maior toxicidade da atrazina convencional em comparação com a nATZ. Além disso, as concentrações protetivas (especialmente a CP₉₅) derivadas para a nATZ parecem estar na mesma ordem de magnitude daquelas já relatadas para a atrazina nas curvas SSD já descritas na literatura.

Com base em nossa análise, é evidente a necessidade de mais estudos para entender melhor como a nATZ afeta diferentes ecossistemas. São necessários estudos sobre a rota, a persistência e a biodisponibilidade da nATZ nos diferentes compartimentos ambientais; a maneira como ele intensifica os efeitos de outros estressores ambientais; seu modo de ação para diferentes espécies não-alvo; e como melhorar a proteção da aplicação no campo. Especificamente, este estudo indicou algumas lacunas de pesquisa que precisam de mais investigação, a saber:

- Investigar o destino ambiental da nATZ por meio de testes analíticos, de campo ou semicampo, identificando padrões de degradação, transformação e transporte da nanoformulação em ambientes naturais (aquáticos ou terrestres);
- Realizar um estudo de revisão comparando estatisticamente a toxicidade da nATZ e da atrazina convencional para organismos não-alvo, para entender as vantagens e desvantagens do desenvolvimento da nanoformulação, bem como entender como ambas as formulações afetam diferentes ecossistemas em termos de toxicidade;
- Ampliar a diversidade de espécies não-alvo nos estudos de toxicidade da nATZ, utilizando organismos de diferentes grupos taxonômicos, incluindo plantas, microorganismos, invertebrados e, quando possível, vertebrados, de ecossistemas terrestres e aquáticos, com o objetivo de compreender o mecanismo de ação tóxica e a toxicidade da nATZ para diferentes espécies. Os ensaios futuros devem ser realizados de acordo com protocolos internacionais para a padronização de testes toxicológicos (por exemplo, ISO, OECD), o que permitirá a comparação dos resultados de toxicidade realizados em diferentes regiões;
- Usar concentrações de nATZ ambientalmente realistas (com base no fabricante de atrazina), períodos de aplicação, rotas e sazonalidade em projetos experimentais, para avaliar a toxicidade da nanoformulação em organismos de teste padronizados ou não padronizados, de diferentes ecossistemas, em condições mais próximas da realidade da aplicação de nATZ;
- Investigar a toxicidade da nATZ em semicampo, em testes de mesocosmos ou multiespécies e testes de campo, para validar os resultados obtidos em ensaios de laboratório e entender melhor os efeitos tóxicos em cenários de contaminação realistas;
- Investigar a toxicidade da nATZ em testes de longo prazo, como na reprodução, em todo o ciclo de vida ou em testes multigeracionais, por exemplo, para entender como a liberação lenta da atrazina dos nanocarreadores influencia os testes de toxicidade, se ela é potencializada ao longo do tempo ou retardada, e também para entender se a exposição de uma determinada geração pode prejudicar as gerações futuras não expostas;
- Investigar a transferência de nATZ ao longo da cadeia alimentar, por meio de testes de toxicidade que incluam organismos da mesma cadeia trófica, em ecossistemas aquáticos e terrestres. Esses estudos podem ajudar a esclarecer se existe um risco de bioacumulação ao longo da cadeia trófica e se os organismos mais acima na cadeia podem estar sujeitos a um risco maior;

- Investigar a interação da nATZ com outros contaminantes de preocupação emergente presentes no ambiente, uma vez que, quando em misturas, eles podem apresentar efeitos tóxicos maiores do que a soma dos efeitos individuais (sinergismo), o que pode agravar o risco ecológico para os compostos em questão;
- Investigar a influência das mudanças climáticas na toxicidade da nATZ para organismos aquáticos e terrestres. Os testes de toxicidade devem ser realizados em diferentes cenários de temperatura, salinidade e/ou umidade do solo para entender se as variações previstas nesses fatores podem influenciar a toxicidade final da nATZ;
- Incrementar a SSD a partir de dados de toxicidade (CE_x ou CL_x) obtidos em testes de toxicidade com organismos não-alvo, com o objetivo de analisar a sensibilidade das espécies, encontrar concentrações potencialmente protetivas e aquelas que representam perigo;
- Estimar a concentração ambiental prevista para a nATZ, por meio da compreensão da dinâmica da nanoformulação no ambiente, tempo de meia vida (DT₅₀), principais culturas de aplicação da nATZ, capacidade das culturas de adsorver a nanoformulação, capacidade da nanoformulação de aderir à matéria orgânica, capacidade de dissolução, tempo de liberação do i.a., que são fatores que regulam a disponibilidade da substância em diferentes compartimentos ambientais; e
- Aprimorar o método de avaliação de risco ecológico para nanopesticidas, como a nATZ, em diferentes compartimentos ambientais, uma vez que os métodos estabelecidos até o momento são usados para formulações convencionais.

Além disso, é importante considerar que esta revisão cria uma perspectiva para o desenvolvimento de nanopesticidas mais seguros, especialmente outros sistemas de nanocarreadores para herbicidas, a fim de promover uma agricultura mais sustentável e diminuir os efeitos sobre organismos não-alvo.

REFERÊNCIAS

ACKERMAN, F. The Economics of Atrazine. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, 13, 437–445, 2007.

AKINROTIRNI, O.A., et al. Haematological characteristics of *Tilapia guineensis* from Buguma creek, Niger delta, Nigeria. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, 9(8), 1415–1422, 2010.

ALBUQUERQUE, F.P., et al. Use of nontarget organism *Chironomus sancticaroli* to study the toxic effects of nanoatrazine. **Ecotoxicology**, 30, 733–750, 2021.

ALBUQUERQUE, F.P., et al. Overview of Nanopesticide Environmental Safety Aspects and Regulatory Issues: The Case of Nanoatrazine, in: **Nanopesticides**. Springer International Publishing, pp. 281–298, 2020.

ALVES, P.R.L., CARDOSO, E.J.B.N. Overview of the Standard Methods for Soil Ecotoxicology Testing, in: **Invertebrates - Experimental Models in Toxicity Screening**. InTech, 2016.

ANDRADE, L.L., et al. Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. **Science of the Total Environment**, 663, 548–559, 2019.

BATTAGLIN, W. A. et al. Pharmaceuticals, hormones, pesticides, and other bioactive contaminants in water, sediment, and tissue from Rocky Mountain National Park, 2012–2013. **Science of the Total Environment**, v. 643, p. 651–673, 2018.

BATTAGLIN, W. A. et al. Potential interactions among disease, pesticides, water quality and adjacent land cover in amphibian habitats in the United States. **Science of the Total Environment**, v. 566–567, p. 320–332, 2016.

BOMBO, A.B., et al. A Mechanistic View of Interactions of a Nanoherbicide with Target Organism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, 4453–4462, 2019

BONCLER, M., et al. Differentiated mitochondrial function in mouse 3T3 fibroblasts and human epithelial or endothelial cells in response to chemical exposure. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 124, 199–210, 2019.

BOOTH, E.D., et al. Regulatory requirements for genotoxicity assessment of plant protection product active ingredients, impurities, and metabolites. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 2017.

CAIXETA OLIVEIRA, H., et al. Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. **PLoS One**, 10, 2015a.

CAIXETA OLIVEIRA, H., et al. Evaluation of the side effects of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules containing atrazine toward maize plants. **Frontiers in Chemistry**, 3, 2015b.

CALDAS, S.S., et al. Occurrence of pesticides and PPCPs in surface and drinking water in southern Brazil: Data on 4-year monitoring. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 30, 71–80, 2019.

CALLICOTT, K.; HOOPER-BUI, L. An investigation of environmental concentrations of atrazine, chlorothalonil, and fipronil in a Mississippi River-influenced marsh in southern Louisiana. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 1241–1248, 2019.

CHIN, Y. Y. et al. Sensitivity of selected tropical microalgae isolated from a farmland and a eutrophic lake to atrazine and endosulfan. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, p. 2981–2998, 2019.

CASADO, M.P. et al. Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery. **Environment International**, 51, 97–105, 2013.

CASTRO-FERREIRA, M.P., et al. *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. **Chemosphere**, 87, 1222–1227, 2012.

CLEMENTE, Z., et al. Ecotoxicological evaluation of poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules containing triazine herbicides. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 14, 4911–4917, 2014.

CLEMENTS, C. et al. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 29, n. 3, p. 277–288, 1997.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em:

<https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf>. (Acesso em 28 de julho de 2022).

DELLA-FLORA, A., et al. Comprehensive investigation of pesticides in Brazilian surface water by high resolution mass spectrometry screening and gas chromatography–mass spectrometry quantitative analysis. **Science of the Total Environment**, 669, 248–257, 2019.

DIDDEN, W.A.M. Ecology of terrestrial *Enchytraeidae*. **Pedobiology** (Jena), 37, 2–29, 1993.

DOMENE, X., et al. Applying a GLM-based approach to model the influence of soil properties on the toxicity of phenmedipham to *Folsomia candida*. **Journal of Soils and Sediments**, 12, 888–899, 2012.

DREIER, D. A. et al. Integrating Exposure and Effect Distributions with the Ecotoxicity Risk Calculator: Case Studies with Crop Protection Products. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 17, p. 321–330, 2021.

DUHAN, J. S. et al. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports**, 2017.

FALSINI, S. et al. When Sustainable Nanochemistry Meets Agriculture: Lignin Nanocapsules for Bioactive Compound Delivery to Plantlets. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, p. 19935–19942, 2019.

FRAMPTON, G. K. et al. Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: a review and analysis using species sensitivity distributions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2006.

FLECKNELL P. Replacement, reduction and refinement. **ALTEX**. 2002;19(2):73-8.

GAO, J., et al. Potentially long-lasting effects of the pandemic on scientists. **Nature Communications**, 2021.

GARCÍA-ESPIÑEIRA, M et al. Toxicity of atrazine- and glyphosate-based formulations on *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 216–222, 2018.

GLINSKI, D. A. et al. Analysis of pesticides in surface water, stemflow, and throughfall in an agricultural area in South Georgia, USA. **Chemosphere**, v. 209, p. 496–507, 2018.

GOMES, S.I.L., et al. High-throughput transcriptomics reveals the mechanisms of nanopesticides – nanoformulation, commercial formulation, active ingredient – finding safe and sustainable-by-design (SSbD) options for the environment. **Environmental Science: Nano**, 9, 2182–2194, 2022.

GOMES, S.I.L., et al. On the safety of nanoformulations to non-target soil invertebrates-an atrazine case study. **Environmental Science: Nano**, 6, 1950–1958, 2019.

GRILLO, R., et al. Poly(ϵ -caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, 231–232, 1–9, 2012.

GUPTA, R. Biomarkers in Toxicology, 1st ed. **Elsevier**, 2014.

HANSEN, S.P., et al. Mitigating the risk of atrazine exposure: Identifying hot spots and hot times in surface waters across Nebraska, USA. **Journal of Environmental Management**, 250, 2019.

HATICE, G.A. Worldwide Nanotoxicology Research Productivity and Contribution of Turkey. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, 44, 205–2014, 2019.

HÉNAULT-ETHIER, L. Backgrounder: Atrazine: Banned in Europe, Common in Canada
Projet KLIMA View project **Elucidating the mechanisms of ROS generation by the herbicide glyphosate** View project, 2016.

HESS, D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, 48, 160–170, 2000.

HOFMANN, T., et al. Technology readiness and overcoming barriers to sustainably implement nanotechnology-enabled plant agriculture. **Nature Food**, 2020.

HUANG, X. et al. Biochar alleviated the toxicity of atrazine to soybeans, as revealed by soil microbial community and the assembly process. **Science of the Total Environment**, v. 834, 2022.

IAVICOLI, I., et al. Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 329, 96–111, 2017.

IBAMA (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS). **Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins**, 2020. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. (Acesso em 28 de julho de 2022).

ILYUSHINA, N., et al. Limitations of pesticide genotoxicity testing using the bacterial in vitro method. **Toxicology in Vitro**, 57, 110–116, 2019.

JACQUES, M.T., et al. Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 139, 245–253, 2017.

KAH, M., et al. Analysing the fate of nanopesticides in soil and the applicability of regulatory protocols using a polymer-based nanoformulation of atrazine. **Environmental Science and Pollution Research**, 21, 11699–11707, 2014.

KIM, D., et al. Multispecies bioassay of propylparaben to derive protective concentrations for soil ecosystems using a species sensitivity distribution approach. **Environmental Pollution**, 265, 2020.

KNAUER, K., HOMMEN, U. Sensitivity, variability, and recovery of functional and structural endpoints of an aquatic community exposed to herbicides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 78, 178–183, 2012.

LI, L., et al. Nanopesticides: A Comprehensive Assessment of Environmental Risk Is Needed before Widespread Agricultural Application. **Environmental Science & Technology**, 2019.

LIU, X., et al. Shift in bacterial community structure drives different atrazine-degrading efficiencies. **Frontiers in Microbiology**, 10, 2019.

LORO, V.L., et al. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 13, 569–578, 2015.

LOWRY, G. V. et al. Opportunities and challenges for nanotechnology in the agri-tech revolution. **Nature Nanotechnology**, v. 14, p. 517–522, 2019.

LV, X., et al. Mechanisms underlying the acute toxicity of fullerene to *Daphnia magna*: Energy acquisition restriction and oxidative stress. **Water Research**, 123, 696–703, 2017.

MACHADO, R.F., et al. Reflexos do mecanismo de ação de herbicidas na qualidade fisiológica de sementes e na atividade enzimática em plântulas de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, 28, 151–160, 2006.

MINISTRY OF HEALTH. **Standards for Drinking Water Quality** (GB5749), 2007.

NEPC (NATIONAL ENVIRONMENT PROTECTION COUNCIL). **Assessment of Site Contamination-Schedule B5a: Guideline on Ecological Risk Assessment**, 2011.

NHMRC/NRMMC (NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL/ NATIONAL RESOURCE MANAGEMENT MINISTERIAL COUNCIL). **Australian Drinking Water Guidelines**. Paper 6 National Water Quality Management Strategy, 2011.

NOVAIS, S.; AMORIM, M. *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) Exposed to Several Toxicants: Effects on Survival, Reproduction and Avoidance Behaviour. **Toxicology Projects**, 2010.

OLIVEIRA, J.L., et al. Solid lipid nanoparticles co-loaded with simazine and atrazine: Preparation, characterization, and evaluation of herbicidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63, 422–432, 2015.

OLIVEIRA, R.S. Introdução ao controle químico, in: *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. **Omnipax**, Curitiba, pp. 125–1740, 2011.

PALMA, P. et al. Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 74, p. 676–681, 2009.

PALOCCI, C. et al. Endocytic pathways involved in PLGA nanoparticle uptake by grapevine cells and role of cell wall and membrane in size selection. **Plant Cell Reports**, v. 36, p. 1917–1928, 2017.

PASCOLI, M., et al. State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with agricultural applications: a minireview. **Energy Ecology and Environment**, 3, 137–148, 2018.

PATHIRATNE, A.; KROON, F. J. Using species sensitivity distribution approach to assess the risks of commonly detected agricultural pesticides to Australia's tropical freshwater ecosystems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, p. 419–428, 2016.

PEREIRA, A.E.S., et al. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, 268, 207–215, 2014.

POSTHUMA, L., et al. Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology. **CRC**, Boca Raton, USA, 2002.

POTESER, M. Cell-based in vitro models in environmental toxicology: a review. **Biomonitoring**, 4, 2017.

PREISLER, A.C., et al. Atrazine nanoencapsulation improves pre-emergence herbicidal activity against *Bidens pilosa* without enhancing long-term residual effect on Glycine max. **Pest Management Science**, 76, 141–149, 2020.

REIS, M.M.S., et al. Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: Advantages and disadvantages. **Journal of Applied Toxicology**, 2015.

RENZI, M., et al. Early warning tools for ecotoxicity assessment based on *Phaeodactylum tricornutum*. **Ecotoxicology**, 23, 1055–1072, 2014.

RIBAS, G. et al. Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, 1998.

ROCCO, L., et al. Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish genomic damage induced by erythromycin and lincomycin. **Environmental Toxicology**, 27, 598–604, 2012.

RYAN, P.B., et al. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, 115, 833–840, 2007.

SCHNOOR, B., et al. Engineering Atrazine Loaded Poly (lactic- co-glycolic Acid) Nanoparticles to Ameliorate Environmental Challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 66, 7889–7898, 2018.

SHAHID, M. et al. In vitro investigation to explore the toxicity of different groups of pesticides for an agronomically important rhizosphere isolate *Azotobacter vinelandii*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 157, p. 33–44, 2019.

SCOGNAMIGLIO, V., et al. An eco-designed paper-based algal biosensor for nanoformulated herbicide optical detection. **Journal of Hazardous Materials**, 373, 483–492, 2019.

SINGH, S., et al., degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, 2018.

SOUSA, B.T., et al. Effectiveness of nanoatrazine in post-emergent control of the tolerant weed *Digitaria insularis*. **Journal of Plant Protection Research**, 60, 185–192, 2020.

SOUSA, G.F.M., et al. Post-emergence herbicidal activity of nanoatrazine against susceptible weeds. **Frontiers in Environmental Science**, 6, 2018.

SPILSBURY, F. D. et al.. Risk Assessment of Pesticide Mixtures in Australian Rivers Discharging to the Great Barrier Reef. **Environmental Science & Technology**, v. 54, p. 14361–14371, 2020.

TAKESHITA, V., et al. Foliar absorption and field herbicidal studies of atrazine-loaded polymeric nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, 418, 2021a.

TAN, H., et al. Pesticide residues in agricultural topsoil from the Hainan tropical riverside basin: Determination, distribution, and relationships with planting patterns and surface water. **Science of the Total Environment**, 722, 2020.

TENNANT, A. H. et al. Genotoxicity studies of three triazine herbicides: in vivo studies using the alkaline single cell gel (SCG) assay. **Mutation Research**, 2001.

TREBST, A. The Mode of Action of Triazine Herbicides in Plants, in: LeBaron, H.M., McFarland, J.E., Burnside, O.C. (Eds.), *Triazine Herbicides*. **Elsevier**, San Diego, pp. 101–110, 2008.

USEPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **National Primary Drinking Water Regulation**. Disponível em: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>, 2009. (Acesso em 28 de julho de 2022).

USEPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Species Sensitivity Distribution Generator** (version 1.0) , 2005. Disponível em: <https://www.epa.gov/caddis-vol4/caddis-volume-4-data-analysis-download-software>. (Acesso em 28 de julho de 2022).

VAN GESTEL, C.A.M. Soil ecotoxicology: State of the art and future directions. **ZooKeys**, 2012.

WANG, A., et al. A nationwide study of the occurrence and distribution of atrazine and its degradates in tap water and groundwater in China: Assessment of human exposure potential. **Chemosphere**, v. 252, 2020.

WILLIAMS, P. L., et al. *Caenorhabditis elegans* as an alternative animal species. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v. 61, p. 641–647, 2000.

WU, J., et al. The Differences between the Effects of a Nanoformulation and a Conventional Form of Atrazine to Lettuce: Physiological Responses, Defense Mechanisms, and Nutrient Displacement. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 69, p. 12527–12540, 2021.

YU, M. et al. Tannic acid-based nanopesticides coating with highly improved foliage adhesion to enhance foliar retention. **RSC Advances**, v. 9, p. 27096–27104, 2019.

YUAN, X., et al. Cellular Toxicity and Immunological Effects of Carbon-based Nanomaterials. **Part Fibre Toxicology**, 2019.

ZELJEZIC, D. et al. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 923–935, 2006.

ZHAI, Y., et al. Interaction between a nano-formulation of atrazine and rhizosphere bacterial communities: Atrazine degradation and bacterial community alterations. **Environmental Science: Nano journal**, v. 7, p. 3372–3384, 2020.

4.2 CAPÍTULO II – A presença de nanoplásticos no ambiente pode influenciar a toxicidade de um nanopesticida para lemnas ao longo de múltiplas gerações?

RESUMO

Os nanoplásticos e os nanopesticidas são contaminantes de preocupação emergente para o meio ambiente, mas seus efeitos ecotoxicológicos sobre os organismos aquáticos ainda são pouco conhecidos. Este estudo investigou a toxicidade combinada de uma concentração ambientalmente relevante de nanoplásticos de poliestireno (nPPS) com concentrações crescentes de nanoatrazina encapsulada em PCL (nATZ). Os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo OECD 221, avaliando os efeitos na geração parental (P0) e em oito gerações filiais sucessivas (F1-F8) de *Lemna minor*. As avaliações incluíram parâmetros de crescimento da colônia, em termos de número de frondes e área de superfície foliar, bem como biomarcadores de estresse oxidativo, como espécies reativas de oxigênio (EROs), atividade da catalase (CAT) e peroxidação lipídica (LPO). A concentração de 0,001 mg L⁻¹ de nPPS não afetou a taxa de crescimento da colônia de lemnas nem induziu o estresse oxidativo durante as nove gerações avaliadas. Por outro lado, a exposição à nATZ representou toxicidade para as lemnas, inibindo a taxa de crescimento das colônias e revelando um aumento da toxicidade nas gerações subsequentes. A análise do estresse oxidativo indicou um aumento na geração de EROs e a inibição da atividade da CAT em resposta à exposição ao nATZ. A presença de nPPS não alterou significativamente a toxicidade da nATZ em termos de taxa de crescimento da colônia. No entanto, o nPPS teve influência em termos de estresse oxidativo, potencializando a geração de EROs e a inibição da CAT para algumas concentrações de nATZ e para algumas gerações de lemnas. Esses resultados lançam uma nova luz sobre a ecotoxicologia das misturas de nanocontaminantes em cenários multigeracionais.

Palavras-chave: Toxicidade da mistura, toxicidade multigeracional, nanoatrazina, nanoplásticos de poliestireno

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos estão presentes em diversos compartimentos ambientais e são considerados uma das principais preocupações ecológicas do mundo. Nos ecossistemas aquáticos, eles geralmente aparecem como microplásticos (< 5 mm) e nanoplásticos (< 100 nm; Junhao et al., 2021), originários de várias fontes antropogênicas, como descarte inadequado de resíduos sólidos, esgoto, atividades industriais e a degradação de plásticos maiores que já estão no ambiente (Mitrano e Wohlleben, 2020; MacLeod et al., 2021). Nanoplásticos já foram detectados em ambientes marinhos e de água doce, onde são prontamente ingeridos por organismos em diferentes níveis tróficos, acumulam-se nos tecidos e podem ser transferidos pela cadeia alimentar (Mattsson et al., 2017). Além disso, estudos recentes identificaram nanoplásticos em tecidos humanos, incluindo o fígado e a corrente sanguínea, apontando para a exposição contínua e sistêmica a essas partículas (Leslie et al., 2022).

O plástico poliestireno está presente em diversos materiais de uso cotidiano (PLASTICSEUROPE, 2023). Isso propicia sua presença em diferentes ambientes e, devido aos mecanismos de degradação abiótica, esses materiais podem atingir uma escala nanométrica (Oscar et al., 2025), onde podem ser transformados em nanoplásticos. Apesar disso, os nanoplásticos de poliestireno (nPPS) também são fabricados intencionalmente em escala nanométrica para serem incorporados em produtos de higiene pessoal, cosméticos, higiene, limpeza e artefatos têxteis, cujas nanopartículas acabam chegando ao meio ambiente por meio do lançamento de efluentes em corpos hídricos (Andrady, 2011; Nizzeto et al., 2016). Essas nanopartículas podem se mover facilmente entre diferentes compartimentos ambientais e, além disso, suas propriedades hidrofóbicas e a alta área de superfície específica facilitam seu papel como transportadoras de outros poluentes químicos já presentes no ambiente, como os nanopesticidas (Qi et al., 2020).

Nanoformulações de atrazina (nATZ) foram desenvolvidas para reduzir os efeitos adversos do ingrediente ativo (i.a.) atrazina, por meio da liberação controlada da substância no ambiente (Grillo et al., 2012). Entre as nanoformulações está a nanoencapsulação de atrazina em nanocápsulas de poli ϵ -caprolactona (PCL), um polímero biodegradável com alta estabilidade de suspensão, alta eficiência de encapsulação e controle de liberação de atrazina (Grillo et al., 2012). Estudos já revelaram a alta eficácia do nATZ no combate às plantas daninhas, com eficiência dez vezes maior do que a atrazina convencional (Bombo et al., 2019; Caixeta Oliveira et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Pereira et al., 2014; Sousa et al., 2020),

possibilitando a redução da dose de aplicação da atrazina e, conseqüentemente, o seu aporte no meio ambiente (Albuquerque et al., 2020). No entanto, o conhecimento sobre seus mecanismos de ação tóxica e seu comportamento em misturas com outros contaminantes ainda é limitado (Hennig et al., 2023).

Cheng et al. (2020) descobriram que as minhocas *Eisenia andrei* sofreram efeitos de estresse oxidativo e alterações na expressão gênica quando expostas a uma mistura de atrazina e nanoplásticos de polietileno, além de maior bioacumulação de atrazina nos organismos expostos em comparação com a exposição individual à atrazina. Wang et al. (2023) descobriram que a toxicidade combinada da hidroxiatrazina, um metabólito da transformação da atrazina, com o nPPS potencializou a disfunção motora, bem como causou neurodegeneração dos neurônios motores *Caenorhabditis elegans*, em comparação com a exposição individual aos contaminantes. Embora a toxicidade da atrazina e dos nanoplásticos, tanto individualmente quanto em combinação, tenha sido investigada anteriormente, nenhum estudo abordou especificamente a ecotoxicidade dessas misturas em macrófitas.

As macrófitas são essenciais para os ecossistemas como produtores primários, apoiando as redes alimentares, estabilizando os sedimentos e regulando o ciclo de nutrientes (Short et al., 2016; Cruz et al., 2024). Devido à sua importância ecológica, sua preservação é essencial, e eles também são valorizados como bioindicadores em testes de ecotoxicidade (OECD, 2006). A atrazina é altamente tóxica para estes organismos, prejudicando significativamente o crescimento das plantas (Tagun & Boxall, 2018; Klementová et al., 2019; Mendieta Herrera et al., 2023), enquanto os nPPS não apresentam toxicidade para essas plantas, mesmo em altas concentrações (van Weert et al., 2019; Pan et al., 2023; Arikan et al., 2022). Isso destaca uma lacuna crítica na compreensão de como a atrazina e os nPPS interagem em misturas e seus possíveis efeitos de longo prazo sobre as macrófitas. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a influência do nPPS na toxicidade da nATZ, em concentrações ambientalmente relevantes, ao longo de nove gerações da macrófita *Lemna minor*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SUBSTÂNCIAS TESTE

2.1.1 Nanoplástico de poliestireno (nPPS)

O nPPS foi sintetizado no Laboratório de Toxicologia Ambiental - LABTOX (Universidade Federal de Santa Catarina), via polimerização em emulsão do monômero de estireno na superfície de nanopartículas de óxido de alumínio (Al_2O_3), seguindo o método descrito por Vicentini et al. (2019). A reação foi conduzida a 70 °C por 24 horas, usando 140 mg de dodecil sulfato de sódio (SDS) como surfactante, 350 mg de persulfato de potássio (KPS) como iniciador, 70 mg de nanopartículas de Al_2O_3 e 7,7 mL de monômero de estireno. O processo resultou em uma suspensão de nPPS com uma concentração final de 70 mg mL⁻¹. Para os testes de toxicidade multigeracional com *L. minor*, a concentração nominal de 0,001 mg L⁻¹ foi testada, representando uma concentração ambientalmente relevante, estimada como comum de se encontrar, para o nPPS (Al-Sid-Cheikh et al., 2018; Lenz et al., 2016; Liu et al., 2022, 2020).

2.1.2 Atrazina nanoencapsulada (nATZ)

A nATZ foi preparada em laboratório (Universidade Estadual Paulista) usando o método apresentado anteriormente por Fessi et al. (1988), por meio da deposição interfacial de um polímero pré-formado, que envolve a mistura de uma fase orgânica com uma fase aquosa. A fase orgânica consistiu em 100 mg de polímero (PCL), 30 mL de acetona, 200 mg de óleo (triglicerídeos de ácidos capríco e caprílico - Miglyol 810), 40 mg de surfactante monoestearato de sorbitano (Span 60) e 10 mg de atrazina. A fase aquosa era composta por 30 mL de uma solução contendo 60 mg de surfactante polissorbatato 80 (Tween 80). Após a dissolução dos componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi lentamente introduzida na fase aquosa com agitação magnética. A suspensão resultante foi agitada por 10 minutos até que o solvente orgânico fosse evaporado sob pressão reduzida usando um evaporador rotativo (Fessi et al., 1988; 1989). No final do processo de síntese, uma solução de nanopartículas em suspensão foi obtida em uma concentração de 1 mg mL⁻¹ de atrazina. Para os testes de toxicidade multigeracional com *L. minor*, foram testadas concentrações crescentes de nATZ (0,005, 0,01,

0,025, 0,125, 0,425, 0,825 mg L⁻¹), considerando as concentrações de aplicação de nATZ e de atrazina convencional nas culturas, e concentrações de atrazina já encontradas no ambiente (Albuquerque et al., 2020; Takeshita et al., 2021).

2.1.3 Caracterização do nPPS e da nATZ, individual e em mistura

Soluções de nPPS (200 mg L⁻¹) e nATZ (50 mg L⁻¹), individualmente e como uma mistura, foram preparadas em água de osmose reversa (OR). Essas concentrações foram determinadas com base na literatura (Pereira et al., 2014; Gomes et al., 2019; Scognamiglio et al., 2019; Vicentini et al., 2019). As soluções foram analisadas em termos de morfologia e diâmetro médio usando microscopia eletrônica de transmissão (TEM; JEOL; microscópio JEM-1011, 80 kV). O diâmetro médio das nanopartículas de nPPS e nATZ foi analisado examinando as imagens de microscopia com o software ImageJ (v. 1.47v). A dispersão estimada de partículas e a carga superficial das soluções de nanopartículas individualmente e em mistura foram avaliadas indiretamente usando o potencial zeta (PZ; Nanobrook 90 Plus PALS). O diâmetro efetivo (DE) e o índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas foram avaliados por meio de dispersão dinâmica de luz (Nanobrook 90 Plus PALS). As análises de PZ, DE e IPD foram realizadas em água OR e meio de cultura basal Bold (BBM), meio de exposição dos testes de ecotoxicidade.

2.2 CULTIVO E TESTES DE TOXICIDADE COM *L. minor*

As macrófitas *L. minor* foram cultivadas sob condições estéreis em frascos Erlenmeyer de 250 mL preenchidos com 100 mL de BBM (pH 6,8; Bischoff & Bold, 1963). As culturas foram mantidas sob temperatura controlada (24 ± 2 °C) e luz (fotoperíodo de 12 horas e intensidade de 85 μmol fótons m⁻² s⁻¹). O meio de cultura foi renovado semanalmente.

Os testes de toxicidade com *L. minor* foram conduzidos usando como base o protocolo OECD 221 (OECD, 2006). Vinte frondes obtidas de uma cultura saudável de *L. minor* foram expostas a uma concentração fixa de nPPS (0,001 mg L⁻¹), à concentrações crescentes de nATZ (0,005; 0,01; 0,025; 0,125; 0,425; 0,825 mg L⁻¹), à mistura das concentrações crescentes de nATZ com a concentração fixa de nPPS (0,005 + 0,001; 0,01 + 0,001; 0,025 + 0,001; 0,125 + 0,001; 0,425 + 0,001; 0,825 + 0,001 mg nATZ + nPPS L⁻¹), bem como um tratamento de

controle (somente BBM). Os testes foram realizados sob as mesmas condições de temperatura e luz do cultivo, em frascos Erlenmeyers de 250 mL preenchidos com 150 mL de solução, com os respectivos tratamentos contendo os nanocontaminantes e o controle. Três réplicas, incluindo o controle, foram preparadas para cada tratamento (OECD, 2006). Após sete dias de exposição, cada uma das unidades experimentais foi fotografada de um ângulo superior, possibilitando a avaliação da taxa de crescimento (μ) das plantas em termos de número de frondes e área de superfície foliar, analisando as imagens com o software ImageJ (v. 1.47v, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD., EUA). O cálculo da taxa de crescimento foi realizado seguindo o protocolo OECD 221 (2006), conforme a equação a seguir:

$$\text{Taxa de crescimento } (\mu)(\text{dia}^{-1}) = \frac{(\ln N_t - \ln N_0)}{t_n}$$

Onde N_t é o número de frondes/área foliar ao final do experimento (7 d), N_0 é o número de frondes/área foliar inicial e t_n é o período de exposição em dias.

Além disso, ao final do teste, amostras de plantas foram separadas para análise subsequente do estresse oxidativo, incluindo espécies reativas de oxigênio (EROs), catalase (CAT), peroxidação lipídica (LPO) e pigmentos (clorofila/a - Chl/a, clorofila/b - Chl/b e carotenoides).

Os testes multigeracionais foram iniciados com *L. minor* da geração P0, após 7 dias de exposição aos contaminantes, individualmente e em mistura. Ao final desse período, foram selecionadas 20 plantas recém-formadas, com duas a três frondes e raízes curtas, para iniciar a geração seguinte. As plantas selecionadas foram cuidadosamente lavadas com meio BBM para remover resíduos dos contaminantes e, em seguida, transferidas para novas unidades experimentais contendo o mesmo tratamento da geração P0. Cada tratamento foi conduzido em três réplicas independentes, recebendo 20 plantas provenientes da geração imediatamente anterior. O processo foi repetido sucessivamente, desde a geração parental até a oitava geração, totalizando nove gerações avaliadas no experimento. A Figura 1 exemplifica a condução do experimento multigeracional com *L. minor*.

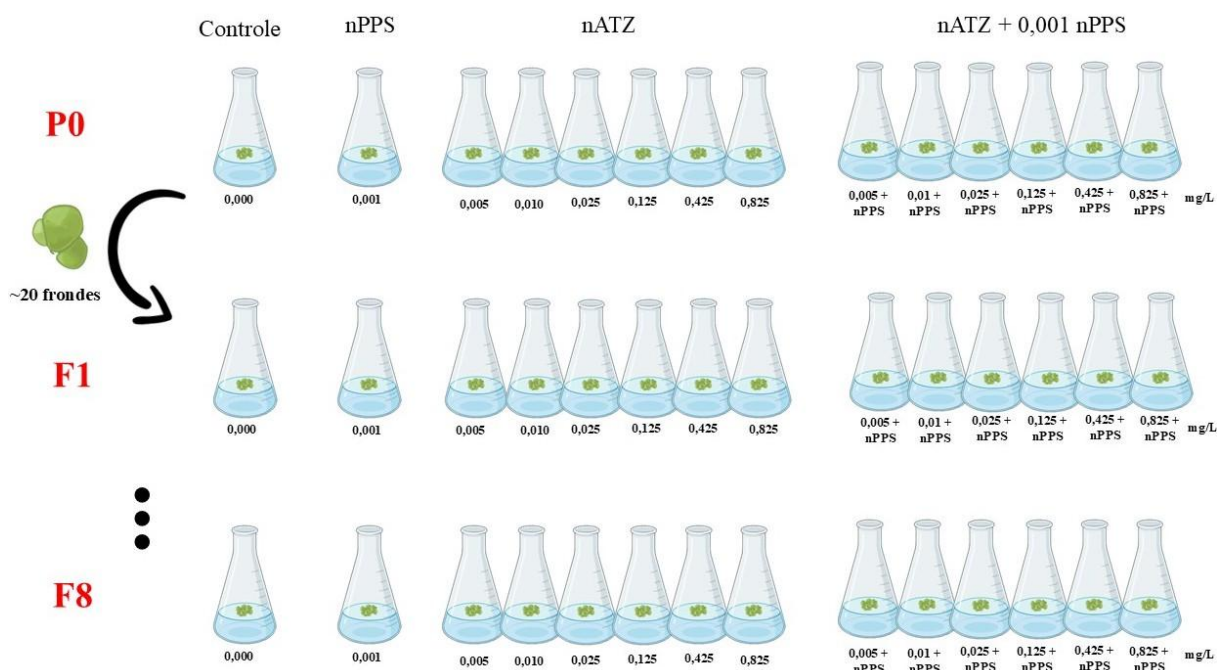


Figura 1 - Representação esquemática dos testes de exposição multigeracional (P0 – F8) de *Lemna minor* expostas ao nanoplásticos de poliestireno (nPPS), atrazina nanoencapsulada (nATZ) e à mistura nATZ + nPPS.

2.2.1 Análise de estresse oxidativo e pigmentos

Para cada geração foram separadas amostras de lemnas para as análises de EROs, CAT e LPO. Plantas do controle, do tratamento com nPPS (0,001 mg L⁻¹), dos tratamentos com a menor, intermediária e maior concentração de nATZ (0,005, 0,025; 0,425 mg L⁻¹), e nATZ na presença de nPPS (0,005 + 0,001; 0,025 + 0,001; 0,425 + 0,001 mg de nATZ + nPPS L⁻¹) foram separadas e preservadas em freezer a -80 °C ao final de cada teste, para posterior análise.

A proteína foi medida pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão. As EROs foram determinadas de acordo com a metodologia de Velikova et al. (2000), estimando os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) usando um espectrofotômetro a 390 nm. A atividade da CAT foi avaliada com base na taxa de consumo de H₂O₂, uma vez que essa enzima catalisa a decomposição de H₂O₂ em água e oxigênio. A atividade da CAT foi avaliada por espectrofotometria, medindo a diminuição da absorbância em 240 nm, com base na metodologia de Aebi (1984). A LPO foi estimada com base na quantificação de malondialdeído (MDA)/substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), usando um espectrofotômetro que mede a absorbância em 532 e 600 nm, de acordo com o método adaptado de Hodges et al. (1999) e Cruz et al. (2024). Os pigmentos foram medidos pelo método de Lichtenthaler (1987), usando acetona 80% como solução extratora. A absorbância do extrato

foi registrada nos comprimentos de onda de 663, 652, 645 e 440 nm em um espectrofotômetro. Chl/a, Chl/b e carotenoides em *L. minor* foram quantificados por grama de biomassa fresca.

2.3 ANÁLISE DOS DADOS

As análises estatísticas foram realizadas com os softwares GraphPad Prism® v6.0 (StatSoft Inc.) e Statistica® v.13.5.0.17.

Para os dados de cada teste, a normalidade e a homogeneidade das variâncias foram verificadas usando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente. As transformações logarítmicas foram usadas quando as premissas da ANOVA (unidirecional) não foram atendidas. O teste T ($p < 0,05$) foi realizado para avaliar a toxicidade do nPPS (0,001 mg L⁻¹) em comparação com o controle (apenas BBM) em cada geração, considerando a taxa de crescimento em termos de número de frondes e área de superfície foliar. Para avaliar as diferenças de toxicidade entre o nATZ individual e o nATZ combinado com nPPS (nATZ + nPPS), os tratamentos foram comparados em termos de taxa de crescimento das colônias (com base no número de frondes e na área da superfície foliar), estresse oxidativo e análise de pigmentos. Os dados de cada geração foram analisados através do teste de Tukey ($p < 0,05$).

As concentrações que causaram inibição de 50% (CE₅₀ e seu intervalo de confiança de 95%) nos parâmetros da taxa de crescimento (calculados de acordo com a OECD, 2006) foram estimadas por meio do ajuste de um modelo de regressão logística aos dados. As comparações qualitativas entre os valores de CE₅₀ para cada geração foram feitas com base nos valores de CE₅₀ e nos intervalos de confiança.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO nPPS, nATZ E nATZ + nPPS

As imagens de MET revelaram nanopartículas esféricas para nPPS e nATZ (Figura 1). O nPPS tinha um diâmetro médio de 91 ± 1 nm, enquanto o nATZ tinha um diâmetro de 90 ± 3 nm.

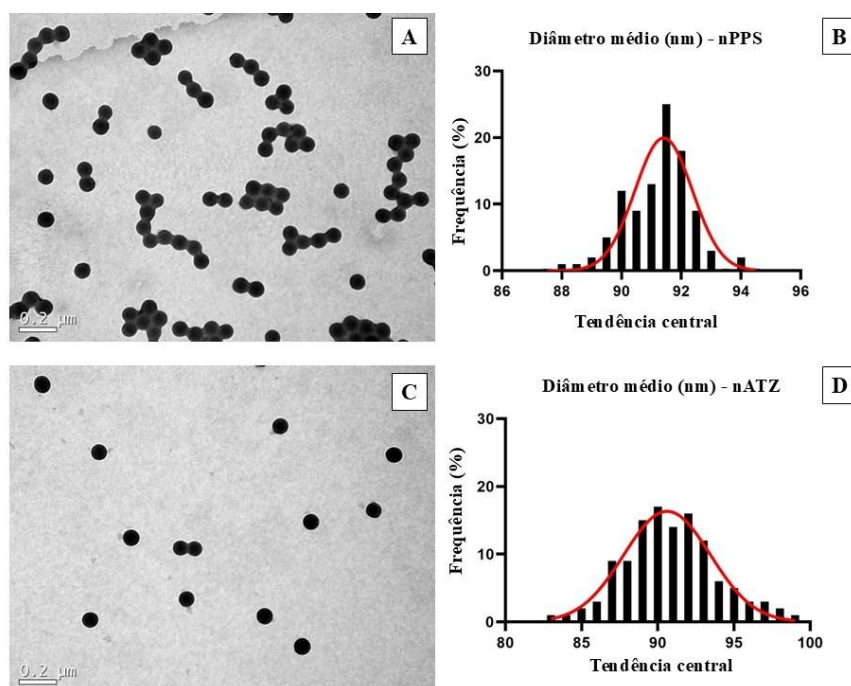


Figura 2 - (A) Imagem de microscopia de transmissão (MET) e (B) histograma da distribuição do diâmetro médio das nanopartículas de poliestireno (nPPS); (C) Imagem de MET e (D) histograma da distribuição do diâmetro médio das nanocápsulas de atrazina (nATZ).

O PZ do nPPS na água de OR e no meio de cultura BBM foi de aproximadamente -40 mV, indicando, indiretamente, que o nPPS é estável e bem disperso no meio. A nATZ apresentou um PZ maior que -30 mV em ambos os meios de exposição analisados, revelando boa estabilidade e dispersão no meio. O DE do nPPS na água de OR foi de 178,64 nm, e o do nATZ foi de 191,67 nm, que foi maior no meio de exposição BBM. O IDP de ambos os contaminantes apresentou valores iguais ou inferiores a 0,30 tanto para a água de OR quanto para o BBM, revelando que o nPPS e a nATZ são monodispersos em ambos os meios de exposição (Tabela 1).

Tabela 1 - Valor médio ($\pm$ desvio padrão) de potencial zeta (PZ), diâmetro efetivo (DE) e índice de polidispersão (IPD) para o nanoplástico de poliestireno (nPPS), atrazina nanoencapsulada (nATZ) e para a mistura de nPPS + nATZ ($200 \text{ mg L}^{-1} + 50 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente). As análises foram conduzidas em água de osmose reversa (OR) e em meio de cultivo basal de Bold (BBM).

Composto	Meio de exposição	PZ (mV)	DE (nm)	IPD
nPPS	OR	$-44,80 \pm 0,98$	$178,64 \pm 6,74$	$0,30 \pm 0,01$
	BBM	$-40,00 \pm 2,01$	$192,23 \pm 2,23$	$0,27 \pm 0,03$
nATZ	OR	$-35,20 \pm 1,29$	$191,67 \pm 4,50$	$0,25 \pm 0,01$
	BBM	$-31,35 \pm 1,13$	$201,75 \pm 3,93$	$0,28 \pm 0,01$
nPPS + nATZ	OR	$-31,31 \pm 0,56$	$226,52 \pm 5,66$	$0,25 \pm 0,00$
	BBM	$-27,85 \pm 0,57$	$238,51 \pm 5,04$	$0,22 \pm 0,00$

O PZ da mistura foi de cerca de -31 mV para OR, indicando boa estabilidade, enquanto a mistura no meio BBM e o PZ foi de cerca de -27 mV , revelando estabilidade satisfatória. O DE das nanopartículas na mistura foi de $226,52 \text{ nm}$ em OR e foi sensivelmente maior em BBM. O IPD apresentou valores de $0,25$ e $0,22$ para OR e BBM, respectivamente, demonstrando que as nanopartículas são monodispersas nos respectivos meios de exposição (Tabela 1).

3.2 TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA MULTIGERACIONAL COM *L. minor*

O nPPS não causou redução na taxa de crescimento do tamanho da colônia, em termos de número de frondes e área de superfície foliar, e em nenhuma das gerações avaliadas houve diferença estatística entre o tratamento fixo de nPPS ($0,001 \text{ mg L}^{-1}$) e o controle (teste T, $p > 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2 - Número médio (média $\pm$ desvio padrão; $n = 3$) de taxa de crescimento (dia^{-1}) em termos de número de frondes e área foliar superficial de *Lemna minor* encontradas nos tratamentos controle (somente meio BBM) e da concentração fixa ($0,001 \text{ mg L}^{-1}$) de nanoplástico de poliestireno (nPPS). Diferenças significativas entre as taxas de crescimento do nPPS e do controle não foram observadas em nenhuma das gerações testadas (Teste T; $p < 0,05$).

Parâmetro (taxa de crescimento – dia^{-1})	Tratamento	Gerações de <i>Lemna minor</i>								
		F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Número de frondes	Controle	$0,30 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,00$	$0,30 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,00$	$0,32 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$
	nPPS	$0,31 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,00$	$0,32 \pm 0,00$	$0,31 \pm 0,00$	$0,31 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,00$	$0,31 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$
Área foliar superficial	Controle	$0,26 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,02$
	nPPS	$0,28 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,00$

Os efeitos da nATZ e da combinação de nATZ + nPPS revelaram que o aumento das concentrações levou a uma redução progressiva nas taxas de crescimento das colônias (Figura 3). Esse declínio foi evidente no número de frondes e na área da superfície foliar (Figura 4 e Figura 5). Nas concentrações mais altas foi verificada a morte das colônias de *L. minor*, com efeito observado a partir da geração F4 e persistindo até a geração F8.

		Taxa de crescimento do número de frondes (%)								Taxa de crescimento da área de superfície (%)									
		C0	nPPS	0,005	0,01	0,025	0,13	0,425	0,825	C0	nPPS	0,005	0,01	0,025	0,13	0,425	0,825		
nATZ	P0	96,5	101,8	96,8	93,5	96,6	79,0	36,2	24,6	89,9	97,5	87,4	90,1	80,8	59,9	46,1	0,5	≤ 0% 0.1-20 % 21-40 % 41-60 % 61-80 % > 81 %	
	F1	94,9	97,3	96,2	93,2	90,1	76,0	31,8	2,2	93,9	96,6	93,0	94,1	92,8	84,7	26,1	5,7		
	F2	98,4	99,9	96,4	90,6	91,6	68,9	22,0	-13,9	97,7	94,5	92,8	81,4	83,5	71,6	11,0	-23,6		
	F3	97,2	99,5	96,8	96,7	93,1	76,5	6,1	-36,3	99,8	96,8	95,1	92,2	90,3	79,2	-18,4	-119,8		
	F4	97,2	96,1	96,4	93,5	92,7	69,7	-67,9	0,0*	95,4	92,0	94,5	93,4	92,9	72,7	-0,9	0,0*		
	F5	99,4	97,3	99,4	96,0	92,7	77,7	0,0*	0,0*	98,0	93,3	96,1	90,6	88,6	76,8	0,0*	0,0*		
	F6	97,2	95,8	96,1	94,1	91,8	75,2	0,0*	0,0*	97,7	98,4	94,7	95,8	90,5	80,6	0,0*	0,0*		
	F7	97,6	95,8	97,0	96,7	90,7	73,0	0,0*	0,0*	96,0	96,7	98,7	94,3	88,4	73,2	0,0*	0,0*		
F8	97,6	93,2	97,4	99,9	95,5	72,7	0,0*	0,0*	94,0	89,6	94,3	91,2	91,2	71,1	0,0*	0,0*			
nATZ + nPPS	P0	96,5	101,8	98,1	100,4	100,3	78,8	36,7	23,5	89,9	97,5	89,2	90,6	87,0	55,2	46,7	21,9		
	F1	94,9	97,3	95,8	96,5	89,6	69,1	31,1	9,8	93,9	96,6	96,5	100,3	89,3	71,7	22,8	4,7		
	F2	98,4	99,9	98,3	95,0	95,4	64,5	15,2	-3,5	97,7	94,5	95,1	100,8	94,4	65,1	-2,5	-29,2		
	F3	97,2	99,5	99,6	97,3	96,4	69,8	-0,3	-37,4	99,8	96,8	103,4	110,0	104,3	48,4	-12,1	-62,4		
	F4	97,2	96,1	96,3	94,4	92,7	74,1	6,5	0,0*	95,4	92,0	94,9	92,6	89,9	75,8	-16,7	0,0*		
	F5	99,4	97,3	98,9	97,5	94,2	81,8	0,0*	0,0*	98,0	93,3	97,0	95,2	93,9	81,1	0,0*	0,0*		
	F6	97,2	95,8	95,8	95,9	94,2	75,8	0,0*	0,0*	97,7	98,4	92,2	93,5	92,0	77,3	0,0*	0,0*		
	F7	97,6	95,8	93,8	97,1	92,4	71,0	0,0*	0,0*	96,0	96,7	89,8	94,5	91,4	72,4	0,0*	0,0*		
F8	97,6	93,2	96,7	96,6	96,9	73,6	0,0*	0,0*	94,0	89,6	91,4	91,1	92,8	68,0	0,0*	0,0*			
		C0	nPPS	0,005	0,01	0,025	0,125	0,425	0,825	C0	nPPS	0,005	0,01	0,025	0,125	0,425	0,825		
				+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+		
				nPPS	nPPS	nPPS	nPPS	nPPS	nPPS			nPPS	nPPS	nPPS	nPPS	nPPS	nPPS		

Figura 3 - Taxa média de crescimento de *Lemna minor* em termos do número de frondes e da área foliar superficial (%; n = 3) ao longo da geração parental (P0) até a oitava geração filial (F1 - F8), gerada após 7 dias de exposição a concentrações crescentes de atrazina nanoencapsulada (nATZ) e atrazina nanoencapsulada na presença de 0,001 mg L⁻¹ de nanoplástico de poliestireno (nATZ + nPPS). As cores indicam gradualmente a taxa de crescimento, em que o verde escuro representa os valores mais favoráveis da taxa de crescimento (> 81%) e o vermelho escuro representa os valores mais críticos da taxa de crescimento (≤ 0%). Os asteriscos (*) representam que a taxa de crescimento não pôde ser estimada devido à morte total de *Lemna minor* exposta.

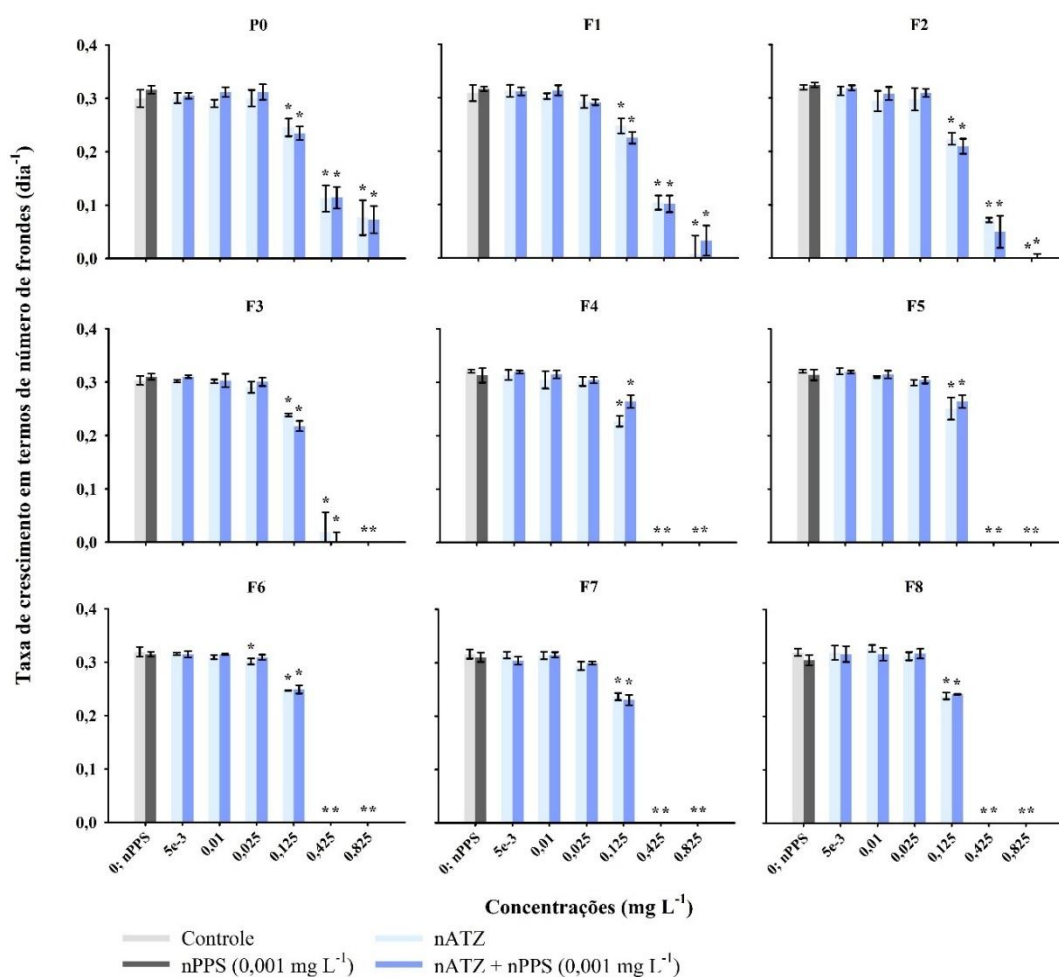


Figura 4 - Taxa média de crescimento (barras $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) do número de frondes de *Lemna minor* ao longo da geração parental (P0) até a oitava geração filial (F1 - F8), gerada após 7 dias de exposição a concentrações crescentes de atrazina nanoencapsulada (nATZ) e atrazina nanoencapsulada na presença de 0,001 mg L⁻¹ de nanoplástico de poliestireno (nATZ + nPPS). Os asteriscos (*) representam uma redução significativa na taxa de crescimento em comparação com o respectivo controle (teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

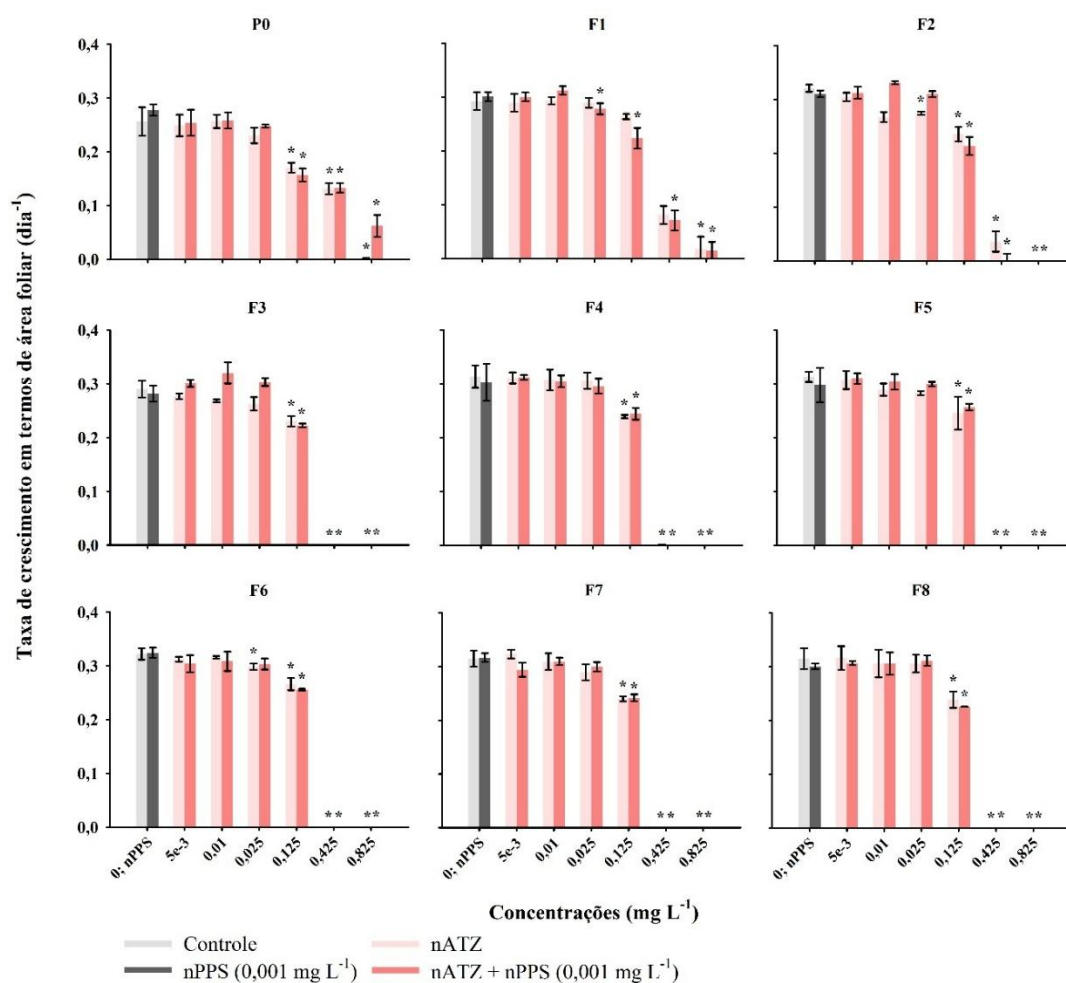


Figura 5 - Taxa média de crescimento (barras ± desvio padrão, n = 3) da área foliar superficial de *Lemna minor* ao longo da geração parental (P0) até a oitava geração filial (F1 - F8), gerada após 7 dias de exposição a concentrações crescentes de atrazina nanoencapsulada (nATZ) e atrazina nanoencapsulada na presença de 0,001 mg L⁻¹ de nanoplástico de poliestireno (nATZ + nPPS). Os asteriscos (*) representam uma redução significativa na taxa de crescimento em comparação com o respectivo controle (teste de Tukey, p ≤ 0,05).

Os valores de CE₅₀ para a taxa de crescimento das colônias diminuíram progressivamente ao longo das gerações avaliadas tanto para a nATZ quanto para a mistura nATZ + nPPS, considerando o número de frondes e a área de superfície foliar. A toxicidade, representada pelos valores de CE₅₀, apresentou estabilização a partir da geração F4 até a F8 (Figura 6; Tabela 3).

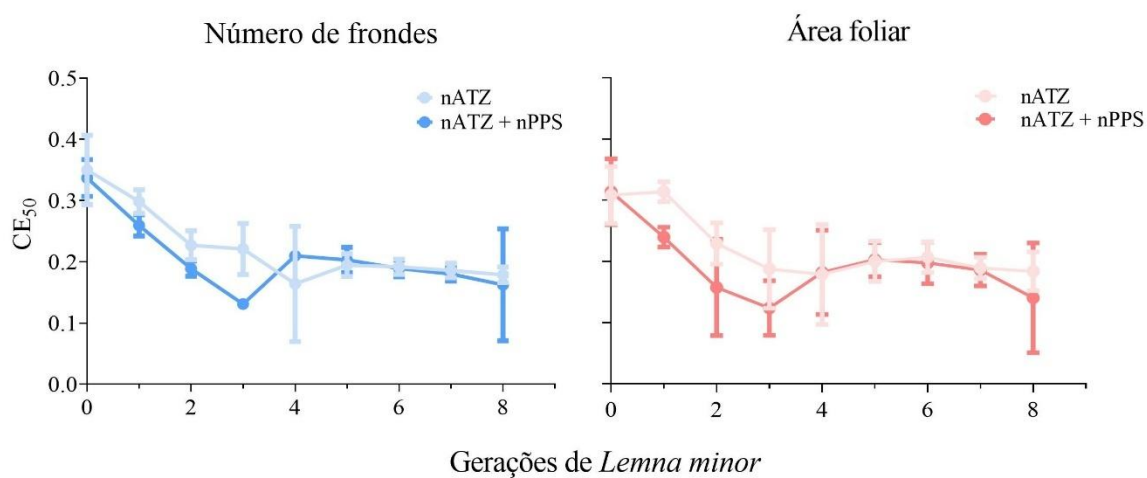


Figura 6 - Síntese dos valores de concentração de efeito para 50% dos organismos expostos ($CE_{50} \pm$ erro padrão) estimados para as taxas de crescimento em termos de número de frondes e área de superfície foliar dos testes de toxicidade ao longo da geração parental (P0) até a oitava geração (F8) de *Lemna minor* exposta à atrazina nanoencapsulada (nATZ) e à atrazina nanoencapsulada na presença de 0,001 mg L⁻¹ de nanoplásticos de poliestireno (nATZ + nPPS).

Tabela 3 - Concentração de efeito não observado (CENO), Concentração de efeito observado (CEO) e Concentração de efeito para 50% dos organismos expostos ($CE_{50} \pm$ desvio padrão; $n = 3$) para as taxas de crescimento em termos de número de frondes e área foliar dos testes de toxicidade ao longo da geração parental (P0) até a oitava geração (F8) de *Lemna minor* exposta à atrazina nanoencapsulada (nATZ) e à atrazina nanoencapsulada na presença de 0,001 mg L⁻¹ de nanoplasticos de poliestireno (nATZ + nPPS).

Geração	Parâmetro	Número de Frondes		Área foliar	
		nATZ	nATZ + nPPS	nATZ	nATZ + nPPS
P0	CENO	0,025	0,025	0,025	0,025
	CEO	0,125	0,125	0,125	0,125
	CE_{50}	0,35 (0,27 – 0,42)	0,34 (0,27 – 0,40)	0,32 (0,21 – 0,41)	0,31 (0,20 – 0,43)
F1	CENO	0,025	0,025	0,125	0,025
	CEO	0,125	0,125	0,425	0,125
	CE_{50}	0,29 (0,26 – 0,34)	0,25 (0,22 – 0,30)	0,31 (0,28 – 0,35)	0,24 (0,20 – 0,27)
F2	CENO	0,025	0,025	0,005	0,025
	CEO	0,125	0,125	0,01	0,125
	CE_{50}	0,23 (0,17 – 0,28)	0,19 (0,16 – 0,21)	0,23 (0,16 – 0,30)	0,16 (-) ^a
F3	CENO	0,025	0,025	0,025	0,025
	CEO	0,125	0,125	0,125	0,125
	CE_{50}	0,22 (0,13 – 0,31)	0,13 (0,12 – 0,14)	0,19 (-) ^a	0,13 (-) ^a
F4	CENO	0,125	0,025	0,025	0,025
	CEO	0,425	0,125	0,125	0,125
	CE_{50}	0,16 (-)	0,21 (0,19 – 0,23)	0,18 (0,00 – 0,35)	0,18 (-) ^a
F5	CENO	0,025	0,01	0,025	0,025
	CEO	0,125	0,025	0,125	0,125
	CE_{50}	0,19 (0,15 – 0,23)	0,20 (0,16 – 0,25)	0,20 (0,13 – 0,27)	0,20 (0,14 – 0,26)
F6	CENO	0,01	0,025	0,025	0,025
	CEO	0,025	0,125	0,125	0,125
	CE_{50}	0,19 (0,15 – 0,23)	0,19 (0,16 – 0,22)	0,21 (0,15 – 0,26)	0,20 (0,13 – 0,27)
F7	CENO	0,01	0,025	0,025	0,025
	CEO	0,025	0,125	0,125	0,125
	CE_{50}	0,19 (0,16 – 0,21)	0,18 (0,16 – 0,20)	0,19 (0,15 – 0,23)	0,19 (0,13 – 0,24)
F8	CENO	0,025	0,025	0,025	0,025
	CEO	0,125	0,125	0,125	0,125
	CE_{50}	0,18 (0,15 – 0,20)	0,16 (-) ^a	0,18 (0,12 – 0,25)	0,14 (-) ^a

^a – Limites de confiança (95%) não puderam ser estimados.

3.3 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO

A análise de EROs revelou que as lemnas expostas aos tratamentos de controle e nPPS apresentaram níveis semelhantes de H_2O_2 entre as gerações (Figura 7). Foi observado um menor acúmulo de H_2O_2 para a concentração de $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ de nATZ nas gerações F2 e F3, em comparação com o controle. Efeitos mais drásticos da nATZ no acúmulo de H_2O_2 foram identificados em uma concentração de $0,425 \text{ mg L}^{-1}$, entre as gerações F0 e F2. Os dados dos efeitos da nATZ na presença de nPPS revelaram um menor acúmulo de H_2O_2 para a concentração de $0,025 + 0,001 \text{ mg de nATZ + nPPS L}^{-1}$ em comparação com o controle entre as gerações F1 e F2. Os maiores acúmulos de H_2O_2 foram observados para $0,425 + 0,001 \text{ mg de nATZ + nPPS L}^{-1}$ entre as gerações P0 e F3. Diferenças estatísticas entre os efeitos de nATZ e nATZ + nPPS puderam ser observadas para os tratamentos de maior concentração testados em F1 e F3, indicando uma provável maior toxicidade de nATZ + nPPS na geração de EROs.

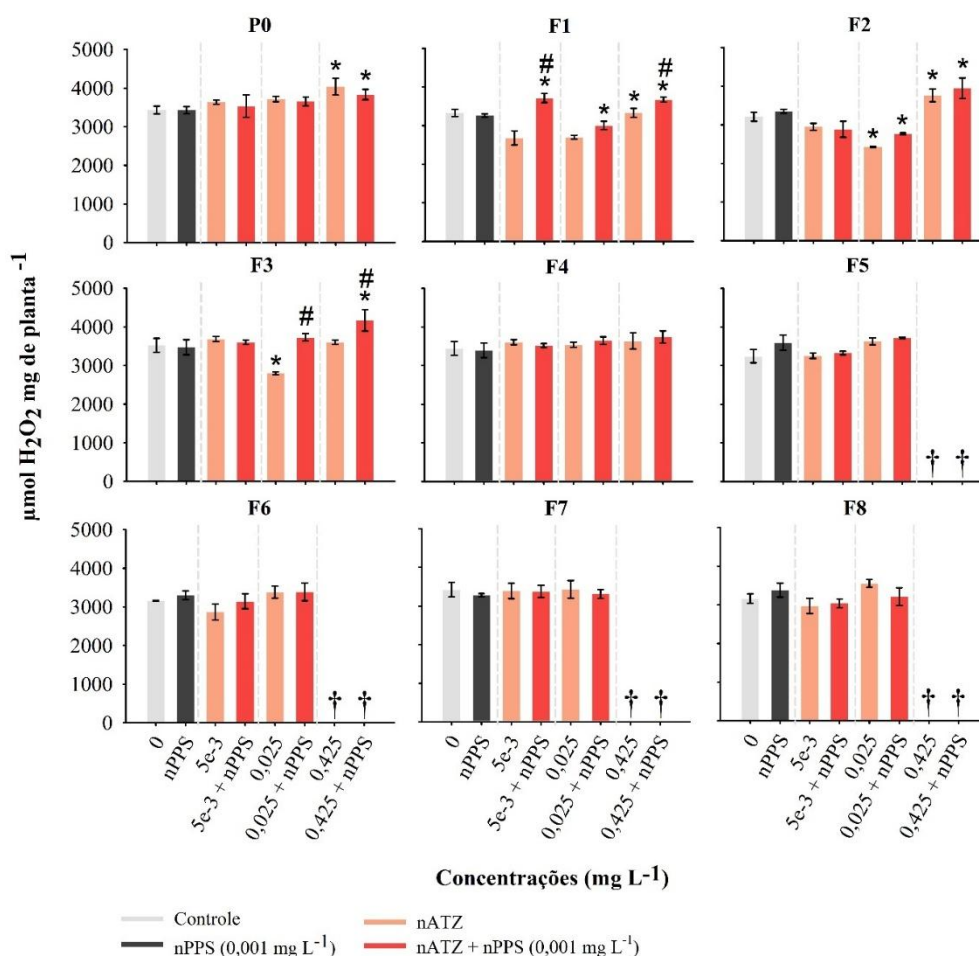


Figura 7 - Concentração média em μmol de H_2O_2 (barras $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) por mg de *Lemna minor* ao longo da geração parental (P0) até a oitava geração (F8), após 7 dias de exposição a

concentrações de atrazina nanoencapsulada (nATZ) e atrazina nanoencapsulada na presença de 0,001 mg L⁻¹ de nanoplasticos de poliestireno (nATZ + nPPS). O asterisco (*) representa a diferença na concentração de H₂O₂ dos tratamentos em comparação com o respectivo controle; cerquilha (#) representa a diferença na concentração de H₂O₂ entre o tratamento com nATZ e o respectivo tratamento com nATZ + nPPS (teste de Tukey, $p \leq 0,05$); o punhal (†) indica que não foi possível medir H₂O₂ para os respectivos tratamentos.

Os dados obtidos para a análise da CAT indicaram que a atividade da enzima nos tratamentos de controle e nPPS não diferiu estatisticamente para nenhuma das gerações de lemnas expostas (Figura 8). Para as gerações P0 e F1, a atividade da CAT de todos os tratamentos com nATZ avaliados foi estatisticamente diferente do controle. Entretanto, as concentrações de 0,005 e 0,025 mg L⁻¹ resultaram em menor acúmulo de H₂O₂, o que, em contraste, não foi verificado para a concentração de 0,425 mg L⁻¹ de nATZ. Efeitos significativos da nATZ na presença de nPPS na atividade da CAT foram observados para 0,005 + 0,001 mg de nATZ + nPPS L⁻¹ em F1 e para 0,425 + 0,001 mg de nATZ + nPPS L⁻¹ para as lemnas das gerações P0 a F3 e em F6.

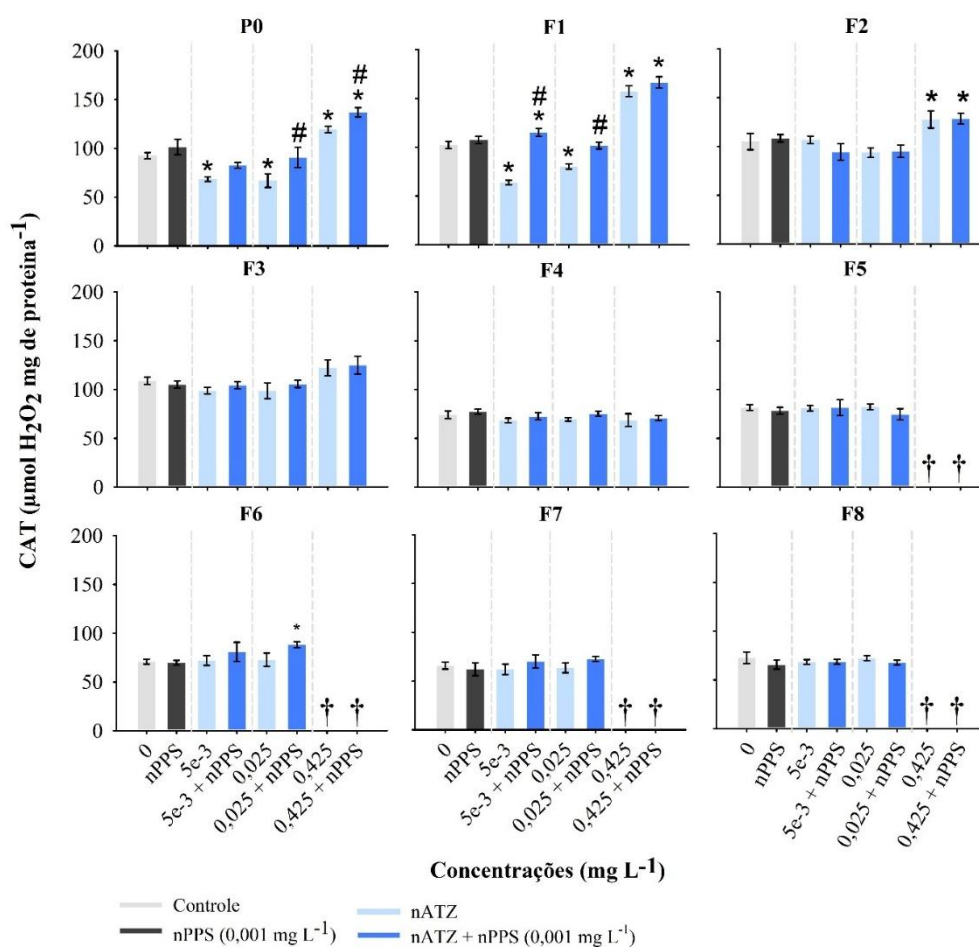


Figura 8 - Concentração média de H₂O₂ (μmol por mg de proteína de *Lemna minor*, barras ± desvio padrão, n = 3) ao longo da geração parental (P0) até a oitava geração (F8), após 7 dias de exposição a

concentrações de atrazina nanoencapsulada (nATZ) e atrazina nanoencapsulada na presença de 0,001 mg L⁻¹ de nanoplásticos de poliestireno (nATZ + nPPS). O asterisco (*) representa a diferença na concentração de H₂O₂ dos tratamentos em comparação com o respectivo controle; cerquilha (#) representa a diferença na concentração de H₂O₂ entre o tratamento com nATZ e o respectivo tratamento com nATZ + nPPS (teste de Tukey, $p \leq 0,05$); o punhal (†) indica que não foi possível medir H₂O₂ para os respectivos tratamentos.

A análise de LPO revelou que os níveis de MDA não diferiram entre os tratamentos, mesmo em comparação com os tratamentos controle e com a concentração fixa de nPPS (Figura 9). Os níveis de MDA também não variaram entre as gerações de lemnas expostas, indicando que não houve efeito de LPO.

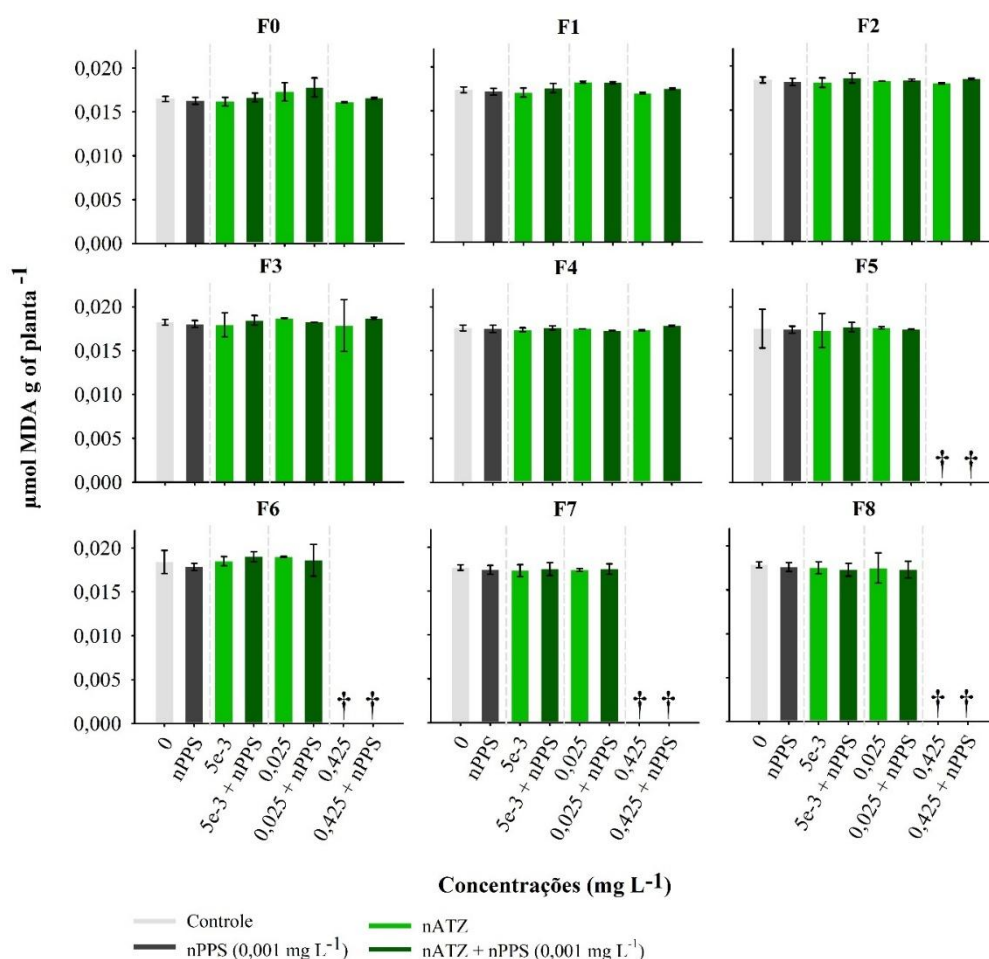


Figura 9 - Concentração média em μmol de Malondialdeído (MDA) (μmol por mg de *Lemna minor*; barras $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) ao longo da geração parental (P0) até a oitava geração (F8), após 7 dias de exposição a concentrações de atrazina nanoencapsulada (nATZ) e atrazina nanoencapsulada na presença de 0,001 mg L⁻¹ de nanoplásticos de poliestireno (nATZ + nPPS). A ausência de asterisco (*) indica que não há diferença significativa na concentração de MDA dos tratamentos em comparação com o respectivo controle (teste de Tukey, $p \leq 0,05$); a ausência de cerquilha (#) indica que não há diferença na concentração de MDA entre o tratamento com nATZ e o respectivo tratamento com nATZ + nPPS

(teste de Tukey, $p \leq 0,05$); o punhal (†) indica que não foi possível medir a MDA para os respectivos tratamentos.

Com relação à análise de pigmentos, não foi possível verificar um efeito claro da nATZ em comparação com a nATZ + nPPS em *L. minor* (Figura 10). No entanto, foi observado um impacto na redução de Chl/a para a exposição à nATZ e à nATZ + nPPS, ainda na geração parental e que persistiu até a exposição da última geração filial (F8) de *L. minor*. No caso de Chl/b e carotenoides, os efeitos da redução desses pigmentos foram observados em gerações mais avançadas de lemnas, da geração F4 até a F8.

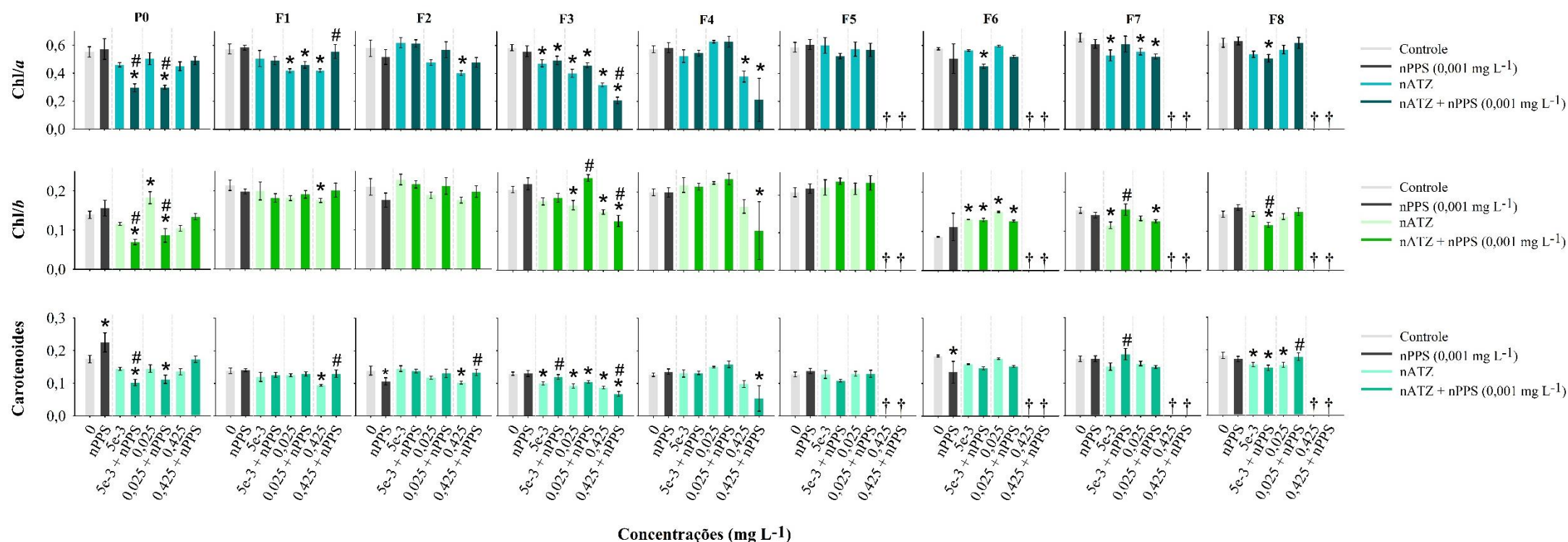


Figura 10 - Concentração média de pigmentos (mg por g de peso fresco de *Lemna minor*, clorofila - Chl/a, clorofila/a - Chl/a, clorofila/b - Chl/b e carotenoides; barras $\pm$ desvio padrão, n = 3) ao longo da geração parental (P0) até a oitava geração filial (F8), após 7 dias de exposição a concentrações de atrazina nanoencapsulada (nATZ) e atrazina nanoencapsulada na presença de 0,001 mg L⁻¹ de nanoplásticos de poliestireno (nATZ + nPPS). O asterisco (*) representa a diferença no pigmento dos tratamentos em comparação com o respectivo controle; a cerquilha (#) representa a diferença nos pigmentos entre o tratamento com nATZ e o respectivo tratamento com nATZ + nPPS (teste de Tukey, $p \leq 0,05$); o punhal (†) indica que não foi possível medir o pigmento para os respectivos tratamentos.

4 DISCUSSÃO

Tanto o nATZ quanto o nPPS, individualmente ou combinados, apresentaram boa estabilidade relativa no meio de exposição, com base nos valores de PZ (Tabela 1). No entanto, a mistura nATZ + nPPS exibiu uma leve diminuição no valor absoluto de PZ e um aumento no DE, indicando uma possível interação entre os nanocontaminantes, particularmente no meio BBM. Esse comportamento pode estar relacionado à composição complexa do BBM, que inclui múltiplos componentes dissolvidos que podem influenciar o comportamento das nanopartículas em suspensão (OECD, 2006). Efeitos semelhantes foram observados por Bandeira et al. (2025), que verificaram que o nPPS atuou como carreador de clotianidina em sistemas mistos, aumentando o DE dos nanocompostos quando em mistura. A estabilidade das nanopartículas depende das propriedades físico-químicas, das características do meio e de forças como as interações de van der Waals e eletrostáticas, bem como das forças intermoleculares e da dureza do meio (Baun et al., 2017; Lee et al., 2016).

Os dados de toxicidade indicaram que a concentração ambiental de 0,001 mg nPPS L⁻¹ não inibiu o crescimento de colônias de *L. minor* (Tabela 1) e não causou danos por estresse oxidativo, expressos pela geração de EROs, inibição da atividade de CAT, LPO e redução na expressão de pigmentos (Figuras 7, 8, 9 e 10) em nenhuma das gerações expostas ao contaminante. Concentrações de nPPS (com diâmetro médio < 200 nm) entre 7x10⁻⁶ e 0,005 mg L⁻¹ já foram encontradas em águas superficiais de diferentes regiões do mundo (Materić et al., 2021a, 2021b; Xu et al., 2022). Apesar de recorrentes, essas concentrações ambientalmente relevantes de nPPS são muito baixas e não representam alta toxicidade. Em concordância com estes resultados, Bandeira et al. (2025) relataram que nPPS só afetaram o crescimento de colônias de *L. minor* em uma alta concentração de 1000 mg L⁻¹. De forma semelhante, efeitos tóxicos em outras espécies de macrófitas foram observados em concentrações como 3% kg⁻¹ em sedimentos (van Weert et al., 2019), 0,5 mg L⁻¹ (Pan et al., 2023) e 100 mg L⁻¹ (Arikan et al., 2022), o que corrobora os resultados deste estudo. Além disso, a baixa toxicidade de nPPS em concentrações ambientalmente relevantes também foi documentada para diversos organismos aquáticos, incluindo microcrustáceos (Liu et al., 2020) e moluscos (Varó et al., 2019).

No caso da exposição de *L. minor* à nATZ e à combinação nATZ + nPPS, foi observado um aumento na toxicidade, evidenciado pela diminuição dos valores de CE₅₀ até a geração F4 (Figuras 3, 4, 5 e 6; Tabela 2), revelando um possível aumento da toxicidade com o avanço das

gerações da planta, especialmente entre P0 e F3. Esse efeito tóxico pode estar relacionado à inibição da atividade fotossintética da planta quando exposta à nATZ. A atrazina pode interferir no sistema de transporte de elétrons da fotossíntese, inibindo a atividade fotossintética devido à sua capacidade de se ligar à proteína D1 do fotossistema II (PSII) das plantas (Zhu et al., 2009). Isso resulta em uma alteração bioquímica que reduz a produção de ATP e NADPH, compostos essenciais para a síntese de carboidratos e outros compostos, afetando diretamente o crescimento e o desenvolvimento vegetal (Zhu et al., 2009). No presente estudo, esses efeitos foram transferidos e potencializados para as gerações subsequentes, revelando um aumento da toxicidade da nATZ em nível multigeracional, causando mortalidade nas maiores concentrações testadas a partir da geração F5 de *L. minor*.

Os valores de CE_{50} para a nATZ variaram de 0,18 a 0,31 mg L⁻¹ em termos de taxa de crescimento, com base no número de frondes e na área foliar, considerando todas as gerações testadas (Tabela 2). Para a mistura nATZ + nPPS, os valores de CE_{50} variaram de 0,13 a 0,40 + 0,001 mg nATZ + nPPS L⁻¹, muito próximos aos resultados obtidos apenas para a nATZ, indicando que, possivelmente, os efeitos observados para a mistura foram predominantemente causados pela nATZ. Dados de toxicidade para a nATZ sobre macrófitas ainda não foram encontrados na literatura, mas para a atrazina livre, foi visto que as concentrações entre 0,12–0,30 mg L⁻¹ inibiram o crescimento de colônias de *L. minor* (Tagun e Boxall, 2018; Klementová et al., 2019; Mendieta Herrera et al., 2023; Cruz et al., 2024). É possível que a atrazina tenha sido liberada da nanocápsula para o meio aquoso, resultando em efeitos de exposição semelhantes aos da atrazina livre.

Os resultados da análise de estresse oxidativo em *L. minor* exposta à nATZ e à mistura nATZ + nPPS mostraram um aumento na produção de EROs nas concentrações mais elevadas testadas, especialmente entre as gerações P0 e F3 (Figura 7). Esse aumento foi evidenciado pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), uma das principais EROs associadas ao estresse oxidativo. Em plantas, o H₂O₂ pode inibir o desenvolvimento dos cloroplastos e oxidar componentes da membrana plasmática, comprometendo funções celulares vitais ao crescimento vegetal (Foyer & Hanke, 2022). Esses efeitos foram acompanhados pela inibição da atividade da enzima CAT nas gerações P0 a F2, também nas concentrações mais altas de nATZ e da mistura nATZ + nPPS (Figura 8). Como a CAT é responsável por decompor o H₂O₂ em água (H₂O) e oxigênio (O₂), sua inibição favorece o acúmulo do peróxido e, conseqüentemente, o aumento do estresse oxidativo, potencializando os danos celulares (Baker et al., 2023). Por outro lado, em concentrações mais baixas de nATZ (0,005 e 0,025 mg L⁻¹), observou-se um

aumento significativo da atividade da CAT nas gerações P0 e F1, com redução nos níveis de H_2O_2 em relação ao controle. Esse resultado sugere a ativação de um mecanismo de defesa antioxidante por parte da planta, com o objetivo de eliminar o excesso de H_2O_2 quando exposta a níveis subletais do contaminante (Baker et al., 2023).

Embora tenha sido observado acúmulo de H_2O_2 até as gerações F2 - F3, em função do aumento de EROs e da inibição da atividade da enzima CAT, *L. minor* não apresentou danos de LPO da membrana plasmática em nenhuma das concentrações testadas de nATZ ou da mistura nATZ + nPPS, em nenhuma geração avaliada (Figura 9). Esse resultado sugere que outros sistemas antioxidantes celulares possam ter compensado a redução da atividade da CAT. Um exemplo é a enzima ascorbato peroxidase (APx), que também atua na degradação do H_2O_2 . Caso esses mecanismos alternativos estejam ativos e funcionando de forma eficiente, é possível que evitem a formação de LPO mesmo na presença de altos níveis de peróxido de hidrogênio (Palma et al., 2020). Contudo, essa hipótese deve ser interpretada com cautela, uma vez que a atividade da APx não foi avaliada neste estudo.

Nas análises de pigmentos, observou-se uma redução gradual dos níveis de Chl/a com o aumento das concentrações de nATZ e nATZ + nPPS, sendo esse efeito já evidente na geração parental e persistindo até a geração F8 (Figura 10). Para Chl/b e carotenoides, a redução dos pigmentos tornou-se evidente a partir da geração F4, independentemente do tratamento. Durante a fotossíntese, Chl/a, Chl/b e os carotenoides absorvem luz por meio das proteínas do complexo coletor de luz (LHC) presentes nas membranas dos tilacoides dos cloroplastos (Xu et al., 2013). Como já mencionado anteriormente, atrazina atua diretamente no PSII dos cloroplastos, bloqueando os canais de transporte de elétrons, que precede do acúmulo de EROs e pela baixa atividade de enzimas antioxidantes, interrompendo as reações da fase luminosa da fotossíntese. Isso reduz o conteúdo de clorofilas (Chl/a e Chl/b) e de carotenoides (Zhu et al., 2009).

A redução na taxa de crescimento de *L. minor* observada nas exposições à nATZ e à mistura nATZ + nPPS pode estar associada ao aumento dos níveis de estresse oxidativo nas gerações iniciais (P0 - F3). O acúmulo de EROs, evidenciado pelo aumento de H_2O_2 e pela inibição da atividade da enzima CAT, indica um desequilíbrio no sistema antioxidante da planta, resultando em maior dano celular e prejuízo metabólico. Esse estresse oxidativo pode ter comprometido processos fotossintéticos essenciais, refletindo na redução da produção de energia (ATP e NADPH, por exemplo) e, conseqüentemente, na diminuição do crescimento e da área foliar. Embora *L. minor* tenha demonstrado mecanismos compensatórios, como o

aumento da atividade da CAT em concentrações subletais, esses mecanismos podem ter sido insuficientes para prevenir a perda de pigmentos e o declínio no desempenho fotossintético ao longo das gerações, sugerindo que o estresse oxidativo induzido pela nATZ é um dos principais fatores limitantes do crescimento multigeracional da espécie.

Os efeitos de estresse oxidativo causado por nATZ em macrófitas são escassos na literatura. Estudos conduzidos com algas e plantas terrestres indicam que a nATZ não apenas danifica o PSII (Oliveira et al., 2015; Scognamiglio et al., 2019; Preisler et al., 2020; Wu et al., 2021), mas também induz a LPO (Oliveira et al., 2015; Wu et al., 2021) e gera EROs, comprometendo a fotossíntese, o crescimento e o desenvolvimento destes organismos (Hennig et al., 2023). Cruz et al. (2024) avaliaram a toxicidade da atrazina livre (0,018–0,4 mg L⁻¹) em duas espécies de macrófitas. Os resultados mostraram que não houve efeitos significativos na LPO, nos níveis de peróxido de hidrogênio, na atividade das enzimas CAT e APx, e no conteúdo de pigmentos sobre *L. minor*, sendo observada redução na atividade da CAT apenas sobre *Spirodela polyrhiza* na maior concentração testada. Em contraste, Benghaffour et al. (2023) encontraram que a atrazina livre em concentrações a partir de 0,001 mg L⁻¹ pode gerar EROs em *L. minor*, enquanto no presente estudo esse efeito foi observado somente na concentração de 0,425 mg L⁻¹ de nATZ e nATZ + nPPS.

Wang et al. (2016) demonstraram que altas concentrações de atrazina, na ordem de 2 e 40 mg L⁻¹, aumentaram os níveis de MDA (Song et al., 2012) em plantas das espécies *Acorus calamus*, *Lythrum salicaria* e *Scirpus tabernaemontani*. Contudo, em concentrações substancialmente menores, no presente estudo não foram detectados efeitos significativos no acúmulo de MDA para *L. minor* (Figura 9). Quanto aos pigmentos, estudos anteriores relataram que a atrazina livre reduz o conteúdo de pigmentos e a capacidade de absorção de luz em plantas aquáticas, incluindo *L. minor* (Teodorović et al., 2012; Fekete-Kertész et al., 2015; Wang et al., 2016). Esses resultados estão em concordância com os resultados do presente estudo para nATZ e nATZ + nPPS, reforçando o mecanismo de ação da atrazina e sugerindo que seus efeitos podem persistir ao longo de gerações.

Quanto à influência do nPPS na toxicidade da nATZ em termos de estresse oxidativo, a presença de nPPS não exerceu influência significativa. Embora a mistura dos dois nanocontaminantes tenha apresentado um leve aumento no DE em comparação com as nanoformulações individuais (Tabela 1), sugerindo possíveis interações, essas não alteraram consistentemente o perfil toxicológico da nATZ. Entretanto, em casos específicos, especialmente nas gerações F1 e F3, a geração de EROs, induzida por certas concentrações de

nATZ, foi potencializada na presença de nPPS (Figura 7). Um padrão semelhante foi observado para a atividade da CAT, com maior inibição da enzima em algumas concentrações de nATZ quando nPPS estava presente, sobretudo nas gerações P0 e F1 (Figura 8). Em contraste, o conteúdo de pigmentos (Figura 10) não apresentou um padrão claro de interação, indicando que o nPPS não influencia nas alterações de pigmentos induzidas pela nATZ em *L. minor*.

CONCLUSÃO

Embora os nPPS sejam comuns no ambiente, sua concentração ambiental esperada não é capaz de causar impactos significativos no crescimento das colônias de *L. minor* nem de induzir estresse oxidativo. Por outro lado, a exposição à nATZ reduziu a taxa de crescimento das colônias, com um aumento na toxicidade observado conforme as concentrações aumentaram e com o avanço das gerações de *L. minor*, especialmente até a geração F4. A toxicidade da nATZ é semelhante à da atrazina livre, sugerindo uma possível liberação da substância no meio aquoso. Quando presentes simultaneamente no ambiente, a provável concentração ambiental de nPPS não influenciou significativamente a toxicidade da nATZ para as lemnas, indicando que os efeitos observados foram predominantemente causados pela exposição à nATZ isolada. Contudo, em alguns cenários específicos de exposição, a presença de nPPS potencializou a geração de EROs, a inibição da atividade da enzima CAT e a redução de alguns pigmentos induzidos pela nATZ. Cabe destacar que, comparativamente, as concentrações de nATZ testadas, ainda que relevantes sob a perspectiva de sua aplicação agrícola e de ocorrência ambiental, foram substancialmente maiores do que a concentração de nPPS considerada neste estudo.

Esses resultados ressaltam a importância de considerar não apenas os efeitos individuais, mas também as misturas de nanocontaminantes no contexto da toxicologia ambiental, especialmente os efeitos multigeracionais e o estresse oxidativo em organismos aquáticos. Compreender os mecanismos de ação tóxica dessas substâncias, isoladamente e em misturas, pode contribuir para um melhor entendimento do risco ecológico das nanomisturas e para o desenvolvimento de estratégias de gestão ambiental para mitigação dos riscos.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ALBUQUERQUE, F. P. et al. Overview of Nanopesticide Environmental Safety Aspects and Regulatory Issues: The Case of Nanoatrazine, in: **Nanopesticides**. Cham: Springer International Publishing, p. 281–298, 2020.
- AL-SID-CHEIKH, M. et al. Uptake, whole-body distribution, and depuration of nanoplastics by the scallop *Pecten maximus* at environmentally realistic concentrations. **Environmental Science & Technology**, v. 52, p. 14480–14486, 2018.
- ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 1596-1605, 2011.
- ARIKAN, B. et al. The impacts of nanoplastic toxicity on accumulation, hormonal regulation and tolerance mechanisms in a potential hyperaccumulator – *Lemna minor* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 440, 2022.
- BAKER, A. et al. Catalase: A critical node in the regulation of cell fate. **Free Radical Biology & Medicine**, 2023.
- BANDEIRA et al. Individual and combined toxicity of polystyrene nanoplastics and clothianidin toward *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Toxicology**, v. 44(2), p. 470-483, 2025.
- BAUN, A. et al. Regulatory relevant and reliable methods and data for determining the environmental fate of manufactured nanomaterials. **NanoImpact**, v. 8, p. 1-10, 2017.
- BENGHAFFOUR, A. et al. Ecotoxicity of diazinon and atrazine mixtures after ozonation catalyzed by Na⁺ and Fe²⁺ exchanged montmorillonites on *Lemna minor*. **Molecules**, v. 28, 2023.
- BISCHOFF, H.; BOLD, H. Phycological studies. **University of Texas Publication** 6924. Austin: University of Texas, 1963.
- BOMBO, A. B. et al. A mechanistic view of interactions of a nanoherbicide with target organism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 4453–4462, 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CAIXETA OLIVEIRA, H. et al. Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. **PLoS One**, v. 10, e0132971, 2015.
- CHENG, Y. et al. Combined effects of mulch film-derived microplastics and atrazine on oxidative stress and gene expression in earthworm (*Eisenia fetida*). **Science of the Total Environment**, v. 746, 2020.

CRUZ, F. V. S. et al. Tolerance and phytoremediation capacity of atrazine and S-metolachlor by two duckweeds. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 5, p. 59382–59397, 2024.

FEKETE-KERTÉSZ, I. et al. Assessing toxicity of organic aquatic micropollutants based on the total chlorophyll content of *Lemna minor* as a sensitive endpoint. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v. 59, p. 262–271, 2015.

FESSI, H. et al. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **Patent**, E., 1988.

FESSI, H. et al. Rapid communication: Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, 1989.

FOYER, C. H.; HANKE, G. ROS production and signalling in chloroplasts: cornerstones and evolving concepts. **The Plant Journal**, v. 111, p. 642–661, 2022.

GOMES, S.I.L., et al. On the safety of nanoformulations to non-target soil invertebrates-an atrazine case study. **Environmental Science: Nano**, 6, 1950–1958, 2019.

GRILLO, R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: physicochemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231–232, p. 1-9, 2012.

HENNIG, T. B. et al. A systematic review of the toxic effects of a nanopesticide on non-target organisms: estimation of protective concentrations using a species sensitivity distribution (SSD) approach – the case of atrazine. **Science of the Total Environment**, 2023.

HODGES, D. et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, p. 604–611, 1999.

JUNHAO, C. et al. Extraction and identification methods of microplastics and nanoplastics in agricultural soil: a review. **Journal of Environmental Management**, 2021.

KLEMENTOVÁ, Š. et al. Toxicity of atrazine and the products of its homogeneous photocatalytic degradation on the aquatic organisms *Lemna minor* and *Daphnia magna*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 27259–27267, 2019.

LEE, B. et al. Bioaccumulation and in-vivo dissolution of CdSe/ZnS with three different surface coatings by *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 143, p. 115-122, 2016.

LENZ, R. et al. Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S.l.], 2016.

LESLIE, H. A. et al. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. **Environment International**, v. 163, 2022.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in Enzymology**. V. 148, p. 350-382, 1987.

LIU, S. et al. Eco-corona formation and associated ecotoxicological impacts of nanoplastics in the environment. **Science of the Total Environment**, v. 803, 2022.

LIU, Z. et al. Effects of nanoplastics at predicted environmental concentration on *Daphnia pulex* after exposure through multiple generations. **Environmental Pollution**, v. 256, 2020.

MACLEOD, M. et al. The global threat from plastic pollution. **Nature Communications**, v. 12, 2021.

MATERIĆ, D. et al. Nanoplastics transport to the remote, high-altitude Alps. **Environmental Pollution**, v. 288, 2021a.

MENDEITA HERRERA, J. et al. Toxicity of difenoconazole and atrazine and their photodegradation products on aquatic biota: environmental implications in countries lacking good agricultural practices. **Toxics**, v. 11, 2023.

MITRANO, D. M.; WOHLLEBEN, W. Microplastic regulation should be more precise to incentivize both innovation and environmental safety. **Nature Communications**, v. 11, 2020.

NIZZETTO, L. et al. Are Agricultural Soils Dumps for Microplastics of Urban Origin? **Environmental Science and Technology**, v. 50, p. 10777-10779, 2016.

OECD. Test No. 221: *Lemna sp.* Growth Inhibition Test. Paris: **OECD**, 2006.

OECD. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Paris: **OECD**, 2011.

OLIVEIRA, H. C. et al. Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. **PLoS One**, v. 10, e0132971, 2015.

OSCAR, B. V. C. et al. Aged polyethylene terephthalate (PET) by photodegradation can affect the next generation of exposed *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, [S.l.], v. 966, p. 178719, 25 fev. 2025.

PALMA, J. M. et al. Plant catalases as NO and H₂S targets. **Redox Biology**, 2020.

PAN, T. et al. Single and combined toxicity of polystyrene nanoplastics and PCB-52 to the aquatic duckweed *Spirodela polyrrhiza*. **Science of the Total Environment**, v. 901, 2023.

PLASTICSEUROPE. **Plastics - the Facts**, 2023. Disponível em: <
<https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/>> . Acesso em: 02 mai. 2025

PEREIRA, A. E. S. et al. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p. 207-215, 2014.

- PREISLER, A. C. et al. Atrazine nanoencapsulation improves pre-emergence herbicidal activity against *Bidens pilosa* without enhancing long-term residual effect on *Glycine max*. **Pest Management Science**, v. 76, p. 141–149, 2020.
- QI, Y. et al. Effects of plastic mulch film residues on wheat rhizosphere and soil properties. **Journal of Hazardous Materials**, v. 387, 2020.
- SCOGNAMIGLIO, V. et al. An eco-designed paper-based algal biosensor for nanoformulated herbicide optical detection. **Journal of Hazardous Materials**, v. 373, p. 483–492, 2019.
- SHORT, F. T. et al. Impacts of climate change on submerged and emergent wetland plants. **Aquatic Botany**, v. 135, p. 3–17, 2016.
- SONG, G. et al. Physiological effect of anatase TiO₂ nanoparticles on *Lemna minor*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 2147–2152, 2012.
- SOUSA, B. T. et al. Effectiveness of nanoatrazine in post-emergent control of the tolerant weed *Digitaria insularis*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 60, p. 185–192, 2020.
- TAKESHITA, V. et al. Foliar absorption and field herbicidal studies of atrazine-loaded polymeric nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 418, p. 126350, 2021.
- TAGUN, R.; BOXALL, A. B. A. The response of *Lemna minor* to mixtures of pesticides that are commonly used in Thailand. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 100, p. 516–523, 2018.
- TEODOROVIĆ, I. et al. *Myriophyllum aquaticum* versus *Lemna minor*: sensitivity and recovery potential after exposure to atrazine. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 417–426, 2012.
- VAN WEERT, S. et al. Effects of nanoplastics and microplastics on the growth of sediment-rooted macrophytes. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 1040–1047, 2019.
- VARÓ, I. et al. Time-dependent effects of polystyrene nanoparticles in brine shrimp *Artemia franciscana* at physiological, biochemical and molecular levels. **Science of the Total Environment**, v. 675, p. 570–580, 2019.
- VELIKOVA, V. et al. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, 2000.
- VICENTINI, D. S. et al. Toxicological evaluation and quantification of ingested metal-core nanoplastic by *Daphnia magna* through fluorescence and inductively coupled plasma-mass spectrometric methods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, p. 2101–2110, 2019.
- WANG, Q. et al. Phytotoxicity assessment of atrazine on growth and physiology of three emergent plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 9646–9657, 2015.

WANG, Y. et al. Individual and combined toxic effects of herbicide atrazine and three insecticides on the earthworm, *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology**, v. 25, p. 991–999, 2015.

WANG, Y. et al. Combinational exposure to hydroxyatrazine increases neurotoxicity of polystyrene nanoparticles on *Caenorhabditis elegans*. **Science of the Total Environment**, v. 880, 2023.

WU, J. et al. The differences between the effects of a nanoformulation and a conventional form of atrazine to lettuce: physiological responses, defense mechanisms, and nutrient displacement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, p. 12527–12540, 2021.

XU, D. et al. Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 103–107, 2013.

XU, Y. et al. Identification and quantification of nanoplastics in surface water and groundwater by pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry. **Environmental Science & Technology**, v. 56, p. 4988–4997, 2022.

ZHU, J. et al. Effects of Photosystem-II-interfering herbicides atrazine and bentazon on the soybean transcriptome. **The Plant Genome**, v. 2, 2009.

4.3 CAPÍTULO III – Quais são os efeitos toxicológicos da mistura de nanoplásticos com um nanopesticida em *Daphnia magna* e *Aliivibrio fischeri*?

RESUMO

A nanotecnologia tem melhorado a eficiência de pesticidas, como a nanoatrazina, mas levanta preocupações a respeito de sua toxicidade, especialmente em organismos aquáticos, em paralelo ao crescente problema ambiental da poluição por nanoplásticos. Este estudo avaliou os efeitos individuais e combinados da atrazina nanoencapsulada (nATZ) e dos nanoplásticos de poliestireno (nPPS) sobre o microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* e a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*. Os testes agudos com *D. magna* determinaram efeitos de letalidade e os tipos de interação quando as misturas foram analisadas (sinergismo, antagonismo ou aditividade). A exposição crônica de *D. magna* avaliou a sobrevivência, a reprodução, o crescimento e a natação após 21 dias. As espécies reativas de oxigênio (EROs) e a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, GST e GPx) também foram analisadas. The tests with *A. fischeri* evaluated the response of organisms to contamination scenarios in terms of the effects on bacterial bioluminescence. Os testes agudos com *D. magna* mostraram valores de CEO de 4 mg L⁻¹ (nATZ), 130,7 mg L⁻¹ (nPPS) e 1,15 + 65,4 mg L⁻¹ (mistura), com efeitos predominantemente sinérgicos. A exposição crônica causou inibição do crescimento a partir de 0,0228 mg L⁻¹ (nATZ) e 0,98 mg L⁻¹ (nPPS), e efeitos reprodutivos em concentrações ainda mais baixas. Houve um aumento nos níveis de EROs, especialmente para as exposições à mistura, e também da atividade GST, enquanto as respostas de SOD e GPx mostraram respostas variadas. Para *A. fischeri*, a toxicidade da mistura foi semelhante à do nPPS individual, sugerindo que os efeitos de toxicidade da mistura podem ter sido desencadeados pelo nPPS, e reforçando a complexidade das interações entre contaminantes emergentes em ambientes aquáticos.

Palavras-chave: Atrazina nanoencapsulada, nanoplásticos de poliestireno, toxicidade aquática, toxicidade de mistura.

1 INTRODUÇÃO

Como reflexo dos avanços tecnológicos na agricultura, a nanotecnologia tem sido amplamente utilizada na produção de novos produtos agrícolas, como os nanopesticidas. A atrazina nanoencapsulada em um biopolímero (atrazina em poli- ϵ -caprolactona; PCL), também conhecida como nanoatrazina (nATZ), foi desenvolvida para reduzir os efeitos adversos da atrazina no meio ambiente e aumentar a eficiência do ingrediente ativo (i.a.) por meio de sua liberação controlada no ambiente (Grillo et al., 2012). Estudos de eficiência realizados com a nATZ mostram que ela é mais eficaz no controle de pragas do que a atrazina convencional, exigindo menores quantidades e menor frequência de aplicação no campo (Bombo et al., 2019; Caixeta Oliveira et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Pereira et al., 2014; Sousa et al., 2020; Takeshita et al., 2021). No entanto, estudos toxicológicos já demonstraram que a nATZ pode ser tóxica para organismos de diferentes ecossistemas, incluindo organismos aquáticos (Hennig et al., 2023).

Ao mesmo tempo em que há um problema ambiental decorrente do uso de nanopesticidas, também existe a contaminação ambiental por plásticos. Em 2023, a produção e o consumo de plásticos atingiram a marca histórica de 413,8 milhões de toneladas (PLASTICSEUROPE, 2023). A degradação de plásticos no ambiente pode gerar nanoplásticos secundários (Horton et al., 2017). Já os nanoplásticos primários são produzidos intencionalmente e usados em cosméticos, produtos de higiene e têxteis, alcançando o ambiente aquático por meio do descarte de efluentes (Andrady, 2011; Nizzeto et al., 2016).

O poliestireno, amplamente empregado em diversos utensílios de uso frequente e descartável, está entre os plásticos de maior impacto ambiental. Seus nanoplásticos (nPPS) já foram detectados em solos, sedimentos e água. Devido ao seu tamanho nanométrico, os nPPS podem ser facilmente ingeridos e/ou absorvidos por organismos aquáticos, ou ainda atuar como vetores de outros poluentes, como a nATZ (Horton et al., 2017).

Alguns estudos já investigaram os efeitos da mistura de nATZ, atrazina livre ou outros produtos à base de atrazina com nanoplásticos em diferentes grupos de organismos. No capítulo anterior, foi verificado que a presença de nPPS, em concentração ambiental ($0,001 \text{ mg L}^{-1}$), não influenciou a toxicidade da nATZ sobre o crescimento de colônias da macrófita *Lemna minor*, mas pode potencializar o estresse oxidativo e afetar a atividade de enzimas antioxidantes em alguns cenários de contaminação combinada. Wang et al. (2023) observaram que a mistura do metabólito hidroxiatrazina com nPPS intensificou a disfunção motora e causou

neurodegeneração em nematoides *Caenorhabditis elegans*, com efeitos mais severos do que os induzidos por cada contaminante isoladamente. Cheng et al. (2020) verificaram que minhocas *Eisenia andrei* sofreram estresse oxidativo e alterações na expressão gênica quando expostas à combinação de atrazina e nanoplásticos de polietileno. Além disso, observaram maior bioacumulação de atrazina nos organismos expostos à mistura, em comparação à exposição ao pesticida isolado.

Esses efeitos reforçam a importância de investigar os impactos de nanocontaminantes em organismos-chave de diferentes níveis tróficos nos ecossistemas aquáticos. *Daphnia magna*, por exemplo, é um microcrustáceo amplamente utilizado como modelo em estudos ecológicos e ecotoxicológicos, devido ao seu papel fundamental como filtrador pelágico em ambientes lênticos, onde regula a biomassa fitoplanctônica, incluindo cianobactérias nocivas (Pintar et al., 2004; Chislock et al., 2013). Sua sensibilidade a poluentes e a capacidade de apresentar respostas à exposição a estressores ambientais tornam essa espécie ideal para estudos de toxicidade aguda e crônica. Já a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* é utilizada em testes padronizados de toxicidade aguda baseados na inibição da bioluminescência, permitindo uma avaliação rápida e sensível da presença de substâncias tóxicas na água (Pintar et al., 2004). Dessa forma, o uso desses organismos-teste possibilita uma avaliação abrangente dos efeitos ecotoxicológicos da nATZ e dos nPPS sobre organismos unicelulares e multicelulares e representativos de corpos hídricos com diferentes salinidades.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SUBSTÂNCIAS TESTE

A nATZ foi sintetizada em laboratório (Universidade Estadual Paulista) com base no método descrito por Fessi et al. (1988). O processo consistiu na mistura de uma fase orgânica com uma fase aquosa. A fase orgânica continha 100 mg de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), 30 mL de acetona, 200 mg de Miglyol 810 (triglicerídeos de ácidos caprílico e cáprico), 40 mg de monoestearato de sorbitano (Span 60) e 10 mg de atrazina. A fase aquosa foi composta por 30 mL de uma solução contendo 60 mg de polissorbato 80 (Tween 80). Após a dissolução completa dos componentes, a fase orgânica foi lentamente adicionada à fase aquosa sob agitação

magnética. A mistura foi agitada por 10 minutos, e o solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo (Fessi et al., 1988; 1989). Esse processo resultou em uma suspensão de nanopartículas com concentração de atrazina de 1 mg mL⁻¹.

Os nPPS foram sintetizados em laboratório (Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX da Universidade Federal de Santa Catarina) utilizando o método descrito por Lu et al. (2009), com modificações propostas por Vicentini et al. (2019). A síntese envolveu a polimerização em emulsão do monômero de estireno na superfície de nanopartículas de óxido de alumínio (Al₂O₃). A reação foi realizada a 70 °C durante 24 horas, utilizando 7,7 mL de estireno, 70 mg de nanopartículas de Al₂O₃, 350 mg de persulfato de potássio (KPS) como iniciador e 140 mg de dodecil sulfato de sódio (SDS) como surfactante (Vicentini et al., 2019). Esse processo resultou em uma suspensão de nPPS com concentração final de 70 mg mL⁻¹.

2.1.1 Caracterização das substâncias teste

As substâncias teste foram caracterizadas por meio de análise morfológica, utilizando imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET; JEOL; microscópio JEM-1011, 80 kV; LCME/UFSC), e por análise indireta da estabilidade das partículas, com medições de potencial zeta (PZ), índice de polidispersidade (IPD) e diâmetro hidrodinâmico (DH) das nanopartículas, realizadas no equipamento Nanobrook ZetaSizer (Nanobrook 90 Plus PALS; LABTOX/UFSC). As análises de PZ, DH e IDP foram conduzidas em água de osmose reversa (OR) e em todos os meios de exposição utilizados para os organismos teste deste estudo: meio ISO (exposição aguda para *Daphnia magna* – ISO, 2012), meio M4 (exposição crônica para *D. magna* – ABNT, 2016) e solução de cloreto de sódio a 1% (NaCl 1%; meio de exposição para *Aliivibrio fischeri* – ABNT, 2021).

2.2 CULTIVO E TESTES COM *D. magna*

Os organismos foram cultivados de acordo com as normas NBR 12.713 (ABNT, 2022) e ISO 6341 (ISO, 2012), em condições controladas de laboratório, com temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 16:8 h claro:escuro. Os cultivos foram mantidos em béqueres de 2 L contendo aproximadamente 1 L de meio M4, conforme descrito na ABNT (2016). A manutenção foi realizada três vezes por semana, com renovação do meio e fornecimento de alimento com *Scenedesmus subspicatus*.

Testes de sensibilidade foram realizados semanalmente com concentrações crescentes da substância de referência, dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$; ABNT, 2016; ISO, 2012), para verificar a viabilidade do uso dos organismos nos testes de toxicidade.

2.2.1 Testes de toxicidade aguda com *D. magna*

Testes de toxicidade aguda com *D. magna* foram realizados de acordo com a norma ISO 6341 (ISO, 2012). Dez neonatos (<24 horas de idade) foram individualmente colocados em cada unidade experimental contendo 50 mL da solução de teste. Um grupo controle, exposto apenas ao meio ISO, foi incluído para comparação.

Testes agudos preliminares foram conduzidos separadamente para cada nanocontaminante, a fim de determinar seus respectivos valores de CE_{50} (a concentração que causa imobilização em 50% dos organismos), após 48 h de exposição. Esses valores de CE_{50} foram então utilizados para expressar as concentrações de teste em unidades tóxicas (UTs), onde 1 UT = EC_{50} de cada composto.

Em testes oficiais, para os ensaios com compostos individuais, *D. magna* foi exposta a concentrações variando de 0,125 UT a 1,25 UT. A toxicidade binária total equivale à soma das toxicidades individuais (por exemplo, 1 UT_{mistura} = 0,5 UT_{nATZ} + 0,5 UT_{nPPS}). As concentrações das misturas variaram de 0,25 UT a 2,5 UT, conforme detalhado na Tabela 1. A Figura 1 ilustra a montagem do experimento.

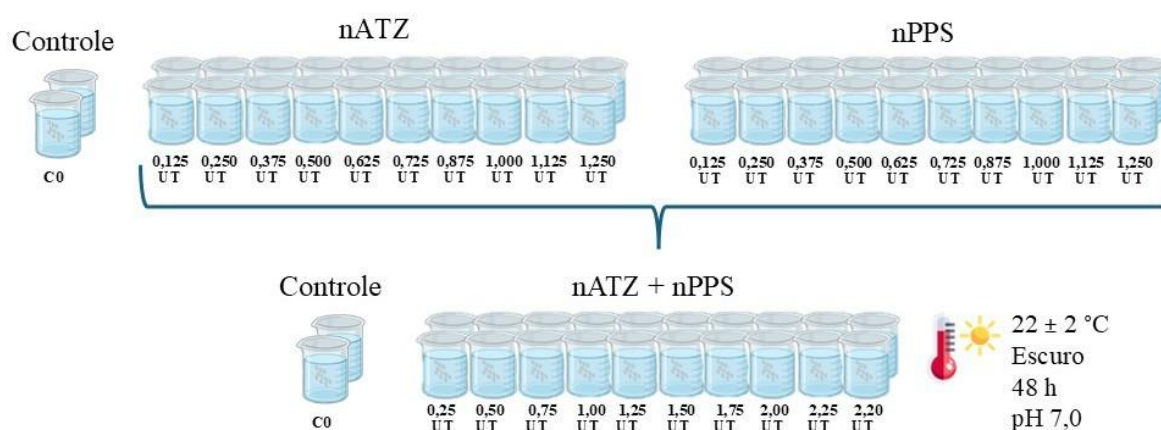


Figura 1 - Representação esquemática dos testes de exposição aguda de *Daphnia magna* expostas ao nanoplásticos de poliestireno (nPPS), atrazina nanoencapsulada (nATZ) e à mistura nATZ + nPPS.

Tabela 1 - Concentrações testadas nos ensaios de toxicidade aguda com atrazina nanoencapsulada (nATZ) e nanoplástico de poliestireno (nPPS), individualmente e em mistura (nATZ + nPPS), sobre o microcrustáceo *Daphnia magna*.

UT _{individual}	nATZ (mg L ⁻¹)	nPPS (mg L ⁻¹)	UT _{mistura binária}	nATZ + nPPS (mg L ⁻¹)
CE ₅₀	4,60	261,50	-	-
0	0	0	0	0,00 + 0,00
0,125	0,57	32,70	0,25	0,57 + 32,70
0,25	1,15	65,40	0,50	1,15 + 65,40
0,37	1,70	98,00	0,75	1,70 + 98,00
0,50	2,30	130,75	1,00	2,30 + 130,75
0,63	2,90	163,45	1,25	2,90 + 163,45
0,75	3,40	196,15	1,50	3,40 + 196,15
0,87	4,00	228,80	1,75	4,00 + 228,80
1,00	4,60	261,50	2,00	4,60 + 261,50
1,13	5,10	294,20	2,25	5,10 + 294,20
1,25	5,70	326,85	2,50	5,70 + 326,85

Ao final desses testes, foi possível verificar a imobilidade dos organismos expostos, bem como determinar os valores da maior concentração sem efeito observado (CENO), da menor concentração com efeito observado (CEO) e também se houve efeito sinérgico, aditivo ou antagonista da mistura de nanocontaminantes sobre os organismos. A análise dos dados é apresentada na Seção 2.4.

Além disso, testes paralelos de toxicidade aguda foram realizados com nATZ, nPPS e suas misturas, expondo os organismos apenas à CENO estimada nos testes agudos anteriores. Os testes seguiram as diretrizes da NBR 12713 (ABNT, 2016) com adaptações propostas por Nogueira et al. (2022). Esses testes tiveram como objetivo avaliar o estresse oxidativo por meio da quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da análise da atividade de enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx).

2.2.2 Testes de toxicidade crônica com *D. magna*

Testes de toxicidade crônica com *D. magna* foram conduzidos conforme a norma ISO 10706 (2000). Neonatos (< 24 horas de idade) foram expostos por 21 dias ao meio M4 contendo quatro concentrações nominais de nATZ (0,000228; 0,00228; 0,0228; e 0,228 mg L⁻¹), nPPS (0,0098; 0,098; 0,98; e 9,80 mg L⁻¹) e suas misturas (0,000228 + 0,0098; 0,00228 + 0,098; 0,0228 + 0,98; e 0,228 + 9,80 mg L⁻¹ de nATZ + nPPS). Um tratamento controle contendo

apenas o meio M4 (sem contaminantes) também foi incluído. As concentrações de teste foram selecionadas com base nos resultados dos testes de toxicidade aguda previamente descritos. Foram preparadas dez réplicas por tratamento, utilizando béqueres de vidro de 50 mL contendo um neonato cada. Os testes foram conduzidos sob as mesmas condições controladas de temperatura e fotoperíodo da cultura dos organismos. A Figura 2 ilustra o esquema experimental.

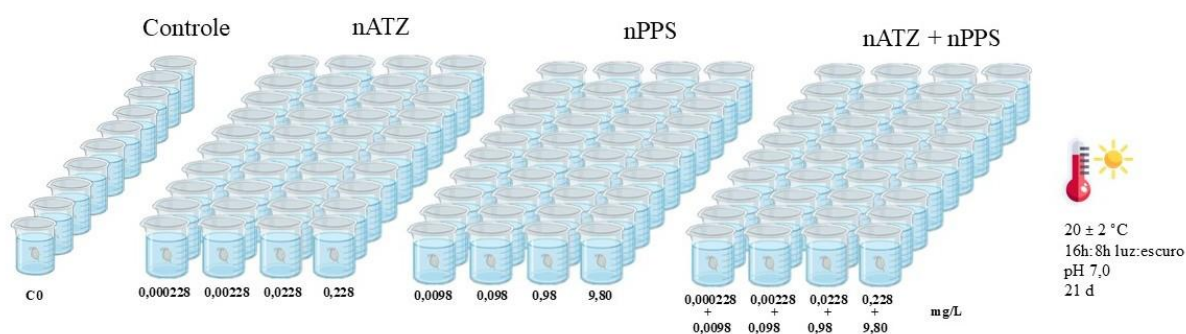


Figura 2 - Representação esquemática dos testes de exposição crônica de *Daphnia magna* expostas ao nanoplásticos de poliestireno (nPPS), atrazina nanoencapsulada (nATZ) e à mistura nATZ + nPPS.

A cada dois dias, o meio foi renovado, com novas soluções-teste preparadas, e os organismos foram alimentados com *S. subspicatus*. O experimento foi monitorado diariamente para o registro da longevidade (número de indivíduos sobreviventes) e dos parâmetros reprodutivos (número de neonatos por postura e número total de posturas). Ao final do teste, foram analisados biomarcadores de estresse oxidativo por meio da atividade das enzimas SOD, GST e GPx nos organismos que sobreviveram. Também foram avaliados o comprimento corporal dos indivíduos, medido com auxílio de um estereomicroscópio, e seu comportamento de natação.

O comportamento de natação de *D. magna* expostas a nATZ, nPPS e suas misturas foi avaliado após os testes de toxicidade crônica. O procedimento seguiu as metodologias descritas por Nogueira et al. (2022) e Bandeira et al. (2023). Ao final do experimento, os indivíduos adultos sobreviventes de cada tratamento foram realocados para uma placa de Petri contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultivo (meio M4). Após um período de aclimação de 3 minutos, seus movimentos foram registrados por 1 minuto por meio de filmagem em ângulo superior, mantendo-se as mesmas condições ambientais dos ensaios de toxicidade. Os vídeos foram analisados utilizando o software Kinovea (versão 0.9.5) para determinar as trajetórias de natação e a distância total percorrida.

2.2.3 Avaliação do estresse oxidativo em *D. magna*

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, para as amostras coletadas após os testes de toxicidade aguda e crônica.

Os níveis de EROs foram mensurados ao final do teste de toxicidade aguda com *D. magna*, após a exposição à CENO de nATZ, nPPS e sua mistura (com base nos dados obtidos nos testes agudos anteriores). A análise seguiu o protocolo descrito por Ferreira-Cravo et al. (2007), no qual as EROs são quantificadas por meio da reação com 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA). A fluorescência resultante foi medida em um leitor de microplacas TECAN (modelo Infinite 200), com excitação a 480 nm e emissão a 525 nm, durante um período de 30 minutos.

Além disso, também foram analisadas as atividades das enzimas SOD, GST e GPx. As atividades destas enzimas foram analisadas após a exposição aguda à CENO dos contaminantes individuais e de sua mistura, e também para os indivíduos sobreviventes dos testes de toxicidade crônica, abrangendo os tratamentos controle, compostos isolados e a mistura.

A atividade da SOD foi determinada pelo método descrito por Paoletti (1990), que se baseia em diluições seriadas das amostras e na reação do NADH com β -mercaptoetanol como iniciador da reação. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas TECAN (Infinite 200) a 340 nm durante 40 minutos, a 27°C. A atividade da GST foi avaliada conforme o método de Habig e Jakoby (1981), utilizando tampão salino fosfatado (PBS), glutathiona reduzida (GSH) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como iniciador da reação. As leituras foram feitas a 340 nm durante 5 minutos, a 27°C, em leitor de microplacas TECAN (Infinite 200). A atividade da GPx foi determinada segundo Wendel (1981), com as amostras incubadas em PBS contendo GSH, glutathiona redutase (GR), NADPH e hidroperóxido de cumeno (CHP) como iniciador da reação. A atividade enzimática foi medida a 340 nm durante 5 minutos, a 27°C, utilizando leitor de microplacas TECAN (Infinite 200).

2.3 TESTES DE TOXICIDADE COM *Aliivibrio fischeri*

Os testes de toxicidade utilizando a bactéria marinha bioluminescente *Aliivibrio fischeri* foram realizados conforme a norma NBR 15411 – Parte 3, destinada a ensaios com bactérias liofilizadas (ABNT, 2021). Este protocolo é específico para o sistema Microtox®500.

A temperatura do ensaio foi controlada automaticamente pelo equipamento, mantendo as diluições dos testes a $15 \pm 1^\circ\text{C}$ e o reagente bacteriano a 3°C . A bioluminescência foi medida em dois momentos: imediatamente antes da exposição (tempo zero) e 15 minutos após a exposição das bactérias aos contaminantes individuais e à mistura.

As concentrações das diluições dos testes foram: 80%, 50%, 33,33%, 25%, 16,67%, 12,50%, 8,33% e 6,25% em NaCl 1%, conforme recomendado pela ABNT (2021). A diluição de 80% correspondeu às concentrações de $2,64 \text{ mg L}^{-1}$ para nATZ, $178,4 \text{ mg L}^{-1}$ para nPPS e $2,64 + 178,4 \text{ mg L}^{-1}$ para a mistura nATZ + nPPS.

A toxicidade foi expressa pela concentração efetiva que causou 50% de inibição da bioluminescência após 15 minutos de exposição ($\text{CE}_{50-15\text{min}}$). Esses valores foram calculados utilizando o software Microtox Omni 4.0, fornecido junto ao sistema de ensaio.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada ensaio de toxicidade, a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram avaliadas utilizando os testes de Kolmogorov–Smirnov e Bartlett, respectivamente. Em seguida, as médias dos tratamentos foram comparadas ao grupo controle por meio do teste post hoc de Dunnett, considerando-se significância estatística para $p < 0,05$, permitindo a identificação dos valores de CENO e CEO.

Para comparar as toxicidades individual e combinada de nATZ e nPPS em níveis de concentração equivalentes e para cada parâmetro avaliado após exposição crônica, as médias dos tratamentos foram comparadas utilizando o teste de Tukey, com significância estatística de $p < 0,05$.

Nos ensaios de toxicidade aguda com *D. magna* e nos testes de inibição da bioluminescência com *A. fischeri*, as concentrações que causaram 50% do efeito (CE_{50}) e seus intervalos de confiança de 95% foram estimados por meio de modelos de regressão não linear.

Os dados dos biomarcadores de estresse oxidativo obtidos nos ensaios de toxicidade aguda foram analisados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As respostas dos biomarcadores nos testes de exposição crônica foram avaliadas por meio da estimativa da área sob a curva (AUC).

Para avaliar as interações toxicológicas nas misturas binárias, foi aplicado o modelo de Abbott (Abbott, 1925; Leite et al., 2025; Bandeira et al., 2025). A inibição esperada (C_{esp}) da mistura foi calculada com base nos efeitos inibitórios individuais do nATZ e do nPPS, utilizando a equação:

$$C_{esp} = A + B - \left(\frac{A \times B}{100}\right)$$

A e B representam a porcentagem de inibição causada pela nATZ e pelo nPPS, respectivamente, quando testados isoladamente. A razão de inibição (RI) foi então determinada comparando a inibição observada (C_{obs}) da mistura, através dos testes, com a inibição esperada (C_{esp}), conforme mostrado na equação:

$$IR = \frac{C_{obs}}{C_{esp}}$$

Valores de RI menores que 1 indicam efeitos antagônicos, valores maiores que 1 indicam efeitos sinérgicos, e um valor igual a 1 indica efeito aditivo.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS TESTE

Conforme apresentado no Capítulo II, as imagens de TEM mostraram que tanto a nATZ quanto o nPPS formaram nanopartículas esféricas (Figura 1, Capítulo II). O diâmetro médio da nATZ foi de $90,32 \pm 3,06$ nm, enquanto o do nPPS foi de $91,09 \pm 1,07$ nm (Figura 1, Capítulo II).

Os demais parâmetros de PZ, DH e IPD foram avaliados em OR, meios de exposição ISSO, M4 e NaCl (1%) e estão apresentados na Tabela 2. Os dados revelam que ambos os nanocontaminantes, individualmente e em mistura, estão dispersos no meio.

Tabela 2 - Valor médio ($\pm$ desvio padrão; $n = 3$) do potencial zeta (PZ), diâmetro hidrodinâmico (DH) e índice de polidispersidade (IPD) para atrazina nanoencapsulada (nATZ), nanoplastico de poliestireno (nPPS) e a mistura de nATZ + nPPS. As análises foram realizadas em água de osmose reversa (OR) e em meio de exposição ISO, M4 e cloreto de sódio (NaCl 1%).

Composto	Meio de exposição	PZ (mV)	DH (nm)	IPD
nATZ	OR	$-35,20 \pm 1,29$	$191,67 \pm 4,50$	$0,25 \pm 0,01$
	ISO	$-21,69 \pm 0,11$	$287,73 \pm 3,13$	$0,13 \pm 0,03$
	M4	$-19,01 \pm 0,48$	$292,10 \pm 2,00$	$0,11 \pm 0,07$
	NaCl 1%	$-11,06 \pm 3,63$	$312,07 \pm 4,29$	$0,12 \pm 0,04$
nPPS	OR	$-44,80 \pm 0,98$	$178,64 \pm 6,74$	$0,30 \pm 0,01$
	ISO	$-45,40 \pm 0,82$	$170,06 \pm 2,40$	$0,28 \pm 0,00$
	M4	$-40,00 \pm 6,79$	$179,18 \pm 2,23$	$0,27 \pm 0,03$
	NaCl 1%	$-28,68 \pm 2,20$	$242,82 \pm 4,60$	$0,28 \pm 0,03$
nATZ + nPPS	OR	$-31,31 \pm 0,56$	$226,52 \pm 5,66$	$0,25 \pm 0,00$
	ISO	$-27,85 \pm 0,49$	$201,51 \pm 5,04$	$0,22 \pm 0,00$
	M4	$-21,81 \pm 5,18$	$269,98 \pm 6,24$	$0,21 \pm 0,00$
	NaCl 1%	$-13,50 \pm 1,56$	$271,75 \pm 17,48$	$0,21 \pm 0,01$

Em água de OR, a nATZ exibiu uma forma esférica, um DH de ~ 190 nm, um PZ de $-35,2$ mV e um IPD de $0,25$, em acordo com os achados de Grillo et al. (2016). O nPPS apresentou morfologia esférica, um PZ de $-45,6$ Mv, um DH de ~ 180 nm e um IPD de $0,25$, em acordo com os achados por Vicentini et al. (2019).

Nos meios de exposição M4 e NaCl 1%, ambas as nanoformulações e suas misturas apresentaram aumento do PZ e do DH, provavelmente devido à maior força iônica do meio, devido à presença de sais, que pode ter alterado as cargas de superfície e o comportamento de agregação. Esse efeito foi mais pronunciado para a mistura nATZ + nPPS, possivelmente devido à interação das nanopartículas.

3.2 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM *D. magna*

Ao final da exposição aguda (48 horas), os microcrustáceos expostos apresentaram imobilidade em concentrações de 4 mg L^{-1} de nATZ, $130,70 \text{ mg L}^{-1}$ de nPPS e de $1,15 + 65,40 \text{ mg de nATZ + nPPS L}^{-1}$, representando os valores de CEO. Os valores de CENO foram $3,40 \text{ mg L}^{-1}$ para nATZ, $98,00 \text{ mg L}^{-1}$ para nPPS e de $0,57 + 32,70 \text{ mg para nATZ + nPPS L}^{-1}$. Os valores de CE_{50} obtidos foram $4,403 (3,6 - 5,5) \text{ mg L}^{-1}$ para nATZ e $266,5 (251,8 - 282,0) \text{ mg L}^{-1}$ para nPPS.

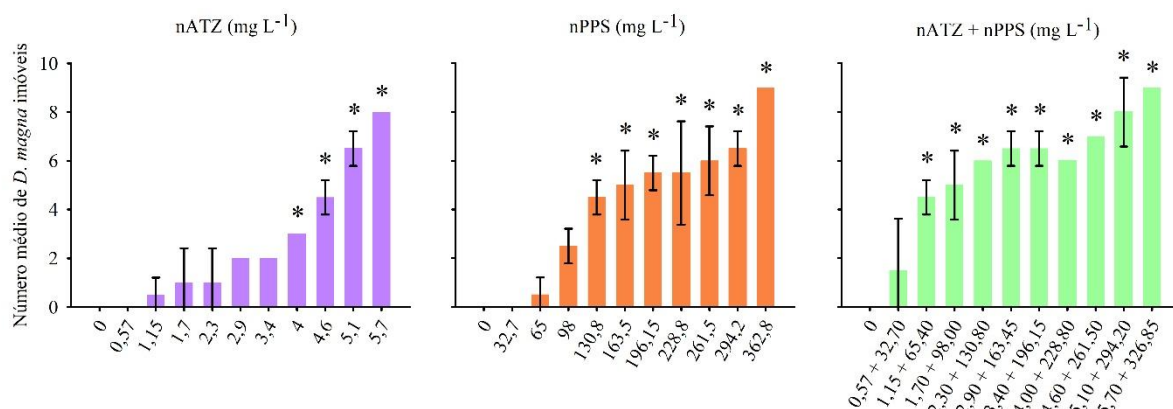


Figura 3 - Número médio de microcrustáceos *Daphnia magna* imóveis (barras $\pm$ desvio padrão; n=10) após 48 horas de exposição à atrazina nanoencapsulada (nATZ), ao nanoplástico de poliestireno (nPPS) e a diferentes cenários de mistura desses dois nanocontaminantes (nATZ + nPPS). Os asteriscos (*) representam um aumento significativo no número de microcrustáceos imóveis em comparação com o respectivo controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

Com relação às interações observadas para as exposições de misturas (Tabela 3), a equação de Abbott indicou um efeito predominantemente sinérgico a partir da interação entre os nanocontaminantes. No entanto, para alguns casos envolvendo misturas nas concentrações mais altas, foi observada uma interação antagônica. Esse antagonismo pode ser devido ao fato de a resposta esperada (C_{esp}) ser ligeiramente maior (aproximadamente 8% a 11% maior) do que a resposta observada (C_{obs}) em todos os casos antagônicos verificados.

Tabela 3 - Porcentagem do efeito inibitório induzido por atrazina nanoencapsulada (nATZ), nanoplástico de poliestireno (nPPS) e suas misturas (nATZ + nPPS) na sobrevivência de *Daphnia magna* (48 h de exposição).

UT ^a	mg nATZ + nPPS L ^{-1b}	C _{obs} (%) ^c	nATZ (%) ^d	nPPS (%) ^e	C _{exp} (%) ^f	RI ^g	Interação
0,25	(0,57 + 32,70)	15	0	0	0	-	-
0,50	(1,15 + 65,40)	45	5	5	9,75	4,61	Sinérgico
0,75	(1,70 + 98,00)	50	10	25	32,50	1,54	Sinérgico
1,00	(2,30 + 130,80)	60	10	45	50,50	1,19	Sinérgico
1,25	(2,90 + 163,45)	65	20	50	60,00	1,08	Sinérgico
1,50	(3,40 + 196,15)	65	20	55	64,00	1,02	Sinérgico
1,75	(4,00 + 228,80)	70	30	55	68,50	1,02	Sinérgico
2,00	(4,60 + 261,50)	70	45	60	78,00	0,90	Antagônico
2,25	(5,10 + 294,20)	80	65	65	87,75	0,91	Antagônico
2,50	(5,70 + 326,80)	90	80	90	98,00	0,92	Antagônico

UT: Unidade tóxica; b: Concentrações equivalentes de nATZ misturada com nPPS em mg L⁻¹ para cada UT respectiva; c: Inibição observada induzida por nATZ + nPPS; d: Inibição induzida por nATZ; e: Inibição induzida por nPPS; f: Inibição esperada calculada pelo método de Abbott; g: Razão de inibição: Inibição observada / Inibição esperada.

Os testes de toxicidade aguda para avaliar os parâmetros de estresse oxidativo dos nanocontaminados individuais e em mistura foram realizados a partir da exposição dos microcrustáceos às CENO's, com os valores do teste agudo acima relatados (Figura 3). Os resultados da análise do estresse oxidativo são mostrados na Figura 4.

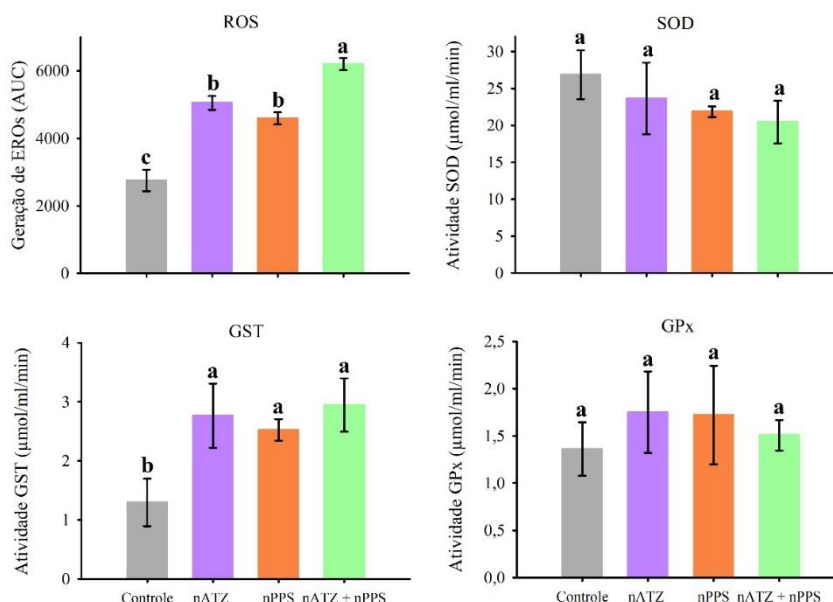


Figura 4 - Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), expressa como a área sob a curva (*Area under curve* – AUC). Atividade da superóxido dismutase (SOD), atividade da glutathione S-Transferase (GST) e atividade da glutathione peroxidase (GPx) ($\mu\text{mol/ml/min}$; barras $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) de *Daphnia magna* após 48 horas de exposição à atrazina nanoencapsulada (nATZ, $3,40 \text{ mg L}^{-1}$), nanoplastico de poliestireno (nPPS, $98,00 \text{ mg L}^{-1}$) e a mistura de nanocontaminantes ($0,57 + 32,70 \text{ mg nATZ} + \text{nPPS L}^{-1}$). Letras diferentes mostram diferenças estatísticas entre os tratamentos (teste de Tukey $p \leq 0,05$).

Houve um aumento significativo na produção de EROs para nATZ, nPPS e ainda mais pronunciado para nATZ + nPPS (Figura 4). A SOD e a GPx não sofreram alterações em suas atividades quando comparados os tratamentos e o controle. A atividade de GST foi aproximadamente duas vezes maior para os tratamentos com nATZ, nPPS e nATZ + nPPS, em relação ao controle.

3.3 TOXICIDADE CRÔNICA COM *D. magna*

Após 21 dias de exposição aos nanocontaminantes individuais e suas misturas, não foram observados efeitos letais de *D. magna*. Entretanto, a inibição do crescimento foi detectada em concentrações a partir de $0,0228 \text{ mg L}^{-1}$ para nATZ e $0,98 \text{ mg L}^{-1}$ para nPPS. Não foram observados efeitos sobre o crescimento das dáfias após a exposição à mistura nATZ + nPPS.

A reprodução foi afetada em termos de número de neonatos a partir de 0,00228 mg L⁻¹ para nATZ, 9,8 mg L⁻¹ para nPPS e 0,00228 + 0,098 mg L⁻¹ para a mistura nATZ + nPPS. Uma redução no número de posturas foi observada somente para a nATZ a partir de 0,228 mg L⁻¹.

Tabela 4 - Longevidade, crescimento, reprodução (número de neonatos e número de posturas) e comportamento de natação após teste de toxicidade crônica com microcrustáceos *Daphnia magna* expostos por 21 dias a concentrações crescentes de atrazina nanoencapsulada (nATZ), nanoplásticos de poliestireno (nPPS) e uma mistura de nATZ e nPPS (nATZ + nPPS). Os asteriscos (*) representam uma diferença significativa em comparação com o respectivo controle. Letras diferentes revelam diferença estatística entre os compostos individuais e a mistura para cada parâmetro analisado em cada coluna (média ± DP; n = 10, teste de Tukey, p ≤ 0,05).

Substância	Concentração (mg L ⁻¹)	Longevidade: sobrevivência (%)	Crescimento: comprimento (mm)	Número de neonatos	Número de posturas	Natação (cm)
Controle	0	90	3,73 ± 0,16	78,78 ± 3,34	5,44 ± 1,01	43,21 ± 6,86
nATZ	0,000228	90 a	3,46 ± 0,15 a	68,67 ± 3,36 a	5,67 ± 0,50 a	47,87 ± 12,37 a
	0,00228	90 a	3,40 ± 0,15 a	64,44 ± 3,99 a*	5,67 ± 0,50 a	35,20 ± 10,51 a
	0,0228	90 a	3,20 ± 0,15 a*	49,56 ± 3,73 a*	5,11 ± 1,17 a	18,19 ± 6,94 a*
	0,228	90 a	2,78 ± 0,17 a*	27,89 ± 5,07 b*	3,89 ± 0,93 b*	13,14 ± 5,65 a*
	CENO	n.e.	0,00228	0,000228	0,0228	0,00228
	CEO	>0,228	0,0228	0,00228	0,228	0,0228
nPPS	0,0098	100 a	3,50 ± 0,18 a	75,20 ± 3,02 a	5,80 ± 0,20 a	20,97 ± 8,34 b*
	0,098	90 a	3,59 ± 0,16 a	75,11 ± 3,12 a	5,67 ± 0,17 a	28,47 ± 5,49 b*
	0,98	90 a	3,12 ± 0,16 a*	69,56 ± 2,39 a	5,78 ± 0,15 a	53,68 ± 6,42 c*
	9,8	90 a	3,13 ± 0,07 a*	56,00 ± 3,53 a*	4,89 ± 0,20 a	55,82 ± 8,45 c*
	CENO	n.e.	0,098	0,98	n.e.	<0,0098
	CEO	>9,8	0,98	9,8	>9,8	0,0098
nATZ + nPPS	0,000228 + 0,0098	100 a	3,69 ± 0,30 a	72,88 ± 7,57 a	5,44 ± 0,88 a	48,13 ± 12,16 a
	0,00228 + 0,098	100 a	3,45 ± 0,48 a	66,40 ± 7,83 a*	5,80 ± 0,63 a	48,40 ± 8,62 a
	0,0228 + 0,98	100 a	3,72 ± 0,37 a	57,20 ± 8,89 a*	5,80 ± 0,42 a	34,04 ± 9,23 b
	0,228 + 9,80	100 a	3,30 ± 0,38 a	46,00 ± 7,64 b*	5,00 ± 0,47 a	32,94 ± 13,37 b
	CENO	n.e.	n.e.	<0,000228	n.e.	n.e.
	CEO	>0,228 + 9,80	>0,228 + 9,80	0,00228	>0,228 + 9,80	>0,228 + 9,80

CENO - Maior concentração em que efeito não foi observado.

CEO -Menor concentração em que efeito foi observado.

n.e. – Não estimado.

Concentrações crescentes de nATZ resultaram em uma redução na distância de natação percorrida pelos indivíduos após 21 dias de exposição ao contaminante, com uma diferença significativa a partir da concentração de $0,0228 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 5). Para o nPPS, os efeitos na trajetória de natação já foram observados na menor concentração testada ($0,0098 \text{ mg L}^{-1}$), evidenciados por uma redução significativa na distância média percorrida. Entretanto, com o aumento das concentrações de nPPS, observou-se um aumento nas distâncias percorridas pelos indivíduos. Nos tratamentos com a mistura de nATZ + nPPS, foi observada uma leve redução na distância percorrida nas duas concentrações mais altas, mas essas alterações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo de controle. Para todas as combinações de concentrações das misturas, a distância percorrida na natação diferiu significativamente do nPPS e do nATZ isoladamente.

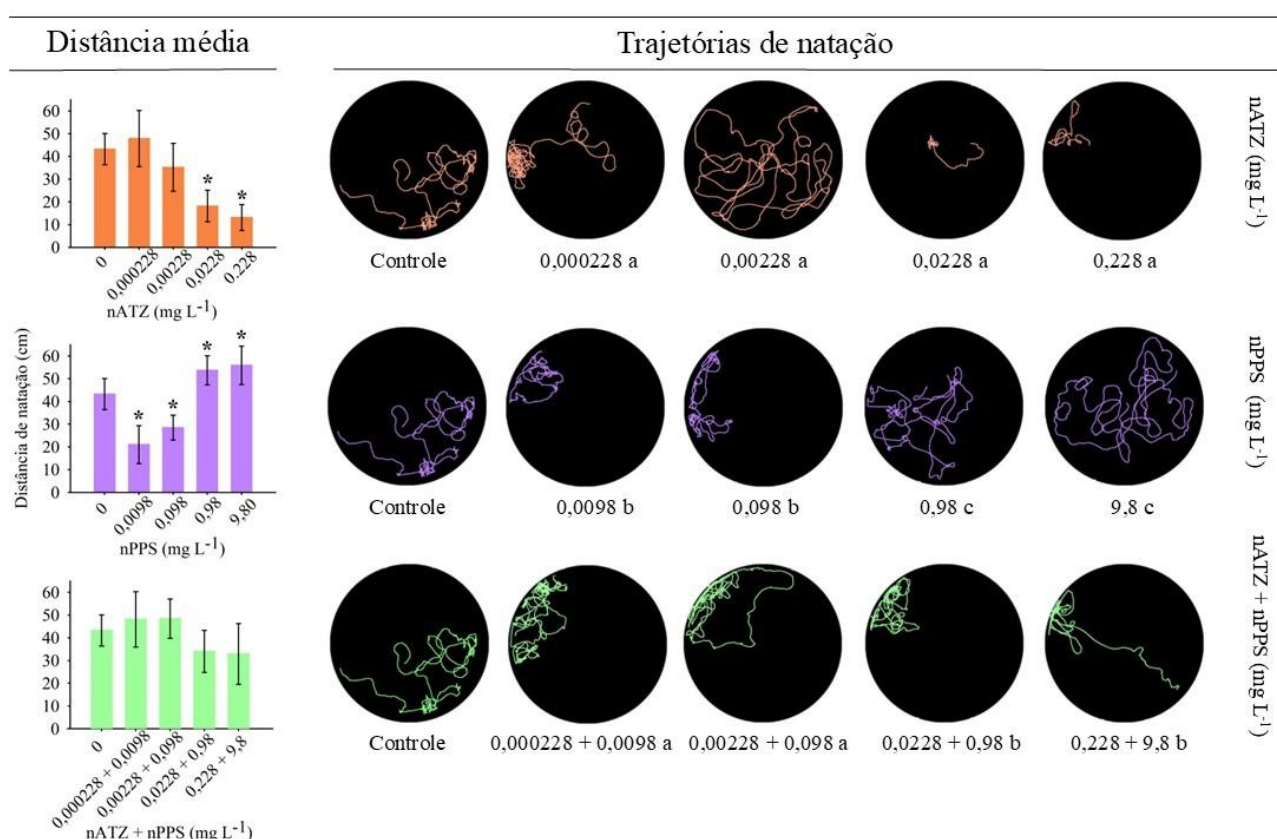


Figura 5 - Trajetórias de natação (cm; barras $\pm$ desvio padrão, $n = 10$) após o teste de toxicidade crônica com microcrustáceos *Daphnia magna* expostos por 21 dias a concentrações crescentes de atrazina nanoencapsulada (nATZ), nanoplásticos de poliestireno (nPPS) e misturas de nATZ e nPPS (nATZ + nPPS). Os asteriscos (*) representam uma diferença estatisticamente significativa em comparação com o respectivo controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$). Letras diferentes revelam diferença estatística entre os compostos individuais e a respectiva mistura (teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Os testes de estresse oxidativo conduzidos após a exposição crônica (Figura 6) mostraram um aumento nas atividades de SOD e GST à medida que as concentrações individuais de nATZ e nPPS aumentaram. Para a mistura nATZ + nPPS, foi observado um aumento nas atividades das respectivas enzimas nas concentrações iniciais, seguido de uma queda abrupta nas concentrações mais altas. A atividade da GPx diminuiu gradualmente com o aumento da concentração de nATZ, enquanto para o nPPS e a mistura nATZ + nPPS, houve um aumento inicial seguido de um declínio. Mas estas inferências precisam ser feitas com cautela, pois a falta de réplicas adicionais impossibilitou a análise estatística comparativa entre os tratamentos.

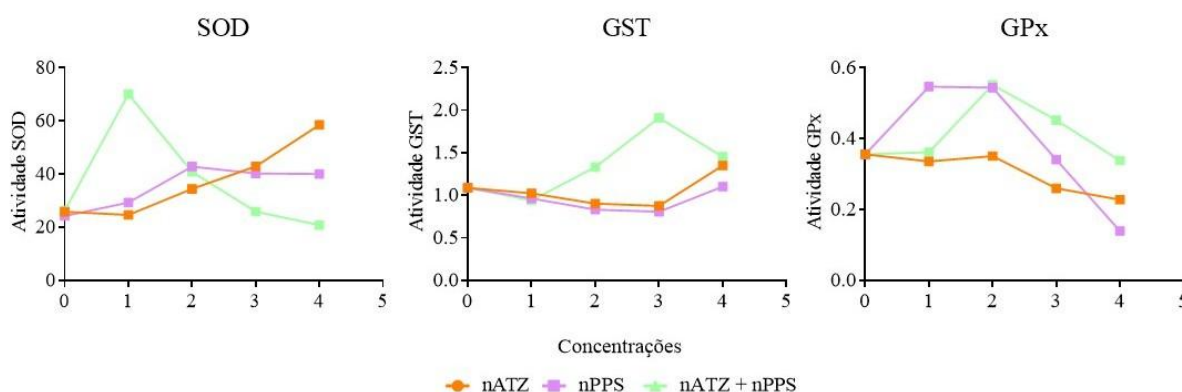


Figura 6 - Atividade da superóxido dismutase (SOD), atividade da glutathione S-transferase (GST) e atividade da glutathione peroxidase (GPx) (área sob a curva; $n = 1$) de *Daphnia magna* após 21 dias de exposição a concentrações crescentes de atrazina nanoencapsulada (nATZ), nanoplastico de poliestireno (nPPS) e a mistura dos nanocontaminantes (nATZ + nPPS).

3.4 TESTES DE TOXICIDADE COM *A. fischeri*

As concentrações efetivas de 50% (CE_{50}) de nATZ, nPPS e da mistura de nATZ + nPPS em *A. fischeri* são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações efetivas de 50% (CE₅₀) que inibiram a bioluminescência de *Aliivibrio fischeri* após 15 minutos de exposição a concentrações crescentes de atrazina nanoencapsulada (nATZ), nanoplasticos de poliestireno (nPPS) e a mistura de ambos (nATZ + nPPS). Os valores foram estimados usando modelos de regressão não linear (modelo logístico; média $\pm$ SD; n = 2).

Substância	FD ₅₀ (%)	CE ₅₀ (mg L ⁻¹)
nATZ	13,40 $\pm$ 0,28	0,44 $\pm$ 0,01
nPPS	15,29 $\pm$ 1,22	34,10 $\pm$ 2,72
nATZ + nPPS	16,05 $\pm$ 1,03	0,53 $\pm$ 0,03 (nATZ) + 35,79 $\pm$ 2,30 (nPPS)

FD – Fator de diluição.

CE₅₀ – Concentração que causou redução de 50% na bioluminescência das bactérias.

A concentração de nATZ presente na mistura que causou uma redução de 50% na bioluminescência de *A. fischeri* foi 1,20 vezes maior do que a observada no teste com nATZ isoladamente. Por outro lado, a concentração de nPPS na mistura foi semelhante à verificada na exposição individual, indicando que sua toxicidade permaneceu praticamente inalterada na combinação.

4 DISCUSSÃO

Tanto o nATZ quanto o nPPS, isoladamente ou em mistura, apresentaram boa estabilidade relativa nos meios de exposição, conforme demonstrado pelos valores de PZ (Tabela 2). A estabilidade de uma suspensão de nanopartículas pode ser influenciada por diversos fatores, como forças de van der Waals e interações eletrostáticas, sendo determinada pelas propriedades físico-químicas específicas das partículas e pelas características do meio em que estão inseridas (Baun et al., 2017). Fatores como outras forças intermoleculares e a dureza do meio também podem influenciar a cinética de aglomeração (Lee et al., 2016). Em suspensão, as nanopartículas tendem a se aglomerar, especialmente quando o PZ está abaixo de -30 mV (em módulo), o que favorece a formação da dupla camada elétrica. Isso provavelmente ocorreu nas exposições com nATZ, particularmente em NaCl (1%, para *A. fischeri*), o que também é evidenciado pelo aumento do DH (Tabela 2). Valores de PZ mais elevados, em módulo, indicam maior repulsão eletrostática entre as partículas, promovendo maior estabilidade coloidal (Castanha et al., 2023).

Efeitos significativos de mortalidade sobre *D.magna* causados pela exposição ao nATZ foram observados a partir da concentração de 4 mg L⁻¹, valor próximo ao CE₅₀ determinado no presente estudo: 4,403 (3,537 – 5,482) mg L⁻¹. Estudos anteriores, como o conduzido por Clemente et al. (2014) com *D. similis* e por Castanha et al. (2023) com *D. magna*, encontraram valores de CE₅₀ variando entre 5,22 e 14,04 mg L⁻¹, consistentes com os observados neste trabalho. Para o nPPS, efeitos letais foram observados a partir da concentração de 130,75 mg L⁻¹, com CE₅₀ estimado em 266,5 (251,8 – 282,0) mg L⁻¹. Esse resultado também está em concordância com a literatura, sendo compatível com valores de CE₅₀ previamente reportados, os quais variam entre 199 e 294,4 mg L⁻¹ (Vicentini et al., 2019; Nogueira et al., 2022; Bandeira et al., 2025).

Os valores de CE₅₀ dos contaminantes individuais, concentrações consideradas elevadas em relação à sua presença no ambiente (45 - 300 ng L⁻¹ para atrazina em corpos d'água superficiais e ≤ 10 µg L⁻¹ para nPPS; Albuquerque et al., 2021; Lenz et al., 2016), possivelmente causaram danos aos sistemas imunológicos dos organismos, representados pelos efeitos de estresse oxidativo gerados já na exposição às concentrações correspondentes aos valores de CENO (Figura 4). Neste estudo, os valores de CENO para os nanocontaminantes individuais foram suficientes para induzir alterações em parâmetros de estresse oxidativo em *D. magna*, conforme evidenciado pelo aumento na geração de EROs e na atividade da enzima GST (Figura 4). A nATZ pode ter interferido nos processos mitocondriais dos organismos, favorecendo o acúmulo de EROs (Karadayian et al., 2022; Husak et al., 2022). Já os nPPS podem ter causado danos às membranas celulares, levando à desregulação do metabolismo e ao aumento da produção de EROs (Liu et al., 2021), o que potencializa o estresse oxidativo. A resposta no aumento da atividade da GST, uma enzima de fase II do sistema de detoxificação, responsável por conjugação de xenobióticos com glutathione reduzida, representa uma tentativa de defesa celular contra a presença de compostos potencialmente tóxicos (Hayes et al., 2005). Essa resposta pode estar relacionada à prevenção da peroxidação lipídica, que, embora não tenha sido medida neste estudo, é uma consequência comum da geração excessiva de EROs.

Quanto às atividades das enzimas SOD e GPx, que se mantiveram estáveis (Figura 4), é possível que os níveis de toxicidade causados pelas concentrações equivalentes aos valores de CENO dos contaminantes individuais (3,40 mg L⁻¹ para nATZ e 98,00 mg L⁻¹ para nPPS) não tenham sido suficientes para induzir a ativação da conversão do ânion superóxido (O₂⁻) em H₂O₂, catalisada pela SOD. No caso da GPx, sua manutenção em níveis basais pode ter sido

suficiente para controlar as EROs geradas, especialmente com o suporte funcional da GST, sem a necessidade de aumento em sua atividade.

Efeitos letais decorrentes da exposição combinada dos microcrustáceos à mistura nATZ + nPPS foram observados já na segunda menor combinação de concentrações testadas (0,5 UT; 1,15 + 65,40 mg nATZ + nPPS L⁻¹), embora essa concentração, quando testada individualmente para cada composto, não tenha causado efeitos letais significativos (Figura 3). A análise pelo método de Abbott (Tabela 3) revelou um efeito sinérgico predominante para os tratamentos em mistura avaliados (de 0,5 a 1,75 UT), indicando que a toxicidade combinada dos nanocontaminantes é maior do que a toxicidade observada para cada composto isoladamente. Esse sinergismo também foi evidente na produção de EROs, com um aumento significativo na sua geração quando os microcrustáceos foram expostos à CENO combinada de nATZ e nPPS, em comparação com os tratamentos controle e as CENOs dos contaminantes individuais. Esse aumento pode estar associado à maior produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radicais hidroxila e ânions superóxido, conforme sugerido por Gao et al. (2018) (Figura 4).

Estudos recentes também demonstraram efeitos sinérgicos entre a atrazina e partículas plásticas, como micro e nanoplásticos, resultando em maior toxicidade para diferentes organismos. Wang et al. (2023) observaram que a coexposição de *C. elegans* a 2-hidroxiatrazina (1 µg L⁻¹), um dos principais metabólitos da atrazina, e nPPS (10 µg L⁻¹) afetou a locomoção e causou degeneração de neurônios motores, sugerindo que a 2-hidroxiatrazina potencializou a toxicidade dos nPPS. Em *E. fetida*, a mistura de microplásticos envelhecidos com atrazina (2 mg kg⁻¹) aumentou a geração de EROs e reduziu a atividade das enzimas antioxidantes SOD, GST e catalase (CAT; Cheng et al., 2020). Em peixes *Piaractus mesopotamicus*, a coexposição a microplásticos de polietileno (0,1% m/m na dieta) e atrazina (100 µg L⁻¹) resultou em alterações histológicas nas brânquias e fígado, além de maior atividade enzimática (CAT, GST, acetilcolinesterase - AChE e butirilcolinesterase - BChE) em comparação às exposições isoladas (Curi et al., 2024). Zeng et al. (2025) relataram maior toxicidade da atrazina em *Danio rerio* quando combinada com micro e nanopoliestireno, especialmente os bioenvelhecidos, reduzindo significativamente a concentração letal para 50% dos organismos expostos (CL₅₀atrazina = 1,577 mg L⁻¹ vs. CL₅₀mistura = 1,024 mg L⁻¹).

Os efeitos sinérgicos observados na combinação dos contaminantes são provavelmente decorrentes da capacidade dos plásticos em adsorver a atrazina, atuando como carreadores do herbicida, associada ao aumento da reatividade superficial dos nPPS durante a coexposição, o

que pode intensificar a toxicidade para os organismos expostos (Khoshnamvand et al., 2024; Zeng et al., 2025). Efeitos semelhantes já foram observados na combinação de nanoplásticos com nanopesticidas, como no caso de nPPS combinados com nanopermetrina, que resultaram em efeitos sinérgicos de toxicidade no crustáceo *Artemia salina*, evidenciados pelo aumento da mortalidade e da produção de EROs, em relação aos contaminantes individuais (Kamalakkannan et al., 2024).

Quanto à exposição crônica de *D. magna* à nATZ, embora o parâmetro longevidade não tenha sido tão afetado pelo aumento das concentrações (Tabela 4), os parâmetros de crescimento e reprodução mostraram-se bastante sensíveis ao nanopesticida. Isso indica que concentrações crescentes de nATZ podem resultar em efeitos tóxicos mais intensos nos organismos expostos. Para uma concentração de 0,0228 mg L⁻¹, recomendada na bula de produtos comerciais à base de atrazina para aplicação em campo (Folheto Atrazina Nortox 500 SC), foram observados efeitos de inibição do crescimento nos indivíduos. Já na concentração de 0,00228 mg L⁻¹, semelhante a concentrações de atrazina já encontradas em águas superficiais nos EUA (Glinski et al., 2018; Hansen et al., 2019), China (Tan et al., 2020), Brasil (Della-Flora et al., 2019) e Suíça (Buser et al., 1990), houveram reduções significativas na reprodução de *D. magna* em comparação ao controle, revelando um alto risco ambiental que pode comprometer diferentes níveis tróficos e o ecossistema.

Além da exposição direta de *D. magna* à nATZ, que pode ter induzido estresse oxidativo, conforme observado na exposição aguda (Figura 4), uma possível explicação para a redução nos parâmetros de crescimento e reprodução pode estar relacionada à contaminação do alimento fornecido durante o experimento, a microalga *S. subspicatus*. Por ser fotossensível, a microalga provavelmente sofreu os efeitos tóxicos do nATZ presente no meio. O nATZ inibe a fotossíntese em organismos fotossensíveis ao bloquear o transporte de elétrons no fotossistema II, reduzindo a produção de ATP e NADPH, essenciais para a fixação de carbono e o crescimento celular de microalgas e plantas (Calvo et al., 2025). Como resultado, o nATZ compromete não apenas o crescimento e a viabilidade da microalga como alimento, mas também pode causar impactos nos organismos consumidores, como *D. magna*. Religia et al. (2019) observaram que *D. magna* alimentada com *Raphidocelis subcapitata* exposta à atrazina (150 µg L⁻¹) apresentou dinâmica populacional alterada, principalmente devido à ocorrência de neonatos inviáveis.

Foi observado um aumento na toxicidade de nPPS para *D. magna* com o aumento das concentrações, especialmente no parâmetro de crescimento, que apresentou efeitos negativos

significativos já a partir da concentração de 0,98 mg L⁻¹. Além dos impactos no crescimento, também foi constatado um efeito negativo na reprodução, com uma redução de aproximadamente 1,5 vez no número de juvenis produzidos na maior concentração testada (9,80 mg L⁻¹), em comparação ao grupo controle. Esse efeito pode estar associado à toxicidade inerente dos nPPS para *D. magna*, sobretudo considerando as concentrações substancialmente elevadas utilizadas neste estudo, as quais possuem baixa relevância ambiental (geralmente $\leq 10 \mu\text{g L}^{-1}$; Lenz et al., 2016). A ingestão dessas altas concentrações de nPPS pode causar toxicidade devido à presença de impurezas, como o monômero de estireno, um composto potencialmente tóxico utilizado na sua síntese (Ma et al., 2016). O impacto na reprodução e no crescimento dos microcrustáceos também pode estar relacionado à difusão das nanopartículas para dentro das células, potencialmente causando danos fisiológicos, conforme observado para outros nanomateriais, como os nanotubos de carbono (Petersen et al., 2009).

Quando as *D. magna* foram expostas a mistura dos nanocontaminantes nATZ + nPPS, não foram observadas diferenças significativas na longevidade, crescimento, número de posturas e comportamento de natação entre as diferentes combinações de misturas e o controle (Tabela 4; Figura 5). Ao comparar os efeitos causados pela mistura com os efeitos causados pelos componentes individuais, foram observadas diferenças apenas no número de neonatos gerados e no comportamento de natação.

Foi observada uma redução significativa na reprodução a partir da segunda menor combinação de concentrações dos nanocontaminantes (0,00228 + 0,098 mg de nATZ + nPPS L⁻¹; Tabela 4). Essa concentração de nATZ corresponde ao valor de CEO detectado na exposição individual (0,00228 mg L⁻¹), indicando que a nATZ pode ser o principal agente tóxico da mistura. Além disso, os efeitos na produção de neonatos em todas as combinações testadas de nATZ + nPPS não diferiram estatisticamente dos efeitos observados nas concentrações equivalentes de nATZ isoladamente. Esses resultados sugerem que, em termos de reprodução, a toxicidade da mistura foi semelhante à exposição individual ao nATZ, possivelmente devido à interferência desse composto na disponibilidade ou qualidade do alimento para *D. magna*, impactando o metabolismo e a reprodução dos organismos (Religia et al., 2019). Além disso, já foram relatadas anormalidades embrionárias, como gastrulação interrompida e estruturas subdesenvolvidas, incluindo espinhos e antenas, em *D. magna* após exposição à atrazina. Esses efeitos provavelmente se devem à ação antagonista da atrazina sobre a 20-hidroxiecdisona, um hormônio essencial para o desenvolvimento embrionário adequado e para a regulação reprodutiva dessa espécie (LeBlanc, 2007; Palma et al., 2009).

Essas anormalidades embrionárias e fisiológicas, provavelmente induzidas pela exposição ao nATZ, também podem ter impactado o comportamento de natação de *D. magna* (Figura 5). O aumento das concentrações de nATZ resultou em uma redução na trajetória de natação após 21 dias de exposição, com uma diminuição estatisticamente significativa observada a partir da concentração de 0,00228 mg L⁻¹.

A correlação entre o estresse oxidativo e os efeitos nos parâmetros de crescimento e reprodução de *D. magna* reforça o papel central das EROs na toxicidade induzida pela nATZ e pela mistura nATZ + nPPS. O aumento das atividades das enzimas SOD e GST indica ativação das defesas antioxidantes frente à sobreprodução de EROs, como H₂O₂ e radicais hidroxila. O desequilíbrio redox gerado pode ter comprometido a integridade celular e o metabolismo energético, resultando em menor crescimento e redução da reprodução (Karadayian et al., 2022; Husak et al., 2022). Além disso, a disfunção mitocondrial e o dano oxidativo podem alterar processos neurofisiológicos, refletindo em anormalidades comportamentais, como a redução da natação observada (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013; Lovern et al., 2007). Assim, os resultados sugerem que o estresse oxidativo atua como um dos principais mecanismos de toxicidade da nATZ, individualmente ou em mistura com nPPS, afetando múltiplos níveis biológicos em *D. magna*.

A exposição de *D. magna* a concentrações crescentes de nPPS causou efeitos adversos na locomoção. Em concentrações mais baixas (0,0098 e 0,098 mg L⁻¹) houve uma redução na distância percorrida, possivelmente devido à interferência física das nanopartículas aderidas à carapaça e aos apêndices locomotores, alterando a hidrodinâmica, a percepção sensorial e a resposta motora de *D. magna* (Vicentini et al., 2019). Por outro lado, nas demais concentrações (0,98 e 9,8 mg L⁻¹), foram observadas distâncias percorridas maiores do que no grupo controle, o que pode estar relacionado a uma resposta comportamental de excitação ou tentativa de fuga, na qual o organismo tenta se livrar do excesso de partículas aderidas à sua superfície. Estudos com outros tipos de nanopartículas (dióxido de titânio, nano-C60 e C60HxC70Hx) também relataram comportamentos de fuga e padrões irregulares de natação, sugerindo que a presença dessas partículas pode induzir respostas de defesa, levando a um aumento no gasto energético e à alteração dos padrões normais de movimento (Lovern et al., 2007). Para a mistura de nanocontaminantes, não foi observado nenhum efeito tóxico sinérgico aparente, uma vez que o nATZ isoladamente causou um impacto maior do que a exposição combinada.

As alterações nos parâmetros de natação podem estar associados ao estresse oxidativo causado pela exposição prolongada, potencialmente comprometendo a função neuromuscular.

Após 21 dias, o aumento das concentrações de nATZ levou à elevação das atividades das enzimas SOD e GST (Figura 6), assim como o que foi observado para a exposição aguda (Figura 4), indicando uma ativação das defesas antioxidantes induzida por EROs. Em contrapartida, a atividade da GPx diminuiu, provavelmente devido à inibição causada pelas EROs ou pela depleção de cofatores, como o H_2O_2 ou GSH (Brigelius-Flohé e Maiorino, 2013). A exposição ao nPPS também aumentou as atividades de SOD e GST com o aumento da concentração, sugerindo um estresse oxidativo moderado. A GPx apresentou uma resposta hormética, com aumento da atividade em baixas concentrações e redução em concentrações mais elevadas, indicando uma resposta adaptativa inicial seguida de sobrecarga oxidativa. A exposição combinada da nATZ + nPPS promoveu aumento da atividade das enzimas antioxidantes em baixas concentrações, mas redução da atividade em concentrações mais elevadas, sugerindo uma resposta sinérgica inicial seguida de inibição enzimática. Efeitos sinérgicos semelhantes já foram relatados para a mistura de nPPS e nanopesticidas. Kamalakannan et al. (2024) observaram que nPPS + nanopermetrina aumentou as atividades de SOD e CAT em relação à exposição aos contaminantes individualmente. Khoshnamvand et al. (2024) relataram aumento na atividade de biomarcadores de estresse oxidativo em *Chlorella vulgaris* exposta a misturas de nPPS + atrazina, e Zeng et al. (2025) observaram interações semelhantes no fígado e intestino de zebrafish após a exposição a microplásticos de poliestireno + atrazina.

Os efeitos dos contaminantes individuais e combinados também foram avaliados sobre *A. fischeri* (Tabela 5). A toxicidade observada para a mistura nATZ + nPPS pareceu se assemelhar à do nPPS isoladamente, como indicado pelos valores de $CE_{50} = 34,10 \text{ mg L}^{-1}$ para nPPS e $0,53 + 35,79 \text{ mg L}^{-1}$ para nATZ + nPPS. Martín et al. (2021) avaliaram que $15 \text{ } \mu\text{M}$ de simazina ($\sim 3 \text{ mg L}^{-1}$), um herbicida triazínico similar à atrazina, causou 100% de inibição da bioluminescência de *A. fischeri*. No entanto, ao combinar $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ de microplásticos de polietileno com $15 \text{ } \mu\text{M}$ de simazina, foi observada uma inibição significativamente menor de $38,75 \pm 5,11\%$, sugerindo uma possível interação antagônica entre o herbicida e os microplásticos. Segundo os autores, as partículas em escala micrométrica contribuíram para a retenção da simazina, reduzindo sua biodisponibilidade. Além disso, o tamanho relativamente grande das partículas de plástico pode ter limitado a capacidade de absorção do micropoluentes por *A. fischeri*, contribuindo para o efeito antagônico observado (Rillig et al., 2019; Martín et al., 2021). Embora esse comportamento não tenha sido reproduzido no presente estudo, os resultados reforçam a complexidade das interações entre múltiplos contaminantes. A presença de um segundo composto pode atenuar, potencializar ou modificar a toxicidade total,

dependendo das características físico-químicas dos contaminantes, das condições experimentais e da sensibilidade da espécie testada.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que nATZ e nPPS, mesmo em baixas concentrações, causam efeitos tóxicos significativos em *D. magna*, afetando seu crescimento, reprodução e contribuindo para o estresse oxidativo. Além disso, a combinação desses dois contaminantes potencializa esses efeitos, evidenciando riscos ambientais ainda maiores em cenários de exposição combinada para os microcrustáceos. Os resultados obtidos com *A. fischeri* também reforçam a toxicidade desses compostos, especialmente do nPPS, demonstrando alterações na atividade bioluminescente frente à exposição individual e combinada aos nanocontaminantes. Esses impactos podem comprometer a dinâmica populacional e a estabilidade dos ecossistemas aquáticos, ressaltando a importância de avaliações integradas e do controle rigoroso desses poluentes emergentes.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265–267, 1925.

ALBUQUERQUE, F. P. et al. Use of nontarget organism *Chironomus sancticarloi* to study the toxic effects of nanoatrazine. **Ecotoxicology**, v. 30, p. 733–750, 2021.

ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 1596–1605, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15411-3: Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de *Vibrio fischeri* - Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. Rio de Janeiro, 2022.

ATRazina Nortox 500 SC. Disponível em:

https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/atrazina-nortox-500-sc_2934.html. Acesso em: 2 maio 2025.

BAUN, A. et al. Regulatory relevant and reliable methods and data for determining the environmental fate of manufactured nanomaterials. **NanoImpact**, v. 8, p. 1–10, 2017.

BANDEIRA, F. O. et al. Locomotion behavior testing as a complementary tool in Collembola avoidance assays with neurotoxic insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 124374–124381, 2023.

BANDEIRA, F. O. et al. Individual and combined toxicity of polystyrene nanoplastics and clothianidin toward *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 470–483, 2025.

BOMBO, A. B. et al. A mechanistic view of interactions of a nanoherbicide with target organism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 4453–4462, 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3289–3303, 2013.

CAIXETA OLIVEIRA, H. et al. Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. **PLoS ONE**, v. 10, e0132971, 2015.

CALVO, B. O. et al. Evaluating photosystem II efficiency in *Parachlorella kessleri* under atrazine exposure using chlorophyll a fluorescence analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 267, 2025.

CASTANHA, R. F. Ecotoxicity studies of two atrazine nanoformulations: From the evaluation of stability in media to the effects on aquatic organisms. **Environmental Pollution**, v. 335, 2023.

CHENG, Y. et al. Combined effects of mulch film derived microplastics and atrazine on oxidative stress and gene expression in earthworm (*Eisenia fetida*). **Science of the Total Environment**, v. 746, 2020.

CHISLOCK, M. F. et al. Do high concentrations of microcystin prevent *Daphnia* control of phytoplankton? **Water Research**, v. 47, n. 6, p. 1961–1970, 2013.

CLEMENTE, Z. et al. Ecotoxicological evaluation of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules containing triazine herbicides. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 13, p. 11–17, 2014.

CURI, L. M. et al. A realistic combined exposure scenario: effect of microplastics and atrazine on *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, p. 29794–29810, 2024.

DELLA-FLORA, A. et al. Comprehensive investigation of pesticides in Brazilian surface water by high resolution mass spectrometry screening and gas chromatography–mass spectrometry quantitative analysis. **Science of the Total Environment**, v. 669, p. 248–257, 2019.

FESSI, H. et al. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **Brevet Européen**, 1988.

FESSI, H. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989.

FERREIRA-CRAVO, M. et al. Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). **Chemosphere**, v. 66, n. 7, p. 1364–1374, 2007.

GLINSKI, D. A. et al. Analysis of pesticides in surface water, stemflow, and throughfall in an agricultural area in South Georgia, USA. **Chemosphere**, v. 209, p. 496–507, 2018.

GRILLO, R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: physicochemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231–232, p. 1–9, 2012.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 398–405, 1981.

HANSEN, S. P. et al. Mitigating the risk of atrazine exposure: Identifying hot spots and hot times in surface waters across Nebraska, USA. **Journal of Environmental Management**, v. 250, 2019.

HAYES, J. D. et al. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 51–88, 2005.

HENNIG, T. B. et al. A systematic review of the toxic effects of a nanopesticide on non-target organisms: estimation of protective concentrations using a species sensitivity distribution (SSD) approach – the case of atrazine. **Science of the Total Environment**, 2023.

HORTON, A. A. et al. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 127–141, 2017.

HUSAK, V. et al. Low-toxic herbicides Roundup and Atrazine disturb free radical processes in *Daphnia* in environmentally relevant concentrations. **EXCLI Journal**, v. 21, p. 595–609, 2022.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6341**: Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Geneva, 2012.

KAMALAKANNAN, M. et al. Synergistic impact of nanoplastics and nanopesticides on *Artemia salina* and toxicity analysis. **Nanoscale Advances**, v. 12, 2024.

- KARADAYIAN, A. G. et al. Mitochondrial dysfunction due to in vitro exposure to atrazine and its metabolite in striatum. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 37, n. 1, 2023.
- KHOSHNAMEVAND, M. et al. Alleviating binary toxicity of polystyrene nanoplastics and atrazine to *Chlorella vulgaris* through humic acid interaction: Long-term toxicity using environmentally relevant concentrations. **Chemosphere**, v. 358, 2024.
- LEE, B. et al. Bioaccumulation and in-vivo dissolution of CdSe/ZnS with three different surface coatings by *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 143, p. 115–122, 2016.
- LEBLANC, G. A. Crustacean endocrine toxicology: a review. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 61–81, 2007.
- LEITE, A. R. Individual and combined toxicity of personal care products and pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations due to chronic exposure of the freshwater microcrustacean *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 282, 2025.
- LENZ, R. et al. Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016.
- LIU, Z. et al. Polystyrene nanoplastic induces oxidative stress, immune defense, and glycometabolism change in *Daphnia pulex*: Application of transcriptome profiling in risk assessment of nanoplastics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, 2021.
- LOVERN, S. B. et al. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 12, 2007.
- LU, S. et al. Preparation of magnetic polymeric composite nanoparticles by seeded emulsion polymerization. **Materials Letters**, v. 63, n. 9-10, p. 770-772, 2009.
- MA, H. et al. Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 166-173, 2016.
- MARTÍN, C. et al. Bioassays to assess the ecotoxicological impact of polyethylene microplastics and two organic pollutants, simazine and ibuprofen. **Chemosphere**, v. 274, 2021.
- NIZZETTO, L. et al. Are agricultural soils dumps for microplastics of urban origin? **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 10777-10779, 2016.
- NOGUEIRA, D. J. et al. Individual and combined multigenerational effects induced by polystyrene nanoplastic and glyphosate in *Daphnia magna* (Strauss, 1820). **Science of the Total Environment**, v. 811, 2022.
- OLIVEIRA, H. C. et al. Nanoencapsulation enhances the post emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. **PLOS ONE**, v. 10, e0132971, 2015.
- PALMA, J. M. et al. Plant catalases as NO and H₂S targets. **Redox Biology**, 2020.

PAOLETTI, F. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 209-220, 1990.

PETERSEN, E. J. et al. Biological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 8, 2009.

PINTAR, A. et al. Toxicity to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* of Kraft bleach plant effluents treated by catalytic wet-air oxidation. **Water Research**, v. 38, n. 2, p. 289-300, 2004.

PLASTICSEUROPE. Plastics - the Facts, 2023. Disponível em: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/>. Acesso em: 2 maio 2025.

RILLIG, M. C. Microplastic effects on plants. **New Phytologist**, v. 223, n. 3, 2019.

RELIGIA, P. et al. Atrazine exposed phytoplankton causes the production of non-viable offspring on *Daphnia magna*. **Marine Environmental Research**, v. 145, p. 177-183, 2019.

SOUSA, B. T. et al. Effectiveness of nanoatrazine in post-emergent control of the tolerant weed *Digitaria insularis*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 60, p. 185–192, 2020.

TAKESHITA, V. et al. Foliar absorption and field herbicidal studies of atrazine-loaded polymeric nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 418, p. 126350, 2021.

TAN, H. et al. Pesticide residues in agricultural topsoil from the Hainan tropical riverside basin: Determination, distribution, and relationships with planting patterns and surface water. **Science of the Total Environment**, v. 722, 2020.

WANG, Y. et al. Combinational exposure to hydroxyatrazine increases neurotoxicity of polystyrene nanoparticles on *Caenorhabditis elegans*. **Science of the Total Environment**, v. 880, 2023.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-333, 1981.

ZENG, Z. et al. Toxic effects of polystyrene microplastics on atrazine in zebrafish: Exogenous toxicity and endogenous mechanism. **Environmental Pollution**, v. 379, 2025.

4.4 CAPÍTULO IV – Quais as concentrações protetivas de um nanopesticida para espécies não-alvo? Abordagem da curva de distribuição da sensibilidade das espécies para a nanoatrazina

RESUMO

A atrazina é um herbicida amplamente utilizado na agricultura, cuja elevada mobilidade e persistência ambiental geram riscos significativos para organismos aquáticos não-alvo. A nanoatrazina (nATZ) tem sido proposta como alternativa para aumentar a eficiência agrônômica e reduzir impactos ambientais. No entanto, seu perfil de risco ainda é pouco conhecido. Este estudo teve como objetivo estimar as concentrações protetivas (CPs) da nATZ para organismos aquáticos, utilizando a abordagem da curva de distribuição da sensibilidade das espécies (curva SSD). A curva SSD foi construída a partir de dados obtidos na literatura e em experimentos laboratoriais com onze espécies. Os resultados indicaram que *Raphidocelis subcapitata*, *Aliivibrio fischeri* e *Lemna minor* foram as espécies mais sensíveis, enquanto *Lactuca sativa*, *Enchytreus crypticus* e *Pseudokirchneriella subcapitata* se mostraram menos sensíveis. A CP₉₅ estimada (0,15 ppm) foi suficiente para proteger todas as espécies avaliadas, enquanto a CP₅₀ (8,86 ppm) garantiu proteção apenas às espécies *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *L. sativa*, *E. crypticus* e *P. subcapitata*. A alta sensibilidade de organismos fotossintetizantes reflete o modo de ação do herbicida, enquanto a menor sensibilidade de espécies de solo pode estar relacionada à baixa biodisponibilidade da nATZ nesse compartimento. Comparações com concentrações ambientais indicam que, mesmo com a redução na dose agrícola devido à nanotecnologia, a nATZ ainda representa risco ecotoxicológico para a maioria das espécies aquáticas não-alvo.

Palavras-chave: Nanoatrazina; Espécies-chave; Curva SSD; Avaliação de risco.

1 INTRODUÇÃO

A atrazina é um herbicida amplamente utilizado no controle de plantas daninhas, especialmente em culturas como milho e cana-de-açúcar. No entanto, sua elevada mobilidade no solo e persistência ambiental têm levantado preocupações quanto à contaminação de corpos

d'água e à toxicidade para organismos aquáticos não-alvo (Solomon et al., 1996; Graymore et al., 2001). Como alternativa, a nanotecnologia tem sido explorada para desenvolver formulações mais eficientes e ambientalmente seguras. A nanoatrazina (nATZ), uma versão nanoencapsulada da atrazina, visa aumentar a eficácia do princípio ativo, reduzir sua liberação descontrolada no ambiente e, potencialmente, minimizar seus efeitos ecotoxicológicos adversos (Grillo et al., 2012; Kah et al., 2013).

Estudos demonstram que a nATZ pode ser até dez vezes mais eficaz no controle de espécies vegetais invasoras quando comparada à formulação convencional (Takeshita et al., 2021). No entanto, o comportamento ecotoxicológico dessa formulação ainda é pouco investigado, especialmente no que diz respeito à exposição crônica e subletal em espécies-chave de diferentes ecossistemas. A falta de dados sobre as concentrações protetivas (CPs) limita a avaliação de risco ambiental e o estabelecimento de diretrizes regulatórias adequadas para o uso seguro dessa tecnologia.

Uma ferramenta comumente utilizada para estimar níveis de segurança ambiental é a curva de distribuição da sensibilidade das espécies (Species Sensitivity Distribution – SSD). Essa abordagem estatística permite integrar dados de toxicidade de múltiplas espécies para derivar uma concentração abaixo da qual a maioria das espécies está presumivelmente protegida, como a CP₉₅ (concentração protetiva para 95% das espécies) (Posthuma et al., 2002). A utilização de SSDs é recomendada por órgãos reguladores internacionais como a USEPA e a OECD, especialmente para derivação de critérios de qualidade da água.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi estimar as concentrações protetivas da nanoatrazina para espécies aquáticas não-alvo, por meio da construção de uma curva SSD baseada em dados ecotoxicológicos disponíveis na literatura científica e em experimentos laboratoriais conduzidos com espécies representativas. A aplicação da abordagem SSD contribui para uma melhor compreensão do risco ecológico associado à nATZ, auxiliando no desenvolvimento de estratégias de manejo e regulamentação que equilibrem os benefícios agrônômicos da nanotecnologia com a proteção da biodiversidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A curva SSD para a nATZ foi elaborada a partir de uma abordagem integrada, combinando dados da literatura científica anteriormente publicados e resultados experimentais obtidos ao longo da condução deste trabalho. Inicialmente, foi considerada a curva SSD já publicada por Hennig et al. (2023) e descrita no primeiro capítulo desta tese. Além disso, foram considerados parâmetros de toxicidade publicados em estudos recentes, publicados a partir de 2023, com o objetivo de ampliar o número de espécies não-alvo avaliadas. As buscas foram realizadas nas bases de dados Web of Science, Science Direct, Scopus, PubMed e Google Scholar, utilizando as seguintes palavras-chave (em inglês): "Nanoatrazine", "Nanopesticide atrazine", "Nanoherbicide atrazine", "Encapsulated atrazine", "Nanoatrazine toxicity", "Nanoherbicide toxicity" e "Nanopesticide atrazine toxicity". O período de busca foi restrito a publicações a partir de 2023, com a finalidade de complementar, sem sobreposição, a revisão anterior. Um total de 141 publicações foi inicialmente encontrado, distribuídas entre Web of Science (n = 4), Science Direct (n = 6), Scopus (n = 4), PubMed (n = 1) e Google Scholar (n = 126). Os critérios de inclusão consideraram apenas artigos originais de pesquisa, revisados por pares, redigidos em inglês, que apresentassem dados quantitativos de toxicidade da nATZ em organismos não-alvo, expressos como concentrações efetivas (CE₅₀) ou letais (CL₅₀). Após triagem por títulos, resumos, metodologia e resultados, apenas um novo estudo, a partir de 2023, atendeu plenamente aos critérios, fornecendo dados mensuráveis para seis espécies distintas.

Também foram incluídos dados inéditos obtidos experimentalmente nesta pesquisa com três espécies aquáticas não-alvo: *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Aliivibrio fischeri*. Os ensaios laboratoriais foram realizados conforme protocolos padronizados. Para *D. magna*, seguiu-se a ISO 6341 (2012), avaliando a imobilidade após 48 horas e estimando a CE₅₀. Os testes com *L. minor* basearam-se na OECD 221 (2011), quantificando a taxa de crescimento relativa após 7 dias. Já para *A. fischeri*, foi utilizada a metodologia descrita na NBR 15411-3 (ABNT, 2012), empregando o equipamento Microtox® para medir a inibição de 50% da luminescência após 15 minutos (CE₅₀–15min).

Os dados de toxicidade (CE₅₀/CL₅₀) foram inseridos no software Species Sensitivity Distribution Generator da USEPA, sendo ajustados a uma distribuição log-normal. Com base nessa curva, foram estimadas as concentrações protetivas que asseguram a proteção de 95% (CP₉₅) e 50% (CP₅₀) das espécies analisadas. Esses valores foram comparados às concentrações recomendadas para aplicação da atrazina convencional (2.000 g ha⁻¹), às concentrações

recomendadas para aplicação de nATZ (200 g ha⁻¹) e às concentrações-limite estabelecidas por agências ambientais (entre 0,002 e 0,02 mg L⁻¹, para Austrália, Estados Unidos, China e Brasil; Hennig et al., 2023) para ocorrência da atrazina em águas superficiais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na revisão conduzida para estudos mais recentes, foram encontrados valores de toxicidade de nATZ nanoencapsuladas em nanocápsulas poli (ε-caprolactona) (PCL) para as espécies *Artemia salina*, *D. magna*, *Danio rerio*, *Raphidocelis subcapitata*, *Lactuca sativa* e *L. minor* (Castanha et al., 2023). Os valores de toxicidade para estas espécies, para os estudos reportados na revisão de Hennig et al. (2023) e obtidos na presente tese, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de toxicidade obtidos a partir da revisão de Hennig et al. (2023), revisão recente de estudos publicados a partir de 2023 e gerados em laboratório na presente tese usados para gerar a curva de Distribuição de Sensibilidade das Espécies (SSD) geral da atrazina nanoencapsulada (nATZ) para espécies não-alvo.

Grupo	Espécies teste	Tempo de exposição	Avaliações	Parâmetro	Concentração (ppm)	Intervalo de confiança (95%)	Referência
Invertebrado aquático	<i>Artemia salina</i>	48 h	Imobilidade	CE ₅₀	7,81	5,67 - 11,92	(Castanha et al., 2023)
	<i>Daphnia similis</i>	48 h	Imobilidade	CE ₅₀	8	5,22 - 11,13	(Clemente et al., 2014)
	<i>Daphnia magna</i>	48 h	Imobilidade	CE ₅₀	9,74	7,45 - 14,04	(Castanha et al., 2023)
	<i>Daphnia magna</i>	48 h	Imobilidade	CE ₅₀	4,56	3,54 - 5,48	Presente estudo
Vertebrado aquático	<i>Danio rerio</i>	96 h	Mortalidade embrionária	CE ₅₀	34,44	22,22-53,72	(Castanha et al., 2023)
Bactéria marinha	<i>Aliivibrio fischeri</i>	15 min	Inibição da bioluminescência	CE ₅₀	0,44	0,43 - 0,45	Presente estudo
Alga	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	96 h	Inibição do crescimento	CE ₅₀	274,91	220,90 – 333,82	(Clemente et al., 2014)
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	7 d	Inibição do crescimento	CE ₅₀	0,22	0,20 – 0,26	(Castanha et al., 2023)
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>						

Planta	<i>Lactuca sativa</i>	96 h	Germinação de semente	CE ₅₀	>100	n.e.	(Castanha et al., 2023)
Macrófita	<i>Lemna minor</i>	7 d	Inibição do crescimento	CE ₅₀	1,15	0,89 - 1,46	(Castanha et al., 2023)
	<i>Lemna minor</i>	168 h	Inibição do crescimento	CE ₅₀	0,31	0,28 - 0,35	Presente estudo
Invertebrado terrestre	<i>Caenorhabditis elegans</i>	48 h	Imobilidade	CL ₅₀	10,2	n.e.	(Jacques et al., 2017)
	<i>Enchytraeus crypticus</i>	28 d	Reprodução	CE ₅₀	114	73,00 – 156,00	(Gomes et al., 2019)

n.e. – Não estimado

A curva SSD, apresentada na Figura 1, foi construída com base em onze espécies não-alvo. *R. subcapitata* foi a espécie mais sensível à nATZ, seguida por *A. fischeri* > *L. minor* > *D. magna* > *A. salina* > *D. similis* > *C. elegans*, *D. rerio* > *E. crypticus* e *P. subcapitata*, sendo a menos sensível. A CP₉₅, estimada em 0,15 ppm, foi suficientemente baixa para proteger todas as espécies incluídas na curva. Já a CP₅₀, de 8,86 ppm, revelou proteção para *C. elegans*, *D. rerio*, *L. sativa*, *E. crypticus* e *P. subcapitata*.

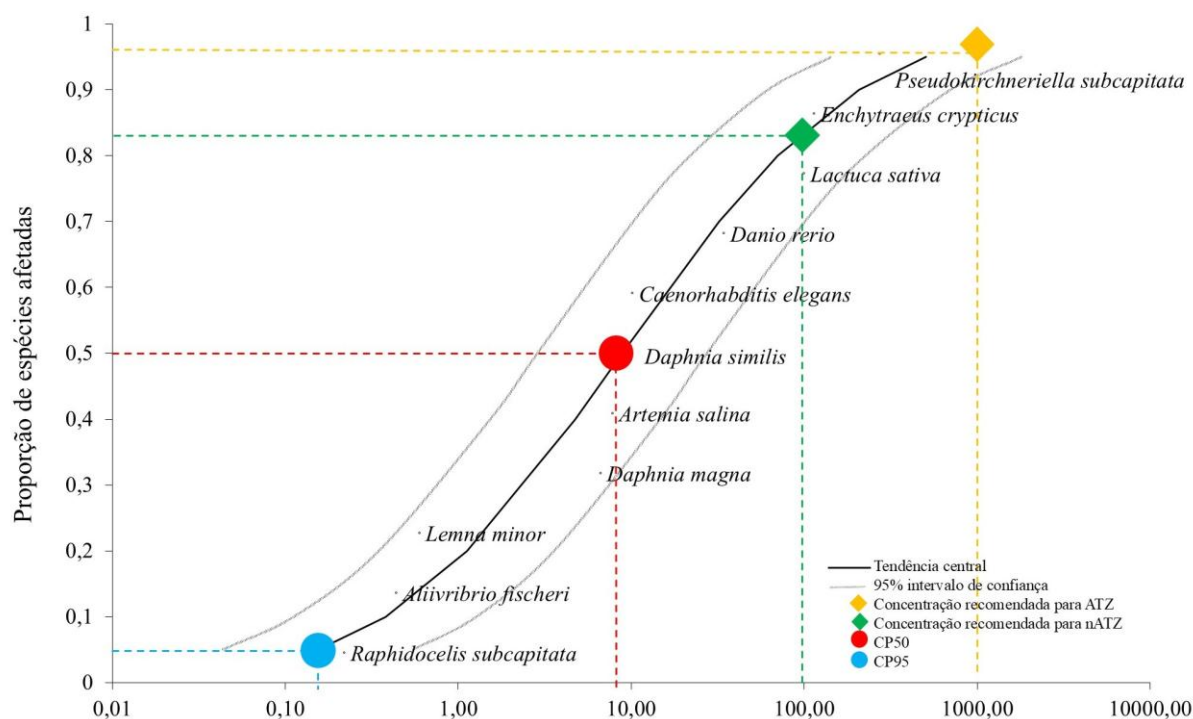


Figura 1 - Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) da atrazina nanoencapsulada (nATZ) com base nos valores dos parâmetros toxicológicos (CE₅₀ e CL₅₀) de onze espécies de grupos taxonômicos distintos expostos em diferentes compartimentos ambientais. CP₉₅: concentrações protetivas para 95% das espécies expostas. CP₅₀: concentrações protetivas para 50% das espécies expostas.

Cabe destacar que *R. subcapitata* e *P. subcapitata* correspondem à mesma espécie, sendo *R. subcapitata* a nomenclatura taxonômica atualmente aceita. De acordo com a curva SSD, observam-se efeitos ecotoxicológicos contrastantes da nanoatrazina (nATZ) sobre *R. subcapitata* ao comparar os resultados reportados por Clemente et al. (2014) e Castanha et al. (2023) (ver Tabela 1). Essa divergência pode estar relacionada, principalmente, às diferenças no tempo de exposição empregado nos ensaios, 96 horas no estudo de Clemente et al. (2014) e sete dias no estudo de Castanha et al. (2023), o que influencia significativamente as respostas fisiológicas e adaptativas da microalga ao contaminante.

A proteção dessas cinco espécies é ecologicamente relevante, pois elas desempenham funções essenciais nos ecossistemas. *C.elegans* e *E. crypticus* atuam na ciclagem de nutrientes em ambientes terrestres e sedimentares, contribuindo para a manutenção da qualidade do solo e dos sedimentos. *L. sativa* e *P. subcapitata* são fundamentais para a produção primária, sustentando as cadeias tróficas em ambientes terrestres e aquáticos, respectivamente. Por fim, *D. rerio*, cuja avaliação é realizada a partir da exposição embrionária, representa organismos de níveis tróficos superiores, sendo capaz de completar seu desenvolvimento e desempenhar funções ecossistêmicas essenciais, como a regulação das populações e o equilíbrio das comunidades aquáticas. A menor sensibilidade das espécies que vivem comumente no solo à nATZ pode estar relacionada à baixa biodisponibilidade do composto no solo devido à interação com matéria orgânica, que reduz a absorção direta pelos organismos (Domene et al., 2012). No caso do peixe em fase embrionária, é provável que os níveis de exposição à nATZ não tenham afetado condições enzimáticas e metabólicas que interferem na sobrevivência do organismo (Castanha et al., 2023).

Por outro lado, a elevada sensibilidade de *R. subcapitata* e *L. minor* pode ser atribuída ao mecanismo de ação do herbicida, que inibe o fotossistema II, provocando estresse oxidativo e comprometendo a fotossíntese, efeito esperado em organismos fotossensíveis à atrazina encapsulada. Organismos aquáticos como *A. fischeri*, *A. salina*, *D. magna* e *D. similis* mostraram sensibilidade intermediária, possivelmente em razão da facilidade de adsorção ou ingestão de nanopartículas, dada sua exposição contínua em coluna d'água ou sedimentos (Lv et al., 2017). A vulnerabilidade desses organismos é particularmente crítica, pois desempenham funções fundamentais na cadeia alimentar aquática.

No que diz respeito à exposição ambiental, a dose convencional de atrazina utilizada na agricultura gira em torno de 2.000 g ha⁻¹, o que equivale a concentrações superiores a 1.000 ppm (Preisler et al., 2020), valor que afetaria todas as espécies avaliadas na SSD. Mesmo

considerando que a nATZ seja aplicada a uma dose dez vezes menor (em razão de sua maior eficiência; Takeshita et al., 2021), ainda assim impactaria negativamente mais de 80% das espécies não-alvo, conforme os dados da curva.

Diversos países adotam limites legais para atrazina em águas superficiais, geralmente entre 0,002 e 0,02 ppm, como é o caso da Austrália, Estados Unidos, China e Brasil (Hennig et al., 2023). Esses valores estão abaixo da CP₉₅ determinada neste estudo e podem, portanto, ser considerados protetivos e adequados para garantir a segurança ambiental de organismos aquáticos expostos à nanoatrazina.

6 CONCLUSÃO

A curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) evidenciou que macrófitas, bactérias e microcrustáceos estão entre os grupos mais sensíveis à exposição à nATZ. Esses organismos desempenham papéis essenciais na base da cadeia trófica e nos processos de detoxificação de ambientes aquáticos, de modo que sua perda pode comprometer significativamente o equilíbrio ecológico.

A concentração protetiva para 95% das espécies mostrou-se eficaz em salvaguardar todas as espécies avaliadas. De forma consistente, os limites máximos de atrazina em águas superficiais adotados por agências reguladoras internacionais se situam abaixo dessa CP₉₅, indicando que, quando respeitados, oferecem uma margem adequada de proteção ambiental. Por outro lado, as concentrações atualmente recomendadas para aplicações em campo da nATZ, mesmo com doses reduzidas em relação à atrazina convencional, ainda apresentam risco potencial para mais de 80% das espécies descritas na SSD, o que reforça a necessidade de reavaliar os parâmetros de uso do nanopesticida sob uma perspectiva ecotoxicológica preventiva.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15411-3: Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de *Vibrio fischeri* - Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. Rio de Janeiro, 2022.

CASTANHA, R. F. Ecotoxicity studies of two atrazine nanoformulations: From the evaluation of stability in media to the effects on aquatic organisms. **Environmental Pollution**, v. 335, 2023.

CLEMENTE, Z., et al. Ecotoxicological evaluation of poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules containing triazine herbicides. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 14, 4911–4917, 2014.

DOMENE, X., et al. Applying a GLM-based approach to model the influence of soil properties on the toxicity of phenmedipham to *Folsomia candida*. **Journal of Soils and Sediments**, 12, 888–899, 2012.

GOMES, S.I.L., et al. On the safety of nanoformulations to non-target soil invertebrates-an atrazine case study. **Environmental Science: Nano**, 6, 1950–1958, 2019.

GRAYMORE, M. et al. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environment International**, v. 26, n. 7–8, p. 483–495, 2001.

GRILLO, R. et al. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: An environmentally safer alternative for weed control. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231–232, p. 232–240, 2012.

HENNIG, T. B. et al. A systematic review of the toxic effects of a nanopesticide on non target organisms: estimation of protective concentrations using a species sensitivity distribution (SSD) approach – the case of atrazine. **Science of the Total Environment**, 2023.

JACQUES, M.T., et al. Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 139, 245–253, 2017.

KAH, M. et al. Nanopesticides: State of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 16, p. 1823–1867, 2013.

OECD. Test No. 221: *Lemna sp.* Growth Inhibition Test. Paris: **OECD**, 2006.

OECD. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Paris: **OECD**, 2011.

POSTHUMA, L. et al. Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology. Boca Raton: **Lewis Publishers**, 2002.

PREISLER, A.C., et al. Atrazine nanoencapsulation improves pre-emergence herbicidal activity against *Bidens pilosa* without enhancing long-term residual effect on *Glycine max*. **Pest Management Science**, 76, 141–149, 2020.

SOLOMON, K. R. et al. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 31–76, 1996.

TAKESHITA, V. et al. Enhanced herbicidal activity of nanoencapsulated atrazine against weeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 12, p. 3456–3465, 2021.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos ao longo deste estudo permitem confirmar, em grande parte, as hipóteses inicialmente propostas, além de contribuir de forma relevante para o avanço do conhecimento sobre os impactos ecotoxicológicos de nanocontaminantes, isolados e em mistura, sobre diferentes níveis tróficos.

Para *L. minor*, confirmou-se que a exposição à nATZ, isoladamente ou combinada com nPPS, comprometeu significativamente o crescimento das colônias ao longo de múltiplas gerações, refletindo-se na redução do número de frondes e da área superficial, além de afetar parâmetros relacionados à pigmentação e ao sistema antioxidante das plantas. O nPPS isolado, por outro lado, não apresentou efeitos tóxicos relevantes para *L. minor* nas condições de exposição avaliadas, corroborando a hipótese de baixa toxicidade deste nanoplástico para organismos fotossintetizantes.

No caso dos microcrustáceos *D. magna*, os resultados também confirmam a hipótese de que tanto a nATZ quanto o nPPS, isolados e em combinação, são capazes de gerar efeitos tóxicos severos. Observou-se comprometimento expressivo dos parâmetros de mobilidade, reprodução e sobrevivência, com destaque para os efeitos mais pronunciados nas exposições à nATZ e à mistura. As respostas bioquímicas associadas ao estresse oxidativo reforçam essa tendência, evidenciando aumento significativo dos níveis de EROs, especialmente nos tratamentos com a mistura, além de alterações nas atividades das enzimas antioxidantes, como GST, SOD e GPx. Esses achados demonstram que a mistura de nanocontaminantes pode gerar efeitos sinérgicos, intensificando os danos observados.

Para *A. fischeri*, os dados também confirmaram a hipótese inicial. Houve redução da bioluminescência tanto nas exposições individuais quanto na exposição combinada à nATZ e nPPS. Os efeitos foram semelhantes entre os diferentes cenários de exposição, indicando que, para esse organismo, a presença da mistura não intensificou a toxicidade, o que sugere que os mecanismos de ação podem ser diferentes ou menos sensíveis às interações entre os contaminantes testados.

De forma integrada, a análise por meio da curva SSD evidenciou que uma variedade de espécies, incluindo invertebrados aquáticos e terrestres, vertebrados, plantas e microrganismos, apresenta alta sensibilidade à nATZ. Embora organismos como modelos celulares e algumas algas tenham se mostrado menos sensíveis, os dados deixam claro que a

aplicação da nATZ, em doses recomendadas de aplicação no campo, representa risco ecológico relevante, especialmente para ecossistemas aquáticos.

Os resultados aqui obtidos reforçam a importância de considerar não apenas os efeitos isolados dos nanocontaminantes, mas também suas interações, especialmente em cenários de exposição crônica e multigeracional. Este trabalho amplia o entendimento sobre os potenciais riscos ambientais associados às nanotecnologias aplicadas à agricultura e destaca a necessidade de avaliações de risco mais integradas e realistas, que considerem tanto os efeitos diretos quanto as interações entre diferentes classes de poluentes emergentes.

5.1 CONCLUSÕES

- A nATZ induz efeitos tóxicos agudos e crônicos em espécies não-alvo de diferentes ecossistemas, com efeitos variados para as diferentes espécies. De acordo com a SSD inicialmente elaborada a partir dos dados de literatura, apenas com quatro grupos, os grupos mais sensíveis foram os microcrustáceos aquáticos e os nematoides. Por outro lado, as algas se mostraram pouco sensíveis. A concentração protetiva para 95% das espécies não-alvo descritas na SSD contemplou todas as espécies analisadas.
- Apesar do número limitado de espécies e grupos taxonômicos utilizados na elaboração da SSD de nATZ, pode-se considerar que esta é uma primeira tentativa de aplicação desta metodologia para a determinação do cenário de risco e de cenários protetivos para a aplicação de nanopesticidas a base de atrazina.
- A caracterização preliminar do nPPS e de nATZ indicou que a síntese destas nanoformulações foram bem sucedidas e muito similares ao que já foi reportado anteriormente para as respectivas sínteses.
- Para macrófitas, o nPPS, em concentração comum no ambiente, não é passível de influenciar na toxicidade de nATZ, a qual resulta em efeitos de toxicidade severos multigeracionais;
- As análises de estresse oxidativo revelaram geração de EROs e um estímulo da atividade da enzima CAT, possivelmente manifestada como um mecanismo de defesa das

macrófitas na decomposição do peróxido de hidrogênio, uma das formas mais preponderantes de EROs.

- A exposição aguda à mistura de nATZ e nPPS resultou em efeitos tóxicos sinérgicos sobre os microcrustáceos, promovendo um aumento significativo na imobilidade em comparação aos efeitos observados com cada contaminante isoladamente. Esse efeito sinérgico também se refletiu no acúmulo de EROs e no aumento da atividade da enzima GST, que atua na detoxificação celular e como um importante mecanismo de defesa antioxidante.
- A nATZ isolada foi mais tóxica que o nPPS para crescimento e reprodução de *D. magna*, afetando parâmetros em concentrações mais baixas. A mistura não impactou o crescimento, mas reduziu significativamente a reprodução (número de neonatos), evidenciando maior sensibilidade dos efeitos subletais à combinação dos contaminantes.
- O comportamento de natação e os biomarcadores de estresse oxidativo foram alterados por ambos os nanocontaminantes, com destaque para um desequilíbrio no sistema antioxidante, especialmente sob exposição à nATZ.
- Para *A. fischeri*, a toxicidade da nATZ foi significativamente maior do que a do nPPS. Na mistura, a toxicidade da nATZ foi ligeiramente reduzida, enquanto a do nPPS permaneceu praticamente inalterada, indicando ausência de interação significativa sobre a toxicidade às bactérias.
- A SSD construída com 11 espécies mostrou que *R. subcapitata*, *A. fischeri* e *L. minor* foram as mais sensíveis à nATZ, enquanto algumas espécies de solo e peixe (fase embrionária) foram menos sensíveis, refletindo diferenças na biodisponibilidade e nos mecanismos de ação do herbicida.
- Mesmo com doses dez vezes menores que a atrazina convencional, a nATZ ainda impactaria mais de 80% das espécies descritas na SSD, com mais espécies, desenvolvida no presente estudo.

- Uma visão geral sobre os resultados desta tese permite inferir que os efeitos tóxicos e que as interações toxicológicas entre as substâncias testadas variam com os grupos de organismos testados, mesmo que eles pertençam ao mesmo compartimento ambiental. Em geral, a nATZ e misturas representam toxicidade representativa para organismos quáuticos, especialmente os fotossensíveis.

5.2 LIMITAÇÕES DO TRABALHO

Embora o presente trabalho tenha alcançado os objetivos propostos e contribuído para o avanço do conhecimento na área de toxicologia de misturas de poluentes emergentes, algumas limitações devem ser consideradas:

1. As concentrações de nPPS utilizadas nos testes, especialmente com microcrustáceos e bactérias marinhas, foram superiores às geralmente encontradas em ambientes naturais, o que reduz a relevância ambiental desses dados. Pelo caráter exploratório deste estudo, o uso de concentrações elevadas visou possibilitar uma análise prognóstica das interações tóxicas entre os compostos e seus efeitos nos organismos testados.
2. O nanoplástico empregado foi sintetizado em laboratório, caracterizando-se como um nanopartícula primária, não sendo representativo para os plásticos de origem secundária, resultantes da fragmentação e degradação de materiais plásticos maiores. Essas partículas envelhecidas podem apresentar propriedades físico-químicas distintas e induzir efeitos tóxicos diferentes daqueles observados para nanoplásticos primários, o que limita a extrapolação dos resultados para o ambiente real.
3. A nATZ, também sintetizada em laboratório, é um produto em fase de estudo e desenvolvimento, não comercialmente disponível. Dessa forma, ainda existem lacunas significativas quanto ao seu comportamento ambiental, persistência, bioacumulação e efeitos em longo prazo, aspectos que demandam investigação complementar para uma avaliação de risco mais abrangente.

4. Ausência da quantificação química dos nanocontaminantes nos meios de exposição durante os testes. Embora essa limitação não comprometa a interpretação dos resultados toxicológicos, a quantificação teria conferido maior robustez e confiabilidade às análises, sobretudo no que se refere à correlação entre concentração e efeito. Além disso, destaca-se a ausência de análises físico-químicas sobre as interações entre os nanocontaminantes investigados, dificultando a elucidação dos mecanismos por trás dos efeitos observados nos cenários de toxicidade de mistura.
5. Limitações relacionadas ao planejamento experimental:
 - 5.1 A inclusão da análise de ascorbato peroxidase (APx) poderia contribuir para a explicação de alguns efeitos observados em macrófitas, assim como a aplicação da análise por imaging PAM, que auxiliaria na compreensão dos impactos sobre a fotossíntese e a saúde das plantas.
 - 5.2 Para os microcrustáceos, a análise de enzimas como acetilcolinesterase (AChE) e APx, além da avaliação da lipoperoxidação, seria importante para aprofundar o entendimento dos efeitos tóxicos observados.
 - 5.3 Adicionalmente, o aumento do número de réplicas nos testes de exposição crônica com crustáceos possibilitaria a obtenção de um maior pool de organismos para as análises de estresse oxidativo, o que aprimoraria a robustez estatística e a confiabilidade dos resultados.

5.3 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados e nas limitações deste trabalho, é possível apontar algumas direções importantes para pesquisas futuras:

1. Uma delas é estudos de comportamento ambiental e degradabilidade, por meio de, parâmetros físico-químicos mais detalhados, que ajudem a entender como os nanocontaminantes interagem entre si e com o ambiente. É importante considerar como variáveis ambientais, como pH, salinidade, temperatura e presença de matéria orgânica, podem alterar esse comportamento.

2. Ensaios multigeracionais e transgeracionais, que permitam avaliar se os efeitos observados podem se manter ou até se intensificar ao longo de gerações. Esse tipo de abordagem é fundamental para entender possíveis impactos de longo prazo sobre os organismos, que muitas vezes não são detectados em estudos de curta duração.
3. Estudos que incluam diferentes compartimentos ambientais, além da água, como sedimentos e biofilmes, já que esses ambientes podem atuar como reservatórios de nanocontaminantes, afetando sua disponibilidade e seus efeitos. Além disso, há uma clara necessidade de ampliar os estudos para ambientes terrestres, buscando avaliar os efeitos de nanopesticidas e nanoplásticos sobre organismos do solo e os processos ecológicos associados, como a ciclagem de nutrientes e a saúde do solo.
4. Desenvolvimento de modelos que ajudem a prever os riscos ecológicos desses contaminantes, considerando dados de toxicidade, comportamento no ambiente e potencial de bioacumulação, tanto para os contaminantes isolados quanto em mistura. Esses modelos podem ser ferramentas importantes para orientar a gestão ambiental, definir limites de segurança e apoiar políticas públicas relacionadas à presença de nanocontaminantes no ambiente.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F.P., et al. Use of nontarget organism *Chironomus sancticaroli* to study the toxic effects of nanoatrazine. **Ecotoxicology**, 30, 733–750, 2021.
- ALBUQUERQUE, F.P., et al. Overview of Nanopesticide Environmental Safety Aspects and Regulatory Issues: The Case of Nanoatrazine, in: **Nanopesticides**. Springer International Publishing, pp. 281–298, 2020.
- ANDRADE, L. L. et al. Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. **Science of the Total Environment**, v. 663, p. 548-559, 2019.
- ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 1596-1605, 2011.
- BANDEIRA et al. Individual and combined toxicity of polystyrene nanoplastics and clothianidin toward *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Toxicology**, v. 44(2), p. 470-483, 2025.
- BESSELING, E. et al. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. **Environmental Science and Technology**, v. 48, p. 12336-12343, 2014.
- BHATTACHARYA, P. et al. Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 114, p. 16556-16561, 2010.
- BOMBO, A. B. et al. A mechanistic view of interactions of a nanoherbicide with target organism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 4453-4462, 2019.
- BOSKER, T. et al. Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant *Lepidium sativum*. **Chemosphere**, v. 226, p. 774-781, 2019.
- BRANDTS, I. et al. Effects of polymethylmethacrylate nanoplastics on *Dicentrarchus labrax*. **Genomics**, v. 110, p. 435-441, 2018.
- CANESI, L. et al. Interactions of cationic polystyrene nanoparticles with marine bivalve hemocytes in a physiological environment: Role of soluble hemolymph proteins. **Environmental Research**, v. 150, p. 73-81, 2016.
- CANO ROBLES, F. K., Cantu, A. M. Nanopesticides, a real breakthrough for agriculture? **Revista Bio Ciências**, v. 4, p. 164-178, 2017.
- CHEN et al. *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. **Science of The Total Environment**, v. 574, p. 300-306, 2017.

CHENG, Y. et al. Combined effects of mulch film-derived microplastics and atrazine on oxidative stress and gene expression in earthworm (*Eisenia fetida*). **Science of The Total Environment**, v. 746, 2020.

CLEMENTE, Z. et al. Ecotoxicological evaluation of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules containing triazine herbicides. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 13, p. 11-7, 2014.

CUI, R. et al. Polystyrene nanoplastics inhibit reproduction and induce abnormal embryonic development in the freshwater crustacean *Daphnia galeata*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-10, 2017.

DELLA TORRE, C. et al. Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 12302-12311, 2014.

DONG, Z. et al. Size-dependent transport and retention of micron-sized plastic spheres in natural sand saturated with seawater. **Water Research**, v. 143, p. 518-526.

FADARE, O. O. et al. Humic acid alleviates the toxicity of polystyrene nanoplastic particles to: *Daphnia magna*. **Environmental Science: Nano**, v. 6, n. 5, p. 1466-1477, 2019.

FADARE, O.O., OKOFFO, E. D. Covid-19 face masks: a potential source of microplastic fibers in the environment. **Science of The Total Environment**, v. 737, 2020.

GARRIDO, S. et al. Effect of microplastics on the toxicity of chlorpyrifos to the microalgae *Isochrysis galbana*, clone t-ISO. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, p. 103-109, 2019.

GEBRE, S. H., Sendeku, M. G. New frontiers in the biosynthesis of metal oxide nanoparticles and their environmental applications: an overview. **SN Applied Sciences**, v. 1, 2019.

GOMES et al. On the safety of nanoformulations to non-target soil invertebrates-an atrazine case study. **Environmental Science: Nano**, v. 6, p. 1950-1958, 2019.

GONZÁLEZ-DONCEL, M. et al. The role of PFOS on triclosan toxicity to two model freshwater organisms. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114604, 2020.

GRILLO, S. I. L. et al. Poly(ε-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: physic-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231, p. 1-9, 2012.

GRILLO, R. et al. Nanotechnology applied to bioencapsulation of pesticides. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, p. 1231-1234, 2016.

GRILLO, R. et al. Ecotoxicological and regulatory aspects of environmental sustainability of nanopesticides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, 2021.

HOFMANN, T.; GHOSHAL, S.; TUFENKJI, N. et al. Plastics can be used more sustainably in agriculture. **Communications Earth & Environment**, v. 4, p. 332, 2023.

HORTON, A. A. et al. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 127-141, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS (IBAMA). Relatórios de comercialização de agrotóxicos, 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>> . Acesso em: 11 abr. 2025.

JACQUES, M. T. et al. Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 245-253, 2017.

JEONG, J., CHOI, J. Adverse outcome pathways potentially related to hazard identification of microplastics based on toxicity mechanisms. **Chemosphere**, v. 231, p. 249-255, 2019.

KAH, M. et al. Analyzing the fate of nanopesticides in soil and the applicability of regulatory protocols using a polymer-based nanoformulation of atrazine. **Environmental Science & Policy**, v. 20, p. 11699-11707, 2014

KHAN, S. U., SAIDAK, W. J. Residues of atrazine and its metabolites after prolonged usage. **Weed Research**, v. 21, p. 9-12, 1981.

KIM, H. M. et al. Uptake of nanopolystyrene particles induces distinct metabolic profiles and toxic effects in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 578-586, 2019.

LEI, L. et al. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science of the Total Environment**, v. 619, p. 1-8, 2018.

LENZ, R. et al. Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1606615113>. Acesso em: 11 fev. 2025.

LI, M. et al. Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 188, p. 159-169, 2016.

LIU, H. et al. Altered quantities and in vivo activities of cholinesterase from *Daphnia magna* in sub-lethal exposure to organophosphorus insecticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 118-125, 2011.

LIU, Y. et al. Single and mixture toxicities of BDE-47, 6-OH-BDE-47 and 6-MeO-BDE-47 on the feeding activity of *Daphnia magna*: From behavior assessment to neurotoxicity. **Chemosphere**, v. 195, p. 542-550, 2018.

McKEEN, L. W. Effect of temperature and other factors on plastics and elastomers. 3. ed. **Norwich**: William Andrew, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780815515685/effect-of-temperature-and-other-factors-on-plastics-and-elastomers>. Acesso em: 11 abr. 2025.

MIERNICKI, M. et al. Legal and practical challenges in classifying nanomaterials according to regulatory definitions. **Nature Nanotechnology**, v. 14, p. 208-216, 2019.

NAKKA, S. et al. Rapid detoxification via glutathione S-transferase (GST) conjugation confers a high level of atrazine resistance in *Palmer amaranth* (*Amaranthus palmeri*). **Pest Management Science**, v. 73, p. 2236-2243, 2017.

NG, E. L. et al. An overview of microplastic and nanoplastic pollution in agroecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 627, p. 1377-1388, 2018.

NIZZETTO, L. et al. Are Agricultural Soils Dumps for Microplastics of Urban Origin? **Environmental Science and Technology**, v. 50, p. 10777-10779, 2016.

OLIVEIRA, H. C. et al. Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. **PLoS One**, v. 10, p. 1-12, 2015a.

OLIVEIRA, H. C. et al. Solid lipid nanoparticles co-loaded with simazine and atrazine: preparation, characterization, and evaluation of herbicidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 422-432, 2015b.

PEREIRA, A. E. S. et al. Application of poly (epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p. 207-215, 2014.

PITT, J. A. et al. Maternal transfer of nanoplastics to offspring in zebrafish (*Danio rerio*): a case study with nanopolystyrene. **Science of the Total Environment**, v. 643, p. 324-334, 2018.

PLASTICSEUROPE. **Plastics - the Facts**, 2023. Disponível em: < <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/> > . Acesso em: 02 mai. 2025

RILLIG, M.C. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 6453-6454, 2012.

RODEA-PALOMARES, I. et al. Additivity and Interactions in Ecotoxicity of Pollutant Mixtures: Some Patterns, Conclusions, and Open Questions. **Toxics**, v. 3, p. 342-369, 2015.

SINGH, S. et al. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, 2017.

SOUSA, B. T. et al. Effectiveness of nanoatrazine in post-emergent control of the tolerant weed *Digitaria insularis*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 60, p. 185-192, 2020.

TAVERNA, M. E. et al. Microparticles based on ionic and organosolv lignins for the controlled release of atrazine. **Journal of Hazardous Materials**, v. 359, p. 139-147, 2018.

TAKESHITA, V.; Sousa, B. P.; Preisler, A. C. Foliar absorption and field herbicidal studies of atrazine-loaded polymeric nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v., 2021.

VAZ, V. P. et al. Can the sonication of polystyrene nanoparticles alter the acute toxicity and swimming behavior results for *Daphnia magna*? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 14192–14198, 2021.

WAGNER, M., LAMBERT, S. Freshwater Microplastics. [s.l.] **Springer International Publishing**, 2018.

WANG, L. et al. Synergistic effect of co-exposure to cadmium (II) and 4-n-nonylphenol on growth inhibition and oxidative stress of *Chlorella sorokiniana*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 154, p. 145-153, 2018.

WANG, Y. et al. Combinational exposure to hydroxyatrazine increases neurotoxicity of polystyrene nanoparticles on *Caenorhabditis elegans*. **Science of the Total Environment**, v. 880, 2023.

WARD, J. E., KACH, D. J. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. **Marine Environmental Research**, v. 68, p. 137-142, 2009.

XIAO, F. et al. Do polystyrene nanoplastics have similar effects on duckweed (*Lemna minor* L.) at environmentally relevant and observed-effect concentrations? **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 7, p. 4071–4079, 5 abr. 2022.

YANG, X. et al. Biogenic transport of glyphosate in the presence of LDPE microplastics: A mesocosm experiment. **Environmental Pollution**, v. 245, p. 829-835, 2019.

YIN, C. et al. Changes of the acute and chronic toxicity of three antimicrobial agents to *Daphnia magna* in the presence/absence of micro-polystyrene. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114551, 2020.

ZHANG, Q. et al. The combined toxicity effect of nanoplastics and glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth. **Environmental Pollution**. v. 243, p. 1106-1112, 2018.

ZOCCHI, M., SOMMARUGA, R. Microplastics modify the toxicity of glyphosate on *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 697, p. 1-7, 2019.