



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LAURA LUI DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ATRAZINA
NANOENCAPSULADA EM COMPARAÇÃO COM SUA
FORMULAÇÃO CONVENCIONAL EM BIOMARCADORES
DO PEIXE *Prochilodus lineatus***

Londrina
2018



Programa Multicêntrico de Pós-graduação
em Ciências Fisiológicas.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

LAURA LUI DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ATRAZINA NANOENCAPSULADA EM
COMPARAÇÃO COM SUA FORMULAÇÃO CONVENCIONAL EM
BIOMARCADORES DO PEIXE *Prochilodus lineatus***

Londrina - PR

2018

LAURA LUI DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ATRAZINA
NANOENCAPSULADA EM COMPARAÇÃO COM SUA
FORMULAÇÃO CONVENCIONAL EM BIOMARCADORES
DO PEIXE *Prochilodus lineatus***

Dissertação apresentada ao Programa Multicentro de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudia Bueno dos Reis Martinez.

Londrina
2018

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

Andrade, Laura .

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ATRAZINA NANOENCAPSULADA EM COMPARAÇÃO COM SUA FORMULAÇÃO CONVENCIONAL EM BIOMARCADORES DO PEIXE *Prochilodus lineatus* / Laura Andrade. - Londrina, 2018.
66 f. : il.

Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez .
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Fisiologia animal comparada - Tese. 2. Nanotoxicidade - Tese. 3. Avaliação da toxicidade da atrazina nanoencapsulada em um organismo não-alvo - Tese. I. Bueno dos Reis Martinez , Claudia . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

LAURA LUI DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ATRAZINA NANOENCAPSULADA
EM COMPARAÇÃO COM SUA FORMULAÇÃO CONVENCIONAL EM
BIOMARCADORES DO PEIXE *Prochilodus lineatus***

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho - UNESP - Campus
Sorocaba

Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de março de 2018.

Dedicatória

A minha família, por todo o amor, carinho e cuidado que tiveram comigo nesses anos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A Deus!

Aos meus pais, não tenho como expressar o meu agradecimento por vocês serem meus pais, pela aprendizagem de vida que me proporcionam, pela melhor amizade do mundo, pelos consolos, pelos vários momentos de alegria, pelo meu pai Júlio ser exemplo de caráter e princípios os quais eu quero seguir, por minha mãe Rose ser essa mãe tão presente, amiga, guerreira e especial em minha vida, pela educação que me deram e por todos os nossos momentos juntos. Amo muito vocês!

À Prof.^a Dra. Cláudia por toda a orientação e atenção dadas a mim e ao meu trabalho, pela confiança de me deixar fazer parte dessa equipe tão incrível do LEFA, por ser um exemplo como pesquisadora e como pessoa, por sempre me ajudar e me dar apoio quando precisei. Só tenho a agradecer a esses meus cinco anos no laboratório e essa convivência tão boa que tivemos. Obrigada por ter me ajudado a amadurecer como pesquisadora, pela amizade, carinho e dedicação.

A minha família LEFIANA - Carol, Bruna, Lu, Xê, Nadjha, Carlos, Tiego, Natara, Cássia, Thais, Millena, Deia, Debora, Jéssica, Tiago, Angélica, Laura Fernanda, Mari e Laís, não tenho palavras para agradecer pelo carinho e amizade. Nesses cinco anos de convivência fiz amizades especiais, vivi momentos de muita alegria, como também compartilhei momentos de muito estresse e angústias. Obrigada pelos almoços, pelas muitas risadas, pelas amostragens divertidas, por toda ajuda que precisei, pelas gordices, cometas até de madrugada, enfim nesses últimos anos foram as pessoas que mais convivi e compartilhei experiências, e que certamente vou sentir falta de todos no meu dia a dia.

Aos meus amigos de Londrina e da UEL por todo apoio e compreensão nos momentos difíceis que passei, obrigado por esses anos todos de amizade, por se fazerem tão presentes, vocês são muito especiais para mim. Em especial a minha amiga Maiara, que desde o primeiro dia de aula se tornou uma amizade indispensável e tão especial, assim como para as minhas irmãs de casa, Fernanda e Thaisa, por todo carinho, amizade, risadas, almoços e apoio durante todo o período que moramos juntas.

A minha prima Talita, que é minha família em Londrina por todos os anos de companheirismo e amizade. Por todas as alegrias compartilhadas, pelos momentos especiais e por trazer à vida e a nossa família a Malu e o Pietro que são bênçãos e só nos trazem momentos de alegria.

Ao técnico do LEFA, Wagner Risso, por estar sempre disposto a me ajudar nas amostragens e na realização das análises plasmáticas.

À Prof.^a Dra. Juliana D. S. Rocha por todas as conversas sobre livros, pela sua amizade e por ser uma pessoa que pude contar todos esses anos, além de ser um exemplo como profissional.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Halley C. Oliveira e Prof. Dr. Leonardo F. Fraceto, por terem aceito o convite de colaborar com esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo F. Fraceto e seu aluno Dr. Anderson do Espirito Santo Pereira pela preparação, fornecimento e caracterização das nanocápsulas contendo ou não atrazina.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas e a Universidade Estadual de Londrina.

Aos professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e aos colegas do programa, pelos congressos compartilhados e pelas disciplinas cursadas, assim como pela contribuição na minha formação acadêmica.

À Acqua Norte (Cambará/PR), por fornecer os peixes para este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela confiança em nosso projeto e apoio financeiro.

Enfim, a todos que participaram de alguma forma para a realização desse trabalho. Muito obrigado!

ANDRADE, L.L. **Avaliação dos efeitos da atrazina nanoencapsulada em comparação com sua formulação convencional em biomarcadores do peixe *Prochilodus lineatus***. Dissertação de Mestrado, 2018. 66f. (Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Nanopartículas foram desenvolvidas como sistemas de liberação para agrotóxicos, melhorando suas características e aumentando sua eficiência. Com isso permitem diminuição da dosagem e frequência de aplicação, diminuindo os riscos para os organismos não-alvos. A atrazina (ATZ) é um herbicida amplamente utilizado, que possui um alto potencial para contaminar o ambiente e vários estudos apontam os seus efeitos em organismos não-alvo. Sistemas de liberação para a atrazina (ATZ) foram desenvolvidos a fim de minimizar sua contaminação no ambiente, como as nanocápsulas preparadas com poli (ϵ -caprolactona). Contudo, para o uso seguro da ATZ nanoencapsulada estudos que investiguem sua toxicidade são de grande importância. Com isso, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos da ATZ nanoencapsulada e comparar com os efeitos de sua formulação convencional, em diferentes concentrações e tempos de exposição, sobre biomarcadores do peixe *Prochilodus lineatus*. Os peixes foram expostos durante 24 e 96 h a ATZ nanoencapsulada (nATZ) e a atrazina (ATZ) nas concentrações de 2 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, apenas às a nanocápsulas sem o ativo (NANO), nas quantidades correspondentes, ou apenas a água desclorada (CTR). Foram realizadas análises hematológicas (número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina), quantificação da glicemia e de íons plasmáticos (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+}), da atividade branquial das enzimas Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase e Anidrase Carbônica. No fígado foram analisadas a ocorrência de proteínas carboniladas e de lipoperoxidação, alterações na atividade das enzimas de biotransformação CYP1A e glutathiona-S-transferase, no conteúdo de glutathiona, assim como alterações nas defesas enzimáticas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase. Também foi analisada a ocorrência de danos genotóxicos e de alterações eritrocíticas nucleares em eritrócitos. Os resultados mostraram que o herbicida nanoencapsulado se mostrou menos tóxico em comparação com a ATZ livre, pois não promoveu aumento na glicemia, alterações na atividade das enzimas antioxidantes, no conteúdo de glutathiona, na atividade da enzima anidrase carbônica e tampouco aumento na frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocíticas nucleares. Contudo a exposição à nATZ, assim como à ATZ e as nanocápsulas sem o ativo, resultou em redução no conteúdo de hemoglobina, no aumento do escore de danos no DNA de eritrócitos, como também na alteração da atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase levando a diminuição do Ca^{2+} plasmático. A análise integrada dos biomarcadores, por meio do cálculo do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR), mostrou que a exposição a ATZ promoveu alterações em um maior número de biomarcadores, seguido da ATZ nanoencapsulada e a exposição as nanocápsulas promoveu um menor número de alterações, indicando que a encapsulação do herbicida protegeu o animal dos efeitos da ATZ. Assim, pode-se concluir que a nanoencapsulação da ATZ pode ser uma ferramenta para diminuir os danos desse herbicida ao meio ambiente.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanopartículas. ATPases. Danos oxidativos. Fígado. Enzimas antioxidantes.

ANDRADE, L.L. **Evaluation of the effects of nanoencapsulated atrazine compared to its conventional formulation in biomarkers of the fish *Prochilodus lineatus***. Master Dissertation, 2018. 66p. (Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Nanoparticles were developed as release systems for pesticides, improving their characteristics and increasing their efficiency. Thereby reducing dosage and frequency of use, reducing the risks for non-target organisms. Atrazine (ATZ) is an herbicide widely used and presents a high potential to contaminate the environment and several studies point out its effects on non-target organisms. Release systems for ATZ have been developed to minimize the contamination of the environment, such as nanocapsules prepared with poly (ϵ -caprolactone). However, for the safe use of ATZ nanoencapsulated studies investigating its toxicity are of great importance. Thus, the objective of this work was to investigate the effects of ATZ encapsulation and to compare it with the effects of its conventional formulation, at different concentrations and times of exposure, on the biomarkers of the fish *Prochilodus lineatus*. The fish were exposed for 24 and 96 h to nanoencapsulated ATZ (nATZ) and atrazine (ATZ) at concentrations of 2 and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, only to nanocapsules without the active (NANO), in the corresponding quantities, or only dechlorinated water (CTR). After exposures, the fish were sampled and the blood was used for the determination of hematocrit, hemoglobin, erythrocyte count and the quantification of plasma levels of Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Mg^{2+} and glucose. In the gills the activities of Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase and carbonic anhydrase were determined. In the liver the occurrence of carbonylated proteins and lipoperoxidation, changes in the activity of biotransformation enzymes CYP1A and glutathione-S-transferase, in the content of glutathione, as well as changes in antioxidant enzymatic defenses catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase were determined. The occurrence of genotoxic damage and nuclear alterations was analyzed in fish erythrocytes. The results indicated that the nanoencapsulated herbicide showed to be less toxic in comparison to the free ATZ, since it did not promote increase in glycemia, alterations in the activity of antioxidant enzymes, glutathione content, carbonic anhydrase enzyme activity, and increase in the frequency of micronuclei and other nuclear erythrocyte abnormalities. However, exposure to nATZ, as well as to ATZ and nanocapsules without the active, resulted in a reduction in hemoglobin content, an increase in erythrocyte DNA damage score, and a change in Ca^{2+} -ATPase enzyme activity leading to a decrease in plasma Ca^{2+} . Integrated biomarkers analysis, by calculating the Biomarkers Integrated Index (IBR), showed that the exposure to ATZ promoted changes in a greater number of biomarkers, followed by nanoencapsulated ATZ and the exposure to nanocapsules promoted a smaller number of alterations, indicating that the encapsulation of the herbicide protected the animal from the effects of ATZ. Thus, it can be concluded that the nanoencapsulation of ATZ may be a tool to reduce the damage of this herbicide to the environment and non-target organisms.

Keywords: Nanotechnology. Nanoparticles. ATPases. Oxidative damage. Liver. Antioxidant enzymes.

SUMÁRIO

1.	Revisão Bibliográfica	1
1.1.	Nanotecnologia aplicada a agricultura	1
1.2.	Atrazina	4
1.2.	Atrazina Nanoencapsulada	8
1.3.	Modelos biológicos para estudos ecotoxicológicos	11
2.	OBJETIVO	12
2.2.	Objetivo geral	12
2.3.	Objetivos específicos	12
	REFERÊNCIAS	13
3.	Manuscrito	24
	RESUMO	25
3.1.	INTRODUÇÃO	26
3.2.	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.2.1.	Modelo experimental	29
3.2.2.	Experimentos e amostragem	30
3.2.3.	Preparação e caracterização das nanocápsulas de poli(epsilon-caprolactona)	31
3.2.4.	Biomarcadores genotóxicos	33
3.2.5.	Biomarcadores fisiológicos	34
3.2.6.	Biomarcadores bioquímicos	35
3.2.7.	Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR)	37
3.2.8.	Análises estatísticas	37
3.3.	RESULTADOS	38
3.3.1.	Caracterização das nanocápsulas	38
3.3.2.	Biomarcadores fisiológicos	39
3.3.3.	Biomarcadores bioquímicos	42
3.3.4.	Biomarcadores genotóxicos	45
3.4.	DISCUSSÃO	49
	REFERENCIA	58

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Nanotecnologia aplicada a agricultura

A população global deverá atingir 8,5 bilhões em 2030, para atender essa demanda, a produção de alimentos deverá aumentar em até 50% (Wiens, 2016). Contudo, os recursos naturais estão se esgotando em uma taxa sem precedentes, além das mudanças climáticas globais que reduzem a produtividade agrícola (Dewulf et al., 2015). Para superar estas restrições, é preciso melhorar a produtividade e o processamento pós-colheita (Kang et al., 2009). A nanotecnologia refere-se à tecnologia, engenharia e ciência do controle e construção de sistemas com propriedades diferentes (Wang et al., 2016) e suas aplicações realizam um avanço significativo em várias áreas, dentre elas a agricultura (Fraceto et al., 2016; He e Hwang et al., 2016). A implementação da nanotecnologia na agricultura tem o intuito de melhorar a saúde vegetal, qualidade do produto, segurança alimentar e o rendimento agrícola (Luvisi, 2016).

A nanotecnologia pode permitir o melhoramento da agricultura com o desenvolvimento de dispositivos com o intuito de melhorar o controle do uso de fertilizantes, permitir uma germinação aprimorada, desenvolver sistemas de liberação para agrotóxicos, aumentar a retenção de água no solo, uma melhor imobilização e liberação de nutrientes no solo, melhora no desenvolvimento das plantas e na resistência contra patógenos, assim como em todas as fases de produção, desde o cultivo até a distribuição de alimentos (Fig. 1) (Fraceto et al., 2016; Mishra et al., 2017). Com o desenvolvimento destes dispositivos pode ocorrer uma revolução nas práticas

agrícolas, tanto na redução de impactos sobre o meio ambiente, assim como uma melhoria na quantidade e na qualidade dos produtos (Sekhon, 2014; Liu e Lal, 2015).



Figura 1. Potenciais aplicações da nanotecnologia na agricultura.

Com a nanotecnologia aplicada à agricultura, ocorreu o desenvolvimento de nanomaterias destinados a melhorar a segurança e a eficácia de fertilizantes e agrotóxicos (Parisi et al., 2015; Sekhon, 2014), incluindo a pesquisa da associação de agrotóxicos com nanomateriais, que favorecem sua interação e efeitos no campo, aumentando sua superfície de contato e reatividade. Com isso, vários nanocarreadores foram desenvolvidos para melhorar a eficiência de agrotóxicos, como nanodispersões, nanoemulsões e nanopartículas inorgânicas e orgânicas (Kah et al., 2013; Kah e Hofmann, 2014). Além disso, é importante mencionar que os nanomateriais podem ser explorados por melhorar algumas características dos agrotóxicos, como a resistência contra a hidrólise e fotodegradação, aumento de sua solubilidade e da extensão de seu

potencial de ação, diminuição da degradação prematura, liberação mais específica e controlada, em comparação com formulações convencionais (Grillo et al., 2016; Kah e Hofmann, 2014; Mishra e Singh, 2015; Nuruzzaman et al., 2016). Essas características permitem reduções na dosagem de aplicação de agrotóxicos e na frequência de sua utilização, e com isso também diminuem os riscos para os organismos não-alvos e para o ambiente (Kah et al., 2013; Kah e Hofmann, 2014).

As nanopartículas (NP) permitem uma liberação mais controlada, mais específica no alvo e a utilização de concentrações otimizadas (Wang et al., 2016). No trabalho realizado por Tong e colaboradores (2017) a utilização da NPs como um sistema de liberação para o herbicida metolachlor aumentou sua solubilidade em água e aumentou seu potencial herbicida em concentrações relativamente baixas, em culturas de arroz (*Oryza sativa*) e milho (*Digitalia sanguinalis*). Um trabalho realizado com NP de alginato de sódio carregadas com o pesticida imidacloprid mostrou que a formulação encapsulada é mais eficaz do que a convencional, além disso, análises *in vitro* demonstraram que o inseticida encapsulado é menos citotóxico (Kumar et al., 2014). Em ensaios da atividade herbicida, NP lipídicas sólidas contendo o herbicida atrazina e simazina mostraram eficácia contra a espécie alvo nabo-bravo (*Raphanus raphanistrum*), mas não afetaram o crescimento do milho (*Zea mays*), organismo não-alvo (de Oliveira et al., 2015). Um trabalho realizado com NP do inseticida poliacrilato com moléculas de benzoato de emamectina, demonstrou que a encapsulação aumentou sua fotoestabilidade e se mostrou mais eficaz no controle da lagarta *Helicoverpa armigera* (Shang et al., 2013).

Como foi visto, a nanotecnologia desempenha um papel importante para o crescimento da agricultura moderna e aumento da produção de alimentos, concomitante com a proteção dos organismos não-alvo e o meio ambiente (Campos-Garcia et al., 2015). Nesse contexto, com o aumento da produção de NP, estudos toxicológicos são essenciais para conhecer seus possíveis impactos no ambiente e na saúde de organismos não alvos, dado que esses sistemas podem modificar o transporte, a biodisponibilidade e o destino dos agrotóxicos no meio ambiente (Grillo et al., 2016).

1.2. Atrazina

Com o consumo anual de 70.000 a 90.000 toneladas, a atrazina (ATZ) é considerada o segundo herbicida mais consumido no mundo (Cheng et al., 2016; Kumar et al., 2013). Este herbicida de triazina sintética é amplamente utilizado devido ao seu baixo custo, sendo aplicado para o controle de plantas de folhas larvas invasoras nos cultivos de cana-de-açúcar, trigo, sorgo, nozes e milho (Singh et al., 2017).

A ATZ apresenta uma vida de 41-231 dias (Karlsson et al., 2016), possui solubilidade moderada em água e baixa adsorção em solos (Cerejeira et al., 2003; Kumar et al., 2013; Schwab et al., 2006), e por consequência, apresenta alta persistência e mobilidade no ambiente (Jablonowski et al., 2009; Jablonowski et al., 2011). Devido a suas características, a ATZ possui um alto potencial para contaminar não só a produção agrícola, mas também o solo, águas superficiais e subterrâneas (Cerejeira et al., 2003; Kumar et al., 2013; Schwab et al., 2006). Embora sua utilização tenha sido proibida no ano de 1991 em vários países, como Itália (Huang et al. 2009),

Dinamarca (Glaesner et al., 2014), Finlândia e Alemanha (Vonberg et al., 2014), a ATZ continua a ser um dos agrotóxicos mais utilizados nos Estados Unidos e no resto do mundo (Ehrsam et al., 2016). No Brasil este herbicida ocupa a quarta colocação no ranking dos 10 ingredientes ativos mais vendidos no ano de 2016 (IBAMA, 2017).

A grande utilização de ATZ levou a um aumento de seus resíduos no solo e em águas subterrâneas (Arora et al., 2008; Jablonowski et al., 2011; Sui e Yang, 2013). A ATZ geralmente é encontrada em níveis relativamente baixos no ambiente, menores que $1 \mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, este herbicida já foi detectado em níveis tão altos quanto $21 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas subterrâneas, $42 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas superficiais e até $102 \mu\text{g L}^{-1}$ em bacias hidrográficas de áreas agrícolas dos Estados Unidos (Powell et al., 2011). Alguns estudos mostram níveis superiores a 3 e $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ encontrados em água potável dos Estados Unidos e da Europa, respectivamente (Mahía et al., 2007). No estado do Paraná (sul do Brasil), concentrações de ATZ entre 0,09 a $0,30 \mu\text{g L}^{-1}$ foram determinadas em 3 córregos de áreas agrícolas (Vieira et al., 2016).

Plantas alvos e não-alvos expostas a ATZ apresentaram um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que pode levar a estresse oxidativo (Hassan e Nemat 2005; Nemat e Hassan 2006; Szigeti e Lehoczki 2003; Su e Zhu 2006). A ATZ inibe a fotossíntese, pela ligação competitiva ao sítio de ligação da plastoquinona à subunidade D1 do fotossistema II, bloqueando o fluxo de elétrons, levando a produção de ERO e a inibição da assimilação do CO_2 (Li et al., 2012; Nakka et al., 2017; Oliveira et al., 2015a). Li e colaboradores (2012) mostraram que a exposição a ATZ induziu a formação de ERO no milho (*Zea mays*) e levou a um aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes. Plantas possuem algumas enzimas responsáveis pela

desintoxicação contra vários agrotóxicos, como o citocromo P450, peroxidases, arilacilamidase, esterases, lipases, proteases, amidases, oxigenases e reductases (Jiang et al., 2016). Um mecanismo importante de biotransformação das triazinas em milho e sorgo é através da conjugação com a glutathione, catalisada por GSTs (Nakka et al., 2017).

A agência de proteção ambiental dos EUA classifica a ATZ na classe III em uma escala de I a IV, sendo IV considerado o mais tóxico. Este herbicida foi classificado como sendo um bloqueador endócrino pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Morales-Pérez et al., 2016) e como potencialmente cancerígeno pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) (Mahler et al., 2017). Com isso, trabalhos na área de ecotoxicologia que utilizem biomarcadores para analisar possíveis danos em organismos não-alvo causados pela exposição a ATZ são de grande importância.

Os biomarcadores constituem ferramentas rápidas e sensíveis para revelar efeitos subletais de xenobióticos em organismos de diferentes habitats (Colin et al., 2016). Seu uso tem origem em toxicologia humana, na qual provaram ser úteis como indicadores de alerta precoce a doenças ou síndromes específicas; em Ecotoxicologia os biomarcadores vêm sendo utilizados há cerca de 20 anos (Forbes et al., 2006). Assim, o objetivo de analisar biomarcadores em organismos que sofreram algum tipo de exposição a determinado contaminante químico é antecipar prejuízos possíveis de atingir outros níveis de organização biológica (Colin et al., 2016). Deste modo, os biomarcadores fornecem valiosa ferramenta de previsão em biomonitoramento e

avaliação de risco ecológico, possuindo uma utilidade direta para avaliar a saúde do ecossistema (Allen e Moore, 2004).

Os biomarcadores podem ser indicadores genéticos, bioquímicos, fisiológicos ou histológicos de exposição a xenobióticos (Forbes et al., 2006). Vários trabalhos têm mostrado que alguns biomarcadores são sensíveis a exposição a ATZ. No trabalho realizado com *Carpa (Cyprinus carpio)*, mostrou-se que a exposição a 2 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ levou a danos oxidativos em diferentes tecidos do peixe e levou a inibição das enzimas antioxidantes (Marins et al., 2018). Os resultados obtidos com peixe de água doce Jundiá (*Rhamdia quelen*), expostos por 96 h a 2, 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ, mostraram que a exposição ao herbicida pode causar lesões histológicas no fígado, com vacuolização de hepatócitos e áreas de necrose. Nessa mesma espécie, as brânquias apresentaram mudanças nas células pavimentosas e de cloreto quando expostas às maiores concentrações de ATZ, influenciando o processo de osmorregulação (Mela et al., 2013). No peixe de água doce *Channa punctatus*, a ATZ provocou uma frequência elevada de micronúcleos e anormalidades nucleares, principalmente na concentração subletal de 8,4 mg L^{-1} durante 7 dias de exposição (Nwani et al., 2011). Este herbicida mostrou toxicidade aguda para a truta arco íris (*Onchorhynchus mykiss*), para o peixe-gato (*Ictalurus punctatus*), assim como para o sapo leopardo (*Rana pipiens*) e sapo americano (*Bufo americanus*) na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ (Orton et al., 2006). No peixe de água doce Curimatá (*Prochilodus lineatus*), a exposição à 2 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ATZ durante 24 e 48 h inibiu as enzimas antioxidantes e de biotransformação no fígado, assim como levou a danos genotóxicos em diferentes tipos celulares (Santos e Martinez, 2012). Esta espécie também

apresentou alterações na osmolalidade e uma diminuição da atividade branquial da enzima anidrase carbônica após exposição crônica a $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ, bem como alterações morfológicas nas brânquias após exposição a 10 e $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ durante 48 h (Paulino et al., 2012). A exposição a 5, 10 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ deste herbicida durante 7 dias levou a um aumento da peroxidação lipídica, assim como declínio de proteínas totais no fígado e músculos em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) (Dornelles e Oliveira, 2014). No peixe de água doce, *Tor grypus* a exposição crônica a concentrações subletais de ATZ levou a uma diminuição nos parâmetros hematológicos (hemoglobina, hematócrito e RBC) (Zadeh et al. 2016). No trabalho de Blahova e colaboradores (2013), a exposição do peixe-zebra (*Danio Rerio*) ao herbicida, em diferentes concentrações (0,3, 3, 30 e $90 \mu\text{g L}^{-1}$), causou uma diminuição na atividade da glutathione S-transferase e catalase e um aumento na atividade da superóxido dismutase. Como vários estudos apontam os efeitos deletérios da ATZ, a investigação sobre tecnologias que minimizem seus impactos no ambiente e em organismos não alvos, sem prejudicar a sua atividade no controle de plantas invasoras, é algo de grande relevância.

1.2. Atrazina Nanoencapsulada

Com o objetivo de minimizar a contaminação dos recursos naturais por ATZ, sistemas de liberação controlada para este herbicida com base em diferentes tipos de nanopartículas poliméricas foram desenvolvidos, como as nanocápsulas (Fig. 2). Estes sistemas apresentam boa estabilidade físico-química e são de fácil reprodutibilidade, podem ser preparados utilizando polímeros biodegradáveis e possuem compatibilidade com uma ampla variedade de substâncias (Grillo et al., 2012a, 2014,

2015; Pereira et al., 2014). As nanocápsulas são sistemas vesiculares que agem como um reservatório, armazenando substâncias bioativas em seu interior líquido (água ou óleo), envolvidas por um material sólido, o polímero (Grillo et al., 2012b).

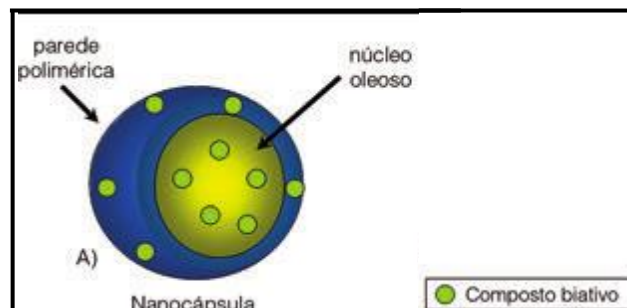


Figura 2. Representação esquemática de um corte transversal de nanocápsulas poliméricas. Fonte: Grillo et al. (2012b).

Com um grande potencial para utilização na agricultura, as nanocápsulas preparadas com poli (ϵ -caprolactona) ou PCL estão sendo empregadas como um sistema transportador para a ATZ (Grillo et al., 2012a; Pereira et al., 2014). O PCL é um polímero semicristalino, solúvel em vários solventes orgânicos e é empregado para a preparação de nanopartículas como veículos de compostos biologicamente ativos sob a forma de nanoesferas e nanocápsulas, sendo utilizado devido as suas propriedades físicas e químicas, de biodegradabilidade e de biocompatibilidade (Pereira et al., 2014; Sinha et al., 2004).

Pereira e colaboradores (2014) já mostraram que o encapsulamento da ATZ foi eficiente. O herbicida encapsulado não causou danos ao milho (*Zea mays*), um organismo não-alvo e ao mesmo tempo mostrou ser mais eficaz contra o organismo alvo (*Brassica sp*), em comparação com o herbicida livre, indicando aumento da biodisponibilidade do princípio ativo. Em outro trabalho desenvolvido com plantas de mostarda (*Brassica juncea*), uma espécie alvo, as nanocápsulas poliméricas contendo ATZ foram 10 vezes mais eficazes no controle do desenvolvimento dessa planta em

comparação com a ATZ livre (Oliveira et al., 2015a). Além disso, a ATZ nanoencapsulada não produziu efeitos colaterais persistentes para o milho (*Zea mays*), espécie não-alvo, mostrando que esse sistema pode oferecer uma ferramenta segura para o controle de plantas invasoras sem afetar o crescimento da cultura (Oliveira et al., 2015b). Outro trabalho realizado com diferentes organismos alvos mostra que a ATZ nanoencapsulada foi mais eficaz no controle de Caruru (*Amaranthus viridis*) e picão preto (*Bidens pilosa*) em relação a ATZ (Souza et al., 2018). Além disso, o uso de nanocápsulas de PCL carregadas com ATZ diluídas 10 vezes resultou na mesma eficácia de sua formulação comercial na dose padrão de ATZ (Oliveira et al., 2015b; Souza et al., 2018).

Entretanto, para a sua utilização segura, estudos que investiguem a toxicidade das nanocápsulas da ATZ para organismos não-alvo são essenciais. Para o microcrustáceo *Daphnia similis*, a ATZ nanoencapsulada apresentou uma maior toxicidade do que o herbicida livre. Contudo, nos testes citogenéticos, utilizando culturas de linfócitos humanos, o encapsulamento reduziu a extensão dos danos e no teste com a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* a utilização do herbicida encapsulado reduziu a inibição de seu crescimento (Clemente et al., 2014). As formulações de nanocápsulas e nanoesferas contendo a ATZ produziram menos aberrações cromossômicas na cebola (*Allium cepa*) em comparação com a ATZ livre, indicando que a associação do princípio ativo com o sistema transportador foi capaz de diminuir os danos ao DNA (Pereira et al., 2014). Da mesma forma, Grillo e colaboradores (2012a) observaram nos testes de genotoxicidade utilizando linfócitos humanos e células de cebola (*Allium cepa*) que a ATZ nanoencapsulada era menos tóxica do que o herbicida na sua formulação convencional.

Nesse contexto, pesquisas na área de ecotoxicologia que investiguem os efeitos que as nanopartículas contendo agrotóxicos podem apresentar sobre organismos não-alvos são essenciais para a sua utilização segura na agricultura.

1.3. Modelos biológicos para estudos ecotoxicológicos

Dentre os vários grupos de organismos que podem ser utilizados como modelos biológicos, os peixes destacam-se, pois, muitas espécies apresentam biologia e fisiologia conhecidas, se mostram sensíveis a exposição a xenobióticos e apresentam alto valor social e cultural (Flotemersch et al., 2006).

No presente trabalho, o modelo biológico escolhido foi a espécie de teleosteo neotropical *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Fig. 3). Este peixe é popularmente conhecido como curimba ou curimbatá, pertencente à ordem Characiformes, família *Prochilodontidae* e superordem Ostariophysi. A escolha para este estudo residiu no fato dessa espécie ser muito utilizado na alimentação humana, também por tratar-se de uma espécie de biologia e fisiologia conhecidas e ser bastante sensível a diversos xenobióticos. Esta espécie já foi alvo de muitos estudos de toxicidade (Carvalho et al., 2015; Cavalcante, et al., 2008; Langiano e Martinez, 2008; Nascimento et al., 2012; Palermo et al., 2015; Ribeiro et al., 2013; Simonato et al., 2016), como também foi utilizado em testes de toxicidade com o herbicida ATZ (Paulino et al., 2012; Santos e Martinez, 2012), com isso, foi escolhido como modelo experimental para este estudo com atrazina nanoencapsulada.



Figura 3: Juvenil de *Prochilodus lineatus*.

2. OBJETIVO

2.2. Objetivo geral

Investigar os efeitos da atrazina nanoencapsulada e comparar com os efeitos de sua formulação convencional, assim como avaliar a toxicidade das nanocápsulas sem o ativo em diferentes concentrações e tempos de exposição, sobre biomarcadores genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos do peixe *Prochilodus lineatus*.

2.3. Objetivos específicos

- Verificar se ATZ nanoencapsulada promove alterações nos parâmetros hematológicos (hematócrito, número de eritrócitos e hemoglobina) de *P. lineatus*;
- Analisar se a exposição a ATZ nanoencapsulada induz um aumento de danos no DNA, na formação de micronúcleo e de alterações eritrocíticas nucleares em eritrócitos de *P. lineatus*;
- Avaliar se após as exposições ocorrem alterações nas concentrações de glicose, e dos íons cloreto, sódio, potássio, cálcio e magnésio no plasma;

- Investigar se o herbicida nanoencapsulado pode causar alterações na atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA); H^+ -ATPase; Ca^{2+} -ATPase e anidrase carbônica (AC) nas brânquias de *P. lineatus*;
- Verificar se as exposições promovem danos oxidativos (PCO, LPO), alterações na atividade das enzimas de biotransformação de fase 1 (EROD) e fase 2 (GST), no conteúdo de GSH, assim como alterações nas defesas enzimáticas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) no fígado de *P. lineatus*.

REFERÊNCIAS

- Allen J.I., Moore M.N., 2004. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marin. Environ. Res.* 58, 227–232.
- Arora S., Mukherjee I., Kumar A., Garg D.K., 2014. Comparative assessment of pesticide residues in grain, soil, and water from IPM and non-IPM trials of basmati rice. *Environ. Monit. Asses.* 186, 361–366.
- Blahova J., Plhalova L., Hostovsky M., Divisova L., Dobsikova R., Mikulikova I., Svobodova Z., 2013. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *Food Chem. Toxicol.* 61, 82–85.
- Boehm A.L.L., Zerrouk R., Fessi H., Poly epsilon-caprolactone nanoparticles containing a poorly soluble pesticide: formulation and stability study. *J. Microencapsul.* 17, 195-205.

- Campos-Garcia J., Martinez D.S., Alves O.L., Leonardo A.F., Barbieri E., 2015. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: Nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 131-137.
- Carvalho C.S., Bernusso V.A., Fernandes M.N., 2015. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). *Aquat. Toxicol.* 167, 220-227.
- Cavalcante D.S.M., Martinez C., Sofia S., 2008. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. Muta.*, 655, 41-46.
- Cerejeira M.J., Viana P., Batista S., Pereira T., Silva E., Valério M.J., Silva-Fernandes A.M., 2003. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water. Res.* 37, 1055–1063.
- Cheng M., Zeng G., Huang D., Lai C., Xu P., Zhang C., Zhu Y., 2016. Degradation of atrazine by a novel Fenton-like process and assessment the influence on the treated soil. *J. Hazard. Mater.* 312, 184–191.
- Clemente Z., Grillo R., Jonsson M., Santos N.Z., Feitosa L.O., Lima R., 2014. Ecotoxicological evaluation of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules containing triazine herbicides. *J. Nano. Nanotec.*, 14 4911–4917.
- Colin N., Porte C., Fernandes D., Barata C., Padrós F., Carrassón M., Monroy M., Cano-Rocabayera O., Sostoa A., Pina B., Maceda-Veiga A., 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Sci. Total Environ.* 540, 307-323.
- de Oliveira J.L., Campos E.V.R., da Silva C.G.M., Pasquoto T., Lima R., Fraceto L.F., 2015. Solid Lipid Nanoparticles Co-loaded with Simazine and Atrazine: Preparation,

- Characterization, and Evaluation of Herbicidal Activity. *J. Agr. Food Chem.* 63, 422-432.
- Dewulf J., Benini L., Mancini L., Sala S., Blengini G.A., Ardente F., 2015. Rethinking the area of protection “natural resources” in life cycle assessment. *Environ. Sci. Technol.* 49, 5310–5317.
- Dornelles M.F., Oliveira G.T., 2014. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 415–429.
- Ehrsam M., Knutie S.A., Rohr J.R., 2016. The herbicide atrazine induces hyperactivity and compromises tadpole detection of predator chemical cues. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 2239-2244.
- Flotemersch, J.E., Stribling, J.B., Paul, M.J., 2006. Concepts and Approaches for the Bioassessment of Non-wadeable Streams and Rivers. Cincinnati, Ohio: US Environmental Protection Agency.
- Forbes V.E., Palmqvist A., Bach L. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 272–280.
- Fraceto L.F., Grillo R., de Medeiros G.A., Scognamiglio V., Rea G., Bartolucci C., 2016. Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have? *Front. Environ. Sci.* 4, 20.
- Glaesner N., Baelum J., Strobel B.W., Jacobsen C.S., 2014. Ageing of atrazine in manure amended soils assessed by bioavailability to *Pseudomonas sp.* strain ADP. *Biodegradation* 25, 217–225.
- Grillo R., Abhilash P.C., Fraceto L.F., 2016. Nanotechnology applied to bio-encapsulation of pesticides. *J. Nano. Nanotechnol.* 16, 1231-1234.

- Grillo R., Clemente Z., de Oliveira J.L., Campos E.V.R., Chalupe V.C., Jonsson C.M., 2015. Chitosan nanoparticles loaded the herbicide paraquat: the influence of the aquatic humic substances on the colloidal stability and toxicity. *J. Hazard. Mater.* 286, 562–572.
- Grillo R., Dos Santos N.Z.P., Maruyama C.R., Rosa A.H., De Lima R., Fraceto L. F., 2012a. Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: physicochemical characterization and genotoxicity evaluation. *J. Hazard. Mater.* 231, 1–9.
- Grillo R., Rosa A.H., Fraceto L.F., 2014. Poly(caprolactone) nanocapsules carrying the herbicide atrazine: effect of chitosan-coating agent on physicochemical stability and herbicide release profile. *Intern. J. Environ. Sci. Technol.* 11, 1691–1700.
- Grillo R., Souza P.M.S., Rosa A.H., Fraceto L.F., 2012b. Nanopartículas poliméricas como sistemas de liberação para herbicidas. In: GRAEFF C. *Nanotecnologia Ciência e Engenharia*. São Paulo: Cultura Acadêmica, 83-123.
- Hassan N.M., Nemat A.M.M., 2005. Oxidative stress in herbicide treated broad bean and maize plants. *Acta. Physiol. Plant.* 27, 429–438.
- He X., Hwang H. M., 2016. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *J. Food Drug Anal.* 24, 671–681.
- Huang H., Zhang S., Wu N., Luo L., Christie P., 2009. Influence of *Glomus etunicatum/Zea mays mycorrhiza* on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure. *Soil Biol. Biochem.* 41, 726–734.
- IBAMA, 2017. Boletim 2016: Os 10 ingredientes ativos mais vendidos. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. In: Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil.

- Jablonowski N.D., Ko P.P., Chen S., Hofmann D., Schaffer A., Burauel P., 2009. Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. *Environ. Pollut.* 157, 2126–2131.
- Jablonowski N.D., Schaffer A., Burauel P., 2011. Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raises questions about the use of atrazine. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 328–331.
- Jiang Z., Ma B., Erinle K. O., Cao B., Liu X., Ye S., Zhang Y., 2016. Enzymatic antioxidant defense in resistant plant: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum during long-term atrazine exposure. *Pestic. Biochem. Physiol.* 133, 59-66.
- Kah M., Beulke S., Tiede K., Hofmann T., 2013. Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. *Crit Rev. Env. Sci. Tec.* 43, 1823-1867.
- Kah M., Hofmann T., 2014. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environ. Int.* 63, 224-235.
- Kang Y., Khan S. e Ma X., 2009. Climate change impacts on crop yield, crop water productivity and food security – A review. *Prog. Nat. Sci.* 19, 1665–1674.
- Karlsson A.S., Weihermuller L., Tappe W., Mukherjee S., Spielvogel S., 2016. Field scale boscalid residues and dissipation half-life estimation in a sandy soil. *Chemosphere.* 145, 163–173.
- Kumar S., Bhanjanaa G., Sharmaa A., Sidhub M.C., Dilbaghi N., 2014. Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 101, 1061-1067.
- Kumar V., Upadhyay N., Singh S., Singh J., Kaur P., 2013. Thin-layer chromatography: comparative estimation of soil's atrazine. *Curr. World. Environ.* 8,469–472.

- Langiano V.C., Martinez C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*. 147, 222-231.
- Li X., Wu T., Huang H., Zhang S., 2012. Atrazine accumulation and toxic responses in maize (*Zea mays*). *J. Environ. Sci.* 24, 203–208.
- Liu R., Lal R., 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Sci. Total Environ.* 514,131–139.
- Luvisi A., 2016. Electronic identification technology for agriculture, plant, and food. A review. *Agron. Sust. Devel.* 36, 13.
- Mahía J., Martín A., Carballas T., Díaz-Raviña M., 2007. Atrazine degradation and enzyme activities in an agricultural soil under two tillage systems. *Sci. Total Environ.* 378, 187–194.
- Mahler B.J., Van Metre P.C., Burley T.E., Loftin K.A., Meyer M.T., Nowell L.H., 2017. Similarities and differences in occurrence and temporal fluctuations in glyphosate and atrazine in small Midwestern streams (USA) during the 2013 growing season. *Sci. Total Environ.* 579, 149–158.
- Marins A.T., Rodrigues C.C.R, Menezes C.C., Gomes J.L.C., Costa M.D., Nunes M.E.M, Vieira M.S., Donato F.F., Zanella R., Silva L.P., Loro V.L., 2018. Integrated biomarkers response confirm the antioxidant role of diphenyl diselenide against atrazine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 151, 191-198.
- Mela M., Guiloski I.C., Doria H.B., Randi M.A.F., de Oliveira Ribeiro C.A., Pereira L., de Assis H.S., 2013. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 13–21.

- Mishra S., Singh H.B., 2015. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1097–1107.
- Morales-Pérez A.A., Arias C., Ramírez-Zamora R.M., 2016. Removal of atrazine from water using an iron photo catalyst supported on activated carbon. *Adsorption* 22, 49–58.
- Nakka S., Godar A.S., Thompson C.R., Peterson D.E., Jugula M., 2017. Rapid detoxification via glutathione S-transferase (GST) conjugation confers a high level of atrazine resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Pest. Manag. Sci.* 73, 2236 – 2243.
- Nascimento C.R.B., Souza M.M., Martinez C.B.R., 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 155, 456-461.
- Nemat A.M.M., Hassan N.M., 2006. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. *Plant. Phys. Biochem.* 44, 202–210.
- Nuruzzaman M., Rahman M.M., Liu Y., Naidu R., 2016. Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. *J. Agr. Food Chem.* 64, 1447–1483.
- Nwani C.D., Nagpure N.S., Kumar R., Kushwaha B., Kumar P., Lakra W.S., 2011. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 314–322.

Oliveira H.C., Stolf-Moreira R., Martinez C.B., Grillo R., de Jesus M.B, Fraceto L.F, 2015b. Nanoencapsulation Enhances the Post-Emergence Herbicidal Activity of Atrazine against Mustard Plants. *Plos One*, 10.

Oliveira H.C., Stolf-Moreira R., Martinez C.B., Souza G.F.M., Grillo R., de Jesus M.B, Fraceto L.F, 2015a. Evaluation of the side effects of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules containing atrazine toward maize plants. *Front. Chem.* 3, 61.

Orton F., Carr J.A., Handy R.D., 2006. Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 65–71.

Palermo F.F., Risso W.E., Simonato J.D, Martinez C.B.R., 2015. Bioaccumilation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116, 19-28.

Parisi C., Vigani M., Rodríguez-Cerezo M., 2015. Agricultural Nanotechnologies: What are the current possibilities? *Nano Today* 10, 124-127.

Paulino M.G., Sakuragui M.M., Fernandes M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 86, 1–7.

Pereira A.E., Grillo R., Mello N.F., Rosa A.H., Fraceto L.F., 2014. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. *J. Hazard. Mater.* 268, 207–215.

Powell E.R., Faldladdin N., Rand A.D., Pelzer D., Schrunk E.M, Dhanwada K.R., 2011. Atrazine exposure leads to altered growth of HepG2 cells. *Toxicol. in Vitro.* 25, 644–651.

- Ribeiro A.M., Risso W.E., Fernandes M.N., Martinez C.B.R., 2013. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. *Fish Physiol. Biochem.* 40, 645-657.
- Santos T.G. e Martinez C.B., 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a neotropical fish species. *Chemosphere* 89, 1118–1125.
- Schwab A.P., Splichal P.A., Banks M.K., 2006. Persistence of atrazine and alachlor in ground water aquifers and soil. *Water Air Soil Pollut.* 171, 203–235.
- Sekhon B. S., 2014. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 7,31–53.
- Shang Q., Shi Y.L., Zhang Y.H., Zheng T., Shi H.Y., 2013. Pesticide-conjugated polyacrylate nanoparticles: novel opportunities for improving the photostability of emamectin benzoate. *Polym. Advan. Technol.* 24, 137-143.
- Simonato J.D., Mela M., Doria H.B., Guiloski I.C., Randi M.A.F., Carvalho P.S.M., Meletti P.C., Silva De Assis H.C., Bianchini A., Martinez C.B.R., 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 170, 31-41.
- Singh S., Kumar V., Chauhan A., Datta S., Wani A. B., Singh N., Singh J., 2017. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. *Environ. Chem. Lett.*, 1-27.
- Sinha V.R., Bansal K., Kaushik R., Kumria R., Trehan A. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Intern. J. Pharma.* 278, 1–23.
- Sousa G.F.M., Gomes D.G, Campos E.V.R., Oliveira J.L., Fraceto L.F., Stolf-Moreira R., Oliveira H.C., 2018. Post-Emergence Herbicidal Activity of Nanoatrazine Against Susceptible Weeds. *Front. Environ. Sci.* 6.

- Su Y.H., Zhu Y.G., 2006. Bioconcentration of atrazine and chlorophenols into roots and shoots of rice seedlings. *Environ. Pollut.* 139, 32–39.
- Sui Y., Yang H., 2013. Bioaccumulation and degradation of atrazine in several *Chinese ryegrass* genotypes. *Environ. Sci.* 15, 2338–2344.
- Szigeti Z., Lehoczki E., 2003. A review of physiological and biochemical aspects of resistance to atrazine and paraquat in Hungarian weeds. *Pestic. Manag. Sci.* 59, 451–458.
- Tong Y., Wu Y., Zhao C., Xu Y., Lu J., Xiang S., Zong F., Wu X., 2017. Polymeric nanoparticles as metolachlor carrier: water-based formulation for hydrophobic pesticides and absorption by plants. *J. Agric. Food Chem.* 65, 7371-7378.
- Vieira C.E.D., Costa P.G., Lunardelli B., Oliveira L.F., Cabrera L.C., Risso W.E., Primel E.G., Meletti P.C., Fillman G., Martinez C.B.R., 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Sci. Total Environ.* 542, 44-56.
- Vonberg D., Vanderborght J., Cremer N., Putz T., Herbst M., Vereecken H., 2014. 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water Res.* 50, 294–306.
- Wang P., Lombi E., Zhao F., Kopittke P.M., 2016. Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends Plant. Sci.* 21, 699-712.
- Wiens J.A., 2016. Population growth, in *Ecological Challenges and Conservation Conundrums*, ed. by Wiens JA. John Wiley & Sons, Chichester, 105–108.
- Zadeh A.K., Sohrab A.D., Alishahi M., Khazaei S.H., Asgari H.M., 2016. Evaluation of acute and sub-lethal toxicity of herbicide, atrazine, on hematological parameters of *Tor grypus*. *J. Vet. Res.* 71, 295–301.

3. Manuscrito

A ATRAZINA NANOENCAPSULADA PODE PROMOVER ALTERAÇÕES EM BIOMARCADORES DO PEIXE *Prochilodus lineatus*?

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso
Garcia Cid (PR-445), Km 374, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil

O manuscrito foi preparado segundo as normas do periódico **Chemosphere**:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/362?generatepdf=true

RESUMO

A atrazina (ATZ) é um herbicida amplamente utilizado que possui um alto potencial para contaminar o ambiente e causar efeitos deletérios nos organismos não-alvo. Por isso, a investigação de tecnologias que minimizem seus impactos é de extrema relevância. Nesse contexto, sistemas de liberação controlada para ATZ com base em nanopartículas poliméricas foram desenvolvidos, como as nanocápsulas preparadas com poli (ϵ -caprolactona). O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da ATZ nanoencapsulada em comparação com a ATZ sobre biomarcadores do teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus*. Os peixes foram expostos durante 24 e 96 h a ATZ nanoencapsulada (nATZ) e a atrazina (ATZ) nas concentrações de 2 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, apenas às a nanocápsulas sem o ativo (NANO) nas quantidades correspondentes ou apenas a água desclorada (CTR). Os resultados mostraram que a ATZ nanoencapsulada se mostrou menos tóxica em comparação com a ATZ, pois não promoveu aumento na glicemia, alterações na atividade das enzimas antioxidantes, no conteúdo de glutatona, na atividade da enzima anidrase carbônica e tampouco aumento na frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocíticas nucleares. Contudo a exposição à nATZ, assim como a ATZ e as nanocápsulas, resultou em redução no conteúdo de hemoglobina, no aumento do escore de danos no DNA de eritrócitos, como também na alteração da atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase, levando à diminuição do Ca^{2+} plasmático. A análise integrada dos biomarcadores, por meio do cálculo do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR), mostrou que a exposição a ATZ promoveu alterações em um maior número de biomarcadores, em comparação com a ATZ nanoencapsulada, indicando que a encapsulação do herbicida protegeu o animal dos efeitos da ATZ.

Palavras-chave: herbicida, nanotecnologia, antioxidantes, danos no DNA, estresse oxidativo.

3.1 INTRODUÇÃO

A atrazina (ATZ) é um herbicida de triazina sintética amplamente utilizado devido ao seu baixo custo, sendo aplicada para o controle de plantas invasoras nos cultivos de cana-de-açúcar, trigo, sorgo, nozes e milho (Singh et al., 2017). A ATZ inibe a fotossíntese, gerando estresse oxidativo (Nakka et al., 2017). Embora sua utilização tenha sido proibida em vários países, a ATZ continua a ser um dos agrotóxicos mais utilizados nos Estados Unidos e no resto do mundo (Ehram et al., 2016). No Brasil este herbicida ocupa a quarta colocação no ranking dos 10 ingredientes ativos mais vendidos no ano de 2016 (IBAMA, 2017). Devido à alta persistência e mobilidade no ambiente, a ATZ possui um alto potencial de contaminar não só a produção agrícola, mas também o solo, águas superficiais e subterrâneas (Cerejeira et al., 2003; Kumar et al., 2013; Schwab et al., 2006).

Alguns trabalhos já mostraram que organismos aquáticos, como bivalves (Santos e Martinez, 2014) e peixes são sensíveis aos efeitos da atrazina (Blahova et al., 2013; Mela et al., 2013; Nwani et al., 2011; Zadeh et al. 2016). Trabalhos anteriormente realizados com o teleósteo de água doce *Prochilodus lineatus* mostraram que a exposição à ATZ inibiu as enzimas antioxidantes e de biotransformação no fígado, levou a danos genotóxicos em diferentes células, alterações na osmolalidade plasmática e uma diminuição da atividade branquial da enzima anidrase carbônica, bem como alterações morfológicas nas brânquias (Paulino et al., 2012; Santos e Martinez, 2012). Como vários estudos apontam os efeitos deletérios da ATZ, a investigação sobre tecnologias que minimizem seus impactos no

ambiente e em organismos não-alvo, sem prejudicar a sua atividade no controle de plantas invasoras, é algo de grande relevância.

A implementação da nanotecnologia na agricultura tem o intuito de melhorar a saúde vegetal, qualidade do produto, segurança alimentar e o rendimento agrícola (Luvisi, 2016), permitindo um potencial desenvolvimento da agricultura em todas as suas fases de produção, desde o cultivo até a distribuição de alimentos (Fraceto et al., 2016; Mishra et al., 2017). O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para agrotóxicos está destinado a melhorar sua segurança e eficácia (Parisi et al., 2015; Sekhon, 2014). As nanopartículas (NP) permitem uma liberação mais controlada, mais específica no alvo e a utilização de concentrações otimizadas. (Wang et al., 2016). Com isso, permitem reduções na dosagem de aplicação de agrotóxicos e na frequência de sua utilização, e assim diminuem os riscos para os organismos não-alvo e para o ambiente (Kah et al., 2013; Kah e Hofmann, 2014). Vários trabalhos têm mostrado que a utilização de nanopartículas como sistemas transportadores para agrotóxicos resultam no aumento de sua eficácia no organismo alvo e diminuição de sua toxicidade a organismos não-alvo (de Oliveira et al., 2015; Kumar et al., 2014; Shang et al., 2013; Tong et al., 2017).

Sistemas de liberação para a ATZ com base em nanopartículas poliméricas foram desenvolvidos, como as nanocápsulas preparadas com poli (ϵ -caprolactona) (Grillo et al., 2012; Pereira et al., 2014). O PCL é um polímero semicristalino, solúvel em vários solventes orgânicos e empregado para a preparação de nanopartículas como veículos de compostos biologicamente ativos, sendo utilizado devido as suas de biodegradabilidade e de biocompatibilidade (Pereira et al., 2014; Sinha et al., 2004).

Pereira e colaboradores (2014) já mostraram que o encapsulamento da ATZ foi eficiente. O herbicida encapsulado não causou danos ao milho (*Zea mays*), um organismo não-alvo, e ao mesmo tempo mostrou ser mais eficaz contra o organismo-alvo (*Brassica sp.*), em comparação com o herbicida livre, indicando aumento da biodisponibilidade do princípio ativo. No trabalho desenvolvido com plantas de mostarda (*Brassica juncea*), uma espécie-alvo, as nanocápsulas poliméricas contendo ATZ foram 10 vezes mais eficazes no controle do seu desenvolvimento em comparação com a ATZ livre (Oliveira et al., 2015a). Além disso, no trabalho realizado com cultura de milho (*Zea mays*) (espécie não-alvo) a ATZ nanoencapsulada não produziu efeitos colaterais persistentes, mostrando que esse sistema pode oferecer uma ferramenta segura para o controle de plantas invasoras sem afetar o crescimento da cultura (Oliveira et al., 2015b). Outro trabalho realizado com diferentes organismos alvos mostra que a ATZ nanoencapsulada foi mais eficaz no controle de Caruru (*Amaranthus viridis*) e picão preto (*Bidens pilosa*) em relação a ATZ (Souza et al., 2018). Além disso, o uso de nanocápsulas de PCL carregadas com ATZ diluídas 10 vezes resultou na mesma eficácia de sua formulação comercial na dose padrão de ATZ (Oliveira et al., 2015b; Souza et al., 2018).

Entretanto, para a sua utilização segura é essencial estudos que investiguem a toxicidade das nanocápsulas da ATZ para organismos não-alvo fora da cultura. No estudo realizado com o microcrustáceo *Daphnia similis* a atrazina nanoencapsulada apresentou uma maior toxicidade do que o herbicida livre. Contudo, nos testes de citogenética, utilizando culturas de linfócitos humanos, o encapsulamento reduziu a extensão dos danos causados às células e no teste realizado com a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* a utilização do herbicida encapsulado reduziu a

inibição de seu crescimento (Clemente et al., 2013). No trabalho de Grillo e colaboradores (2012) observou-se nos testes de genotoxicidade utilizando linfócitos humanos e células de cebola (*Allium cepa*) que a ATZ nanoencapsulada era menos tóxica do que o herbicida na sua formulação convencional. Nesse contexto, pesquisas na área de ecotoxicologia que investiguem os efeitos que as nanopartículas podem apresentar sobre organismos não-alvo são essenciais para a sua utilização segura na agricultura. Com isso o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos da encapsulação da atrazina realizando uma comparação com sua formulação convencional, em diferentes concentrações e tempos de exposição, sobre biomarcadores genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos do peixe *P. lineatus*. Esse modelo biológico foi escolhido por se tratar de uma espécie de peixe nativa, de biologia e fisiologia conhecidas, muito utilizada na alimentação humana e sensível a diversos xenobióticos, dentre eles a atrazina (Paulino et al., 2012; Santos e Martinez, 2012).

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Modelo experimental

Exemplares juvenis de *Prochilodus lineatus* ($14,99 \pm 0,42$ cm e $24,40 \pm 5,09$ g; média \pm DP, n=160), fornecidos pela Piscicultura Acqua Norte (Cambará, PR, Brasil), foram aclimatados por no mínimo cinco dias em tanques de 300 L, contendo água desclorada e aeração constante, com fotoperíodo de 12 h/12 h. Durante a aclimação a renovação parcial da água foi realizada a cada 48 h e a alimentação ocorreu antes da renovação, sendo suspensa 24 h antes da montagem dos experimentos. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados (medidor multiparâmetro

Horiba) e mantiveram-se estáveis durante a aclimação (média \pm DP): temperatura $23,22 \pm 0,59$ °C; pH $7,83 \pm 0,16$; condutividade 260 ± 9 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e oxigênio dissolvido $6,9 \pm 1,06$ mg L^{-1} .

3.2.2. Experimentos e amostragem

Após a aclimação os peixes foram expostos, por 24 e 96 h, aos seguintes tratamentos: **controle (CTR)**, com peixes expostos apenas a água desclorada; **atrazina (ATZ)** com peixes expostos à atrazina livre (Atrazine PESTANAL®, 45330 SIGMA) nas concentrações de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ou $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (ATZ2 e ATZ20); **nanoatrazina (nATZ)**, com peixes expostos à atrazina nanoencapsulada, também nas concentrações de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ou $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (nATZ2 e nATZ20), preparadas a partir de uma solução estoque de $1 \text{ mg nATZ mL}^{-1}$ e **nanocápsulas (NANO)**, no qual os peixes foram expostos à água contendo apenas nanocápsulas de poli(epsilon-caprolactona) (PCL) sem a substância ativa (ATZ), em quantidade correspondente às utilizadas nos tratamentos de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ou $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (NANO2 e NANO20), preparadas a partir de uma solução estoque de $1 \text{ mg Nano mL}^{-1}$. As concentrações de ATZ testadas foram definidas considerando-se que $2 \mu\text{g L}^{-1}$ corresponde à concentração máxima de atrazina (ATZ) permitida pela Resolução CONAMA 357 (2005) para águas continentais e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ corresponde a uma concentração dez vezes acima da permitida.

Para cada concentração (2 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$) em cada tempo experimental (24 e 96 h) foram realizados experimentos independentes (4 experimentos no total), nos quais os quatro tratamentos (CTR, NANO, ATZ e nATZ) corriam simultaneamente. Em cada experimento foram utilizados dez peixes por tratamento ($n=10$), distribuídos em duas caixas (50 L de água), com cinco peixes em cada, totalizando duas réplicas por

tratamento para cada experimento. Durante as exposições, os parâmetros físicos e químicos da água se mantiveram estáveis (média \pm DP): temperatura $24,28 \pm 0,57$ °C; pH $7,83 \pm 0,15$; condutividade: 117 ± 19 $\mu\text{S cm}^{-1}$; oxigênio dissolvido: $7,12 \pm 0,57$ mg O₂ L⁻¹. Amostras de água foram coletadas de cada experimento, 1 hora após a adição das nanopartículas (NANO ou nATZ) e ao final do experimento (96h) para a sua caracterização.

Ao final de cada exposição os animais foram anestesiados em benzocaína 0,5%, pesados e medidos e o sangue foi retirado da veia caudal com o auxílio de seringas heparinizadas. Após os animais foram mortos por secção medular para a retirada das brânquias e fígado. Uma alíquota de sangue total foi utilizada para análises hematológicas e para realização do ensaio alcalino do cometa, assim como para a ocorrência de micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares. O restante do sangue foi centrifugado (1870 g, 15 min) e o plasma separado e armazenado em freezer (-20 °C) para as análises da concentração de íons e glicose. As amostras de brânquias e fígado foram congeladas em ultrafreezer (-80 °C) até a realização dos ensaios. As brânquias foram utilizadas para análise da atividade das enzimas envolvidas no transporte iônico. O fígado foi utilizado para análise da atividade das enzimas de biotransformação, defesas antioxidantes e ocorrência de danos oxidativos. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Processo CEUA nº 18819.2016.85).

3.2.3. Preparação e caracterização das nanocápsulas de poli(epsilon-caprolactona)

As nanocápsulas de PCL foram preparadas seguindo o protocolo descrito por Grillo et al. (2012). O método envolve essencialmente a mistura de uma fase orgânica

em uma fase aquosa. A fase orgânica foi composta por 100 mg de polímero (PCL), 30 mL de solvente orgânico (acetona), 200 mg de óleo (triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico, na forma de Myritol 318), 40 mg de surfactante de monostearato de sorbitano (Span 60) e 10 mg de atrazina. A fase aquosa foi composta por 30 mL de uma solução contendo 60 mg de surfactante de polissorbato 80 (Tween 80). Após a dissolução dos componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi lentamente inserida na fase aquosa, com agitação magnética. A suspensão resultante foi mantida sob agitação durante 10 minutos, após o solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotativo. A suspensão de nanopartículas foi evaporada até um volume final de 10 mL, resultando em uma concentração de ATZ de 1 mg mL^{-1} . As formulações foram armazenadas em frascos âmbar à temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$). As nanocápsulas sem ATZ foram preparadas seguindo o mesmo protocolo, mas sem adição de atrazina.

A distribuição de tamanhos e concentração das nanocápsulas nas amostras de água dos meios experimentais (NANO e NATZ), coletadas no início da exposição (t_0) e ao final do experimento (t_{96}), foram analisados por *Nanoparticles Tracking Analysis* (NTA) usando o NanoSight LM (Malvern Instruments, UK) em amostras não diluídas, em quintuplicada a 25°C , sendo que para cada medida foram contadas em média 4000 partículas. O tamanho médio (diâmetro hidrodinâmico) das nanocápsulas e o potencial de polidispersão (PDI) foram analisados nas amostras de água (t_0 e t_{96}) por espalhamento de luz dinâmico (DLS), no equipamento Zetasizer (Malvern ZS90), em triplicata a 25°C , com espalhamento de luz para detecção a um ângulo de 90° .

3.2.4. Biomarcadores genotóxicos

O ensaio alcalino do cometa com eritrócitos foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Singh et al. (1988), com modificações descritas por Vieira et al. (2016). As lâminas coradas com GelRed foram examinadas sob epifluorescência (Leica Microscope DM-2500, Alemanha) e os danos genotóxicos foram quantificados pela extensão da migração do DNA, que foi determinada visualmente em 100 nucleoides selecionados ao acaso em células não sobrepostas. Os danos foram classificados em quatro classes de cometa: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = comprimento da cauda menor que o diâmetro do nucleoide; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do nucleoide; classe 3 = comprimento da cauda maior que duas vezes o diâmetro do nucleoide. O valor de escore de danos no DNA foi obtido multiplicando-se o número de células em cada classe pelo valor da classe de cometa.

A frequência de micronúcleos (MN) e demais anormalidades eritrocíticas nucleares (AEN) foi determinada de acordo com a técnica descrita por Ueda et al. (1992). No momento da análise, cada lâmina foi corada com 0,003% de laranja de acridina no tampão de Sorenson a pH 6,8 e imediatamente analisada sob epifluorescência (Leica Microscope DM-2500, Alemanha) a uma ampliação de 1.000 x. Para cada peixe, foram analisadas 3.000 células, avaliando a presença de micronúcleos (MN), núcleo segmentado (NS), núcleo lobulado (NL) e núcleo em forma de rim (NR), de acordo com Carrasco et al. (1990). A frequência média de cada AEN (MN, NS, NL e NR), bem como a frequência de todas as AEN somadas, para cada grupo, foi calculada e expressa por 1000 células (‰).

3.2.5. Biomarcadores fisiológicos

Análises hematológicas. A determinação de hematócrito foi feita em microcapilares de vidro submetidos à centrifugação (1.200 g, 7 min), em uma centrífuga para micro capilar (Luguimac S.R.L., Modelo LC 5, Argentina) para a separação das células e do plasma, e assim obter a estimativa de porcentagem dessas células. A hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido), utilizando um kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil). A contagem do número de eritrócitos (RBC) foi realizada utilizando câmara de Neubauer sob microscópio óptico.

Concentrações plasmáticas de íons e glicose. A concentração de cloreto no plasma foi determinada através do kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil), pelo método de tiocianato de mercúrio. A determinação das concentrações de sódio e potássio foi realizada em fotômetro de chama (Digimed DM-62, Brasil). As concentrações de cálcio e magnésio foram determinadas em espectrômetro de absorção atômica (Perkin Elmer Analyst 700, Estados Unidos) com atomizador de chama. A concentração de glicose foi determinada utilizando um kit comercial colorimétrico (Labstest, Brasil), com base no método da glicose oxidase e foi lida em espectrofotômetro (Victor TM 3, PerkinElmer, Estados Unidos) a 550 nm.

Enzimas envolvidas no transporte de íons. As brânquias previamente limpas tiveram seus filamentos separados dos arcos branquiais e separados em duas partes para serem homogeneizados (10x do volume). Para a análise das atividades das Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) e H⁺-ATPase foi feita uma homogeneização em tampão SEID (150 mM sacarose, 10 mM 50 mM EDTA, imidazol, 2,4 mM desoxicolato sódico, pH 7,5) e posterior centrifugação (Hettich®, Universal 320R, Reino Unido) (7500 g, 15 min, 4°C).

O sobrenadante foi incubado com um tampão contendo ouabaína (inibidor da NKA) ou contendo NEM (inibidor da H⁺-ATPase) e foi estimada a produção de ADP proveniente da quebra de ATP durante um intervalo de 30 min (Gibbs e Somero, 1989). A atividade da enzima Ca²⁺-ATPase foi mensurada a partir de Tellis et al. (2013) e Vijayavel et al. (2007) com modificações. As amostras foram homogeneizadas (1:5 p/v) em tampão SEID, centrifugadas (Hettich®, Universal 320R, Reino Unido) (10000 g, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Sua atividade foi determinada pela quantificação de fosfato inorgânico liberado na amostra usando-se uma solução de coloração segundo Ames (1966) em leitora de microplacas (Bio-Tek Instruments, ELX 800, Estados Unidos) a 620 nm. Para o ensaio da atividade da anidrase carbônica (AC) ocorreu uma homogeneização em tampão (225 mM manitol, 75 mM sacarose, 10 mM Tris-base e 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) e centrifugação (Hettich®, Universal 320R, Reino Unido) (13600 g, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi adicionado em uma solução saturada de CO₂ e foi mensurada a redução de pH (Quimis, pHmetro - Q400AS, Brasil) resultante da liberação de H⁺ durante 20 segundos (Vitale et al., 1999).

3.2.6. Biomarcadores bioquímicos

O fígado foi homogeneizado (m/v: 1/10) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0) e centrifugado (Hettich®, Universal 320R, Reino Unido) (13000 g, 20 min, 4°C) para as análises bioquímicas.

Enzimas de biotransformação. A atividade da CYP1A foi determinada pela análise da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) a partir da medida do aumento progressivo da fluorescência resultante da conversão da 7-etoxiresorufina (ETOX) para resorufina, a cada minuto, durante 10 vezes em espectrofotômetro (Victor TM 3, PerkinElmer, Estados

Unidos) a 590 nm (Eggens et al., 1992). A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada a partir da complexação da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em espectrofotômetro (Victor TM 3, PerkinElmer, Estados Unidos) a 340 nm (Keen et al., 1976).

Defesas antioxidantes. A concentração do tripeptídeo glutathione (GSH), um antioxidante não enzimático, foi mensurada pela reação da glutathione com o substrato 5,5-ditiobis-ácido-nitrobenzóico (DTNB) formando tiolato, quantificado em espectrofotômetro (Victor TM 3, PerkinElmer, Estados Unidos) a 412 nm (Beutler et al, 1963). A atividade da catalase (CAT) foi mensurada a partir da decomposição do H₂O₂ monitorada pelo decaimento da absorbância ao longo do tempo em espectrofotômetro (SpectraMax, Plus 384, Estados Unidos) a 240 nm (Beutler, 1975). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da redução do citocromo c pelo ânion superóxido quantificado em espectrofotômetro (SpectraMax, Plus 384, Estados Unidos) a 550nm (McCord e Fridovich, 1969). A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi determinada pela oxidação do NADPH em presença H₂O₂ em espectrofotômetro (SpectraMax, Plus 384, Estados Unidos) a 340 nm (Hopkins e Tudhope, 1973).

Danos oxidativos. A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada por meio da quantificação de um de seus produtos (malondialdeído) pela reação com o ácido tiobarbitúrico (ensaio TBARS), em espectrofotômetro (Victor TM 3, PerkinElmer, Estados Unidos) a 530 nm (Camejo et al., 1998). A oxidação de proteínas foi mensurada pela quantificação de proteínas carboniladas (PCO) pela reação com o 2,4-dinitrofenildrazina (DNPH) formando hidrazonas detectadas em espectrofotômetro (Victor TM 3, PerkinElmer, Estados Unidos) a 360 nm (Levine et al., 1994).

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação das proteínas presentes na amostra com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. A curva de calibração foi feita com soro de albumina bovina (BSA) e a absorbância foi lida em leitora de Elisa (Bio-Tek Instruments, ELX 800, Estados Unidos) a 595 nm.

3.2.7. Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR)

Com base nos resultados dos biomarcadores, foi calculado um Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR), descrito por Beliaeff e Burgeot (2002) e modificado por Sanchez et al. (2013). Este índice é baseado no princípio do desvio da referência entre um estado perturbado e não perturbado (Sanchez et al., 2013). No presente trabalho, para o cálculo do IBR foram utilizados os biomarcadores que apresentaram alterações significativas e consistentes e os cálculos foram efetuados conforme descrito por Vieira et al. (2016). Resumidamente, para cada biomarcador individual, a razão entre o valor médio obtido em cada tratamento (NANO, ATZ e nATZ), em cada tempo e concentração, e o respectivo valor do controle (CTR) foi transformada em $\log_{10}(Y_i)$. No próximo passo, calculou-se uma média geral (μ) e desvio padrão (s), considerando todos valores de Y_i . Em seguida, os valores de Y_i foram padronizados pela fórmula: $Z_i = (Y_i - \mu)/s$ e a diferença entre Z_i e Z_0 (CTR) foi usada para definir o índice de desvio do biomarcador (A). Para obter um índice integrado de resposta de biomarcadores, o valor de A de cada biomarcador foi calculado para os diferentes tratamentos e o IBR foi calculado pela soma dos valores absolutos de A .

3.2.8. Análises estatísticas

Os resultados de cada um dos parâmetros analisados foram comparados entre os diferentes grupos (CTR x NANO X NANO ATZ X ATZ), para cada concentração e tempo experimental, por meio de análise de variância fator único (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis, de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Quando necessário, as diferenças foram localizadas pelo método de Holm-Sidak ou Dunn's. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Caracterização das nanocápsulas

A eficiência de encapsulação, estabilidade coloidal e as características físicas e químicas das nanocápsulas, com e sem atrazina, estão descritas em Grillo et al. (2012). As análises realizadas nas amostras de água, coletadas no início (t_0) e no final (t_{96}) dos experimentos mostraram que as concentrações de nanocápsulas sem atrazina (número de nanocápsulas. mL^{-1}), em suspensão, diminuíram do tempo inicial (NANO2: $1,45 \times 10^8$; NANO 20: $1,67 \times 10^8$) para o tempo final (NANO2: $8,03 \times 10^7$; NANO 20: $8,24 \times 10^7$), nos dois tratamentos testados (NANO 2 e NANO 20). O mesmo ocorreu para as nanocápsulas contendo ATZ, cujas concentrações no tempo inicial (nATZ2: $3,05 \times 10^8$; nATZ20: $1,58 \times 10^8$) foram maiores que aquelas ao final do experimento (nATZ2: $6,41 \times 10^7$; nATZ20: $1,11 \times 10^8$), em ambos tratamentos (nATZ2 e nATZ20). Os tamanhos médios das nanocápsulas sem atrazina não variaram entre o tempo inicial e final e permaneceram em 184,2 nm (NANO2) e 269 nm (NANO20), assim como para as nanocápsulas contendo ATZ do tratamento nATZ20 (265,5 nm). Já para as

nanocápsulas contendo ATZ, do tratamento nATZ2, o tamanho médio no t0 (326,3 nm) diminuiu no t96 (188,5 nm).

3.3.2. Biomarcadores fisiológicos

Dentre os parâmetros hematológicos analisados (Fig. 1), as variações mais consistentes entre os tratamentos ocorreram no conteúdo de hemoglobina. No tempo de 96h os peixes dos grupos NANO2, ATZ2 e nATZ2 apresentaram uma diminuição significativa no conteúdo de hemoglobina em relação ao seu respectivo CTR (F= 26,34), assim como os grupos ATZ20 e nATZ20 em relação ao seu CTR (F= 7,32) (Fig. 1A).

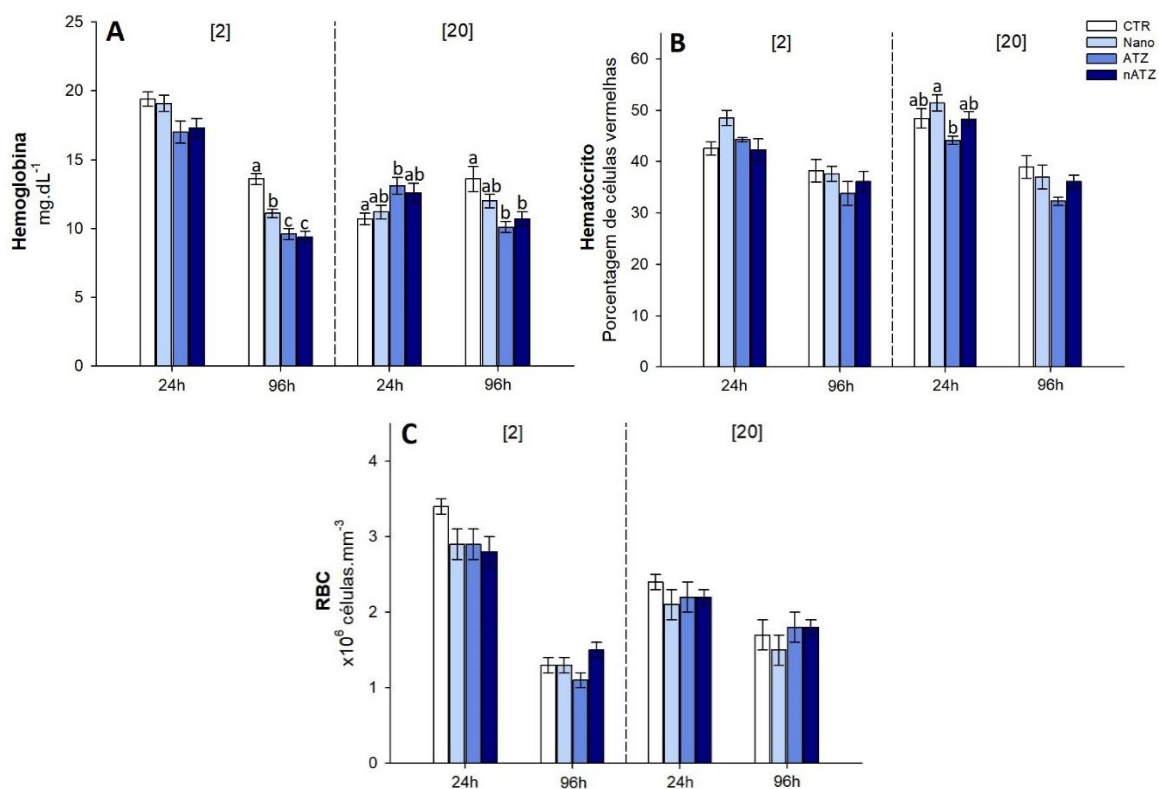
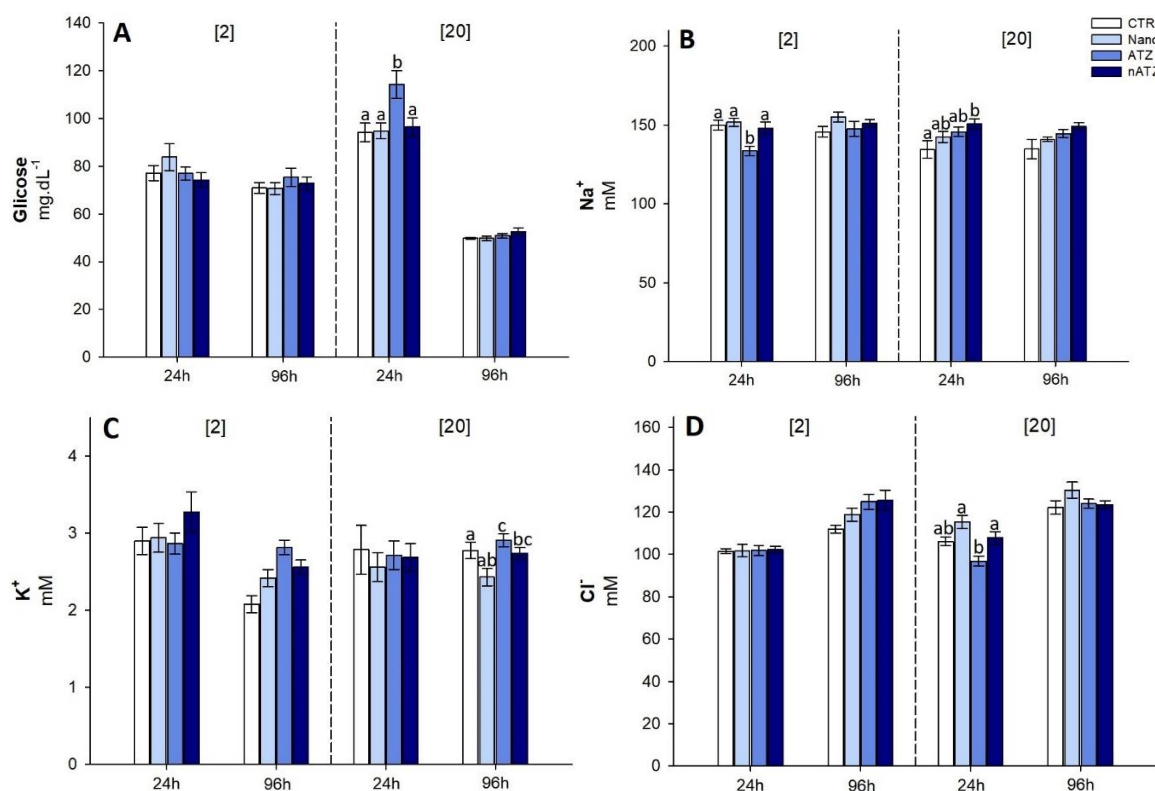


Fig. 1: Valores (média ± EP, n= 6-10) do conteúdo de hemoglobina (A) hematócrito (B) e número de eritrócitos (C) de *P. lineatus* expostos a concentração de 2 μg L⁻¹ e 20 μg L⁻¹ de nanocápsulas (NANO), atrazina (ATZ), e atrazina nanoencapsulada (nATZ) ou apenas à água (CTR), por 24 e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p ≤ 0,05) de um mesmo tempo experimental e mesma concentração.

Em relação à glicemia (Fig. 2A), foi observado apenas um aumento pontual nos peixes expostos a ATZ20 em relação ao seu respectivo CTR em 24h ($F= 5,43$). Dentre os íons plasmáticos, foram verificadas variações pontuais nas concentrações de Na^+ , K^+ e Cl^- (Figs. 2B, 2C e 2D). Já a concentração plasmática de Ca^{2+} variou de forma mais consistente (Fig. 2E), com uma redução significativa deste cátion nos peixes dos grupos NANO2, ATZ2 e nATZ2 em relação aos respectivos CTR, tanto após a exposição de 24h ($F= 17,07$) como de 96 h ($F= 57,77$); e nos peixes do grupo ATZ20 em relação ao seu CTR em 24h ($F= 4,95$). A concentração de magnésio plasmático não apresentou variação nas concentrações e tempos testados (Fig. 2F).



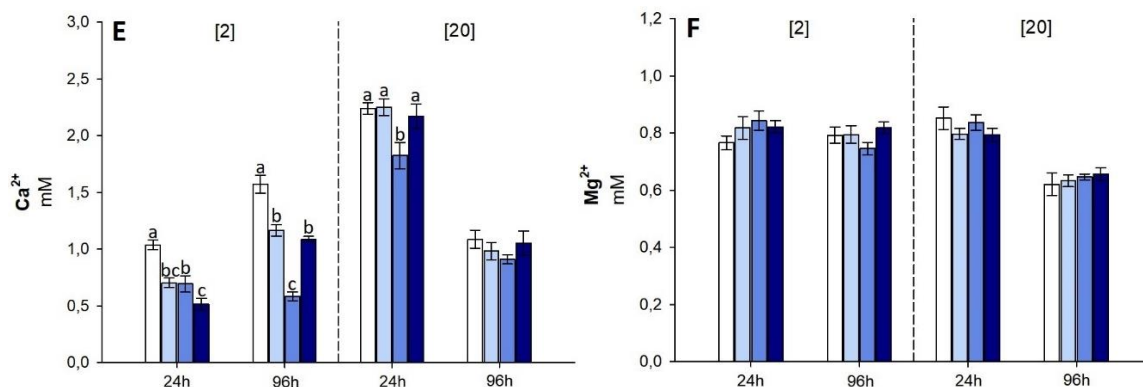
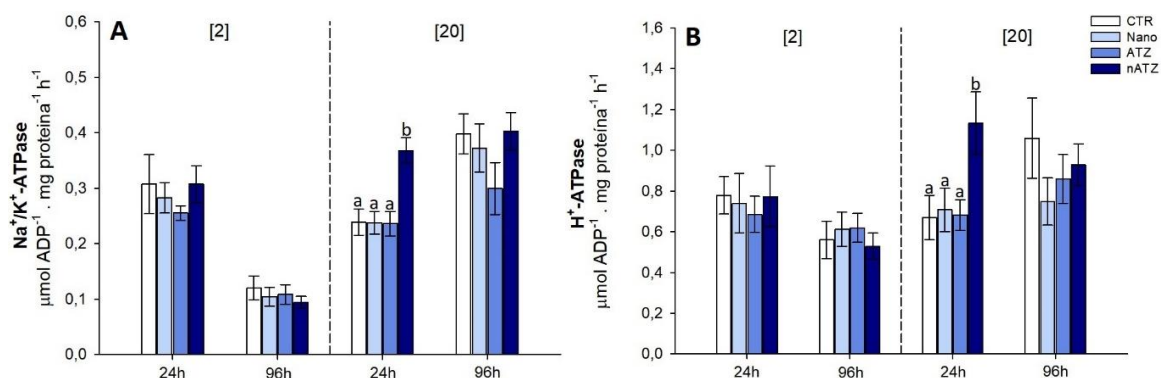


Fig. 2: Valores (média \pm EP, n= 6-10) da concentração plasmática de glicose (A), dos íons sódio (B), potássio (C), cloreto (D), cálcio (E) e magnésio (F) de *P. lineatus* expostos a concentração de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de nanocápsulas (NANO), atrazina (ATZ) e atrazina nanoencapsulada (nATZ), ou apenas à água (CTR), por 24 e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) de um mesmo tempo experimental e mesma concentração.

Os peixes expostos a nATZ20 durante 24h apresentaram valores significativamente maiores da atividade branquial das enzimas Na^+/K^+ -ATPase ($F= 8,62$) e H^+ -ATPase ($F= 4,75$) (Fig. 3B) em relação aos respectivos CTR (Figs. 3A e 3B). Por outro lado, em relação aos respectivos CTR, a atividade da Ca^{2+} -ATPase (Fig. 3C) foi significativamente menor nas brânquias dos peixes expostos aos tratamentos NANO2, ATZ2 e nATZ2, por 96h ($F= 11,88$) e nos peixes dos grupos NANO20 e ATZ20 em 24h ($F= 6,06$) e dos grupos nATZ20 e ATZ20 em 96h ($F= 5,79$) (Fig. 3C). Em relação à anidrase carbônica (Fig. 3D), os peixes do grupo ATZ2 apresentaram valores significativamente menores da atividade desta enzima após 96h ($F= 8,44$), enquanto valores significativamente maiores foram observados no grupo ATZ20, em 24 h ($F= 4,24$).



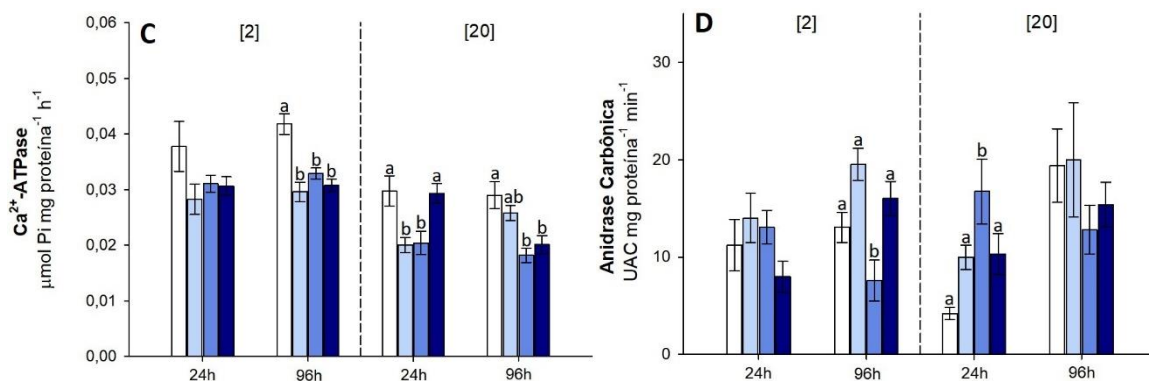
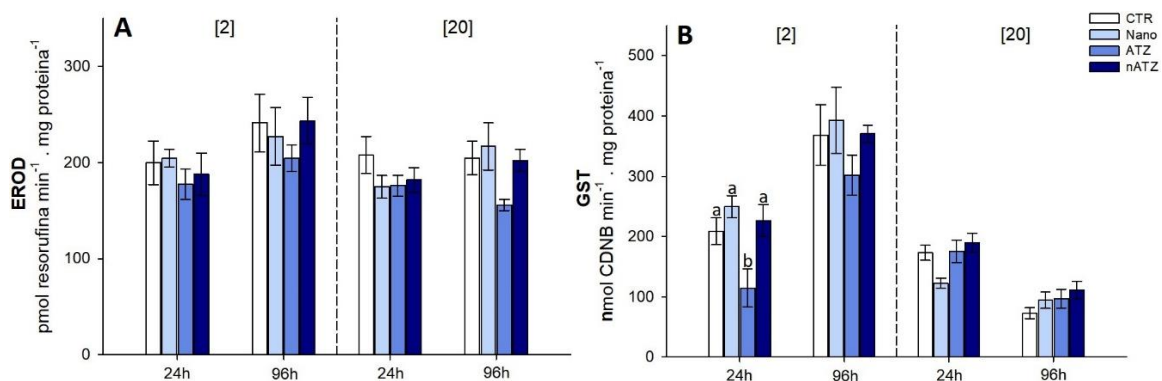


Fig. 3: Valores (média \pm EP, $n = 6-10$) da atividade enzimática branquial da Na^+/K^+ -ATPase (A), H^+ -ATPase (B), Ca^{2+} -ATPase (C) e Anidrase Carbônica (D) de *P. lineatus* expostos a concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de nanocápsulas (NANO), atrazina (ATZ) e atrazina nanoencapsulada (nATZ), ou apenas à água (CTR), por 24 e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) de um mesmo tempo experimental e mesma concentração.

3.3.3. Biomarcadores bioquímicos

A atividade hepática da CYP1A, a qual foi determinada pela análise EROD, não variou significativamente nos tratamentos e tempos testados (Fig. 4A). Os peixes expostos a ATZ2 por 24h apresentaram a atividade hepática da GST (Fig. 4B) significativamente menor em relação ao respectivo CTR ($F = 4,23$). Por outro lado, valores significativamente maiores de GSH (Fig. 4C) foram observados nos peixes expostos por 96h aos tratamentos ATZ2 ($F = 44,79$) e ATZ20 ($F = 31,12$).



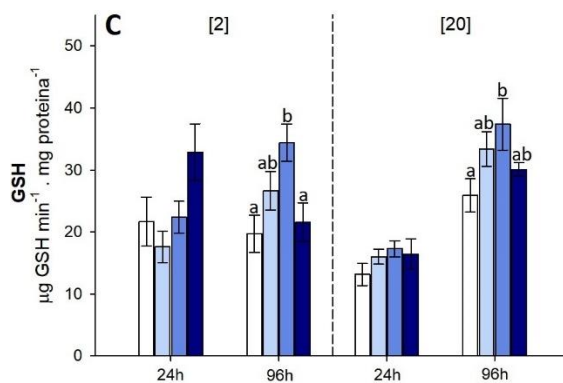
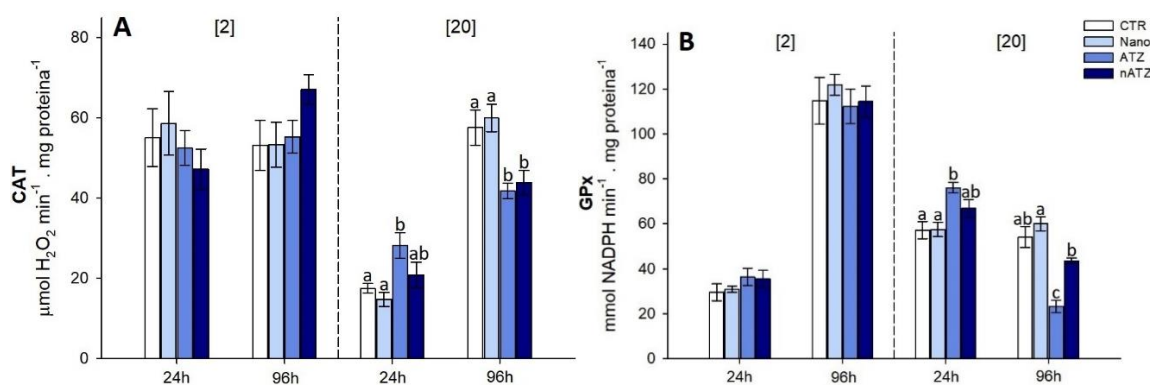


Fig. 4: Valores (média \pm EP, $n = 6-10$) da atividade enzimática da CYP1A (A), GST (B) e concentração hepática de GSH (C) de *P. lineatus* expostos a concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de nanocápsulas (NANO), atrazina (ATZ) e atrazina nanoencapsulada (nATZ), ou apenas à água (CTR), por 24 e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) de um mesmo tempo experimental e mesma concentração.

Em relação às enzimas antioxidantes primárias no fígado (Fig. 5), variações significativas em relação aos CTR foram observadas na atividade da CAT e GPx. Os peixes expostos a ATZ20 apresentaram a atividade da CAT (Fig. 5A) significativamente maior em 24h ($F = 4,88$), já em 96h a atividade da enzima foi significativamente menor nos grupos ATZ20 e nATZ20 ($F = 6,71$). Os peixes expostos a ATZ20 apresentaram a atividade da GPx (Fig. 5B) significativamente maior em 24h ($F = 7,06$) e significativamente menor em 96h ($F = 23,33$).



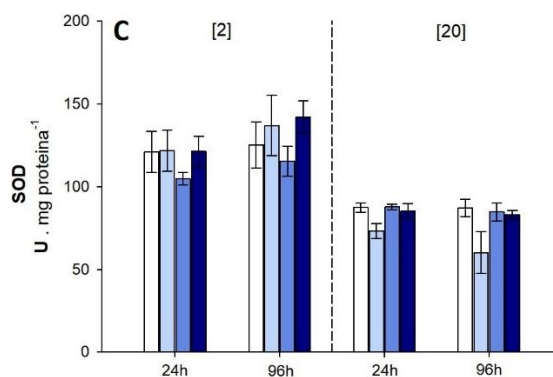


Fig. 5: Valores (média \pm EP, n= 6-10) da atividade hepática da enzima CAT (A), GPx (B) e SOD (C) de *P. lineatus* expostos a concentração de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de nanocápsulas (NANO), atrazina (ATZ) e atrazina nanoencapsulada (nATZ), ou apenas à água (CTR), por 24 e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) de um mesmo tempo experimental e mesma concentração.

Os danos oxidativos foram avaliados pela análise de LPO (Fig. 6A) e PCO (Fig. 6B) no fígado dos peixes. Os resultados indicaram apenas valores significativamente maiores de LPO nos peixes expostos a ATZ2 durante 24h ($F= 0,34$). Já a PCO não apresentou variação significativa nos tratamentos e tempos testados.

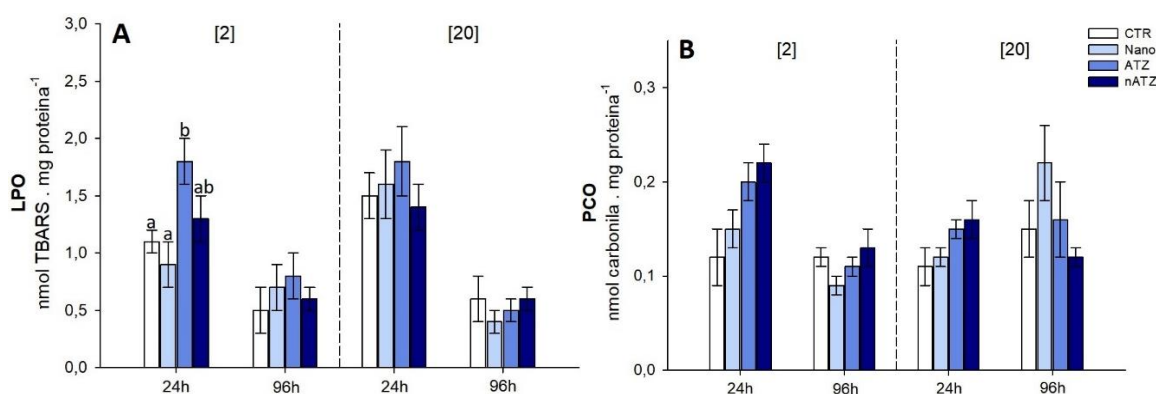
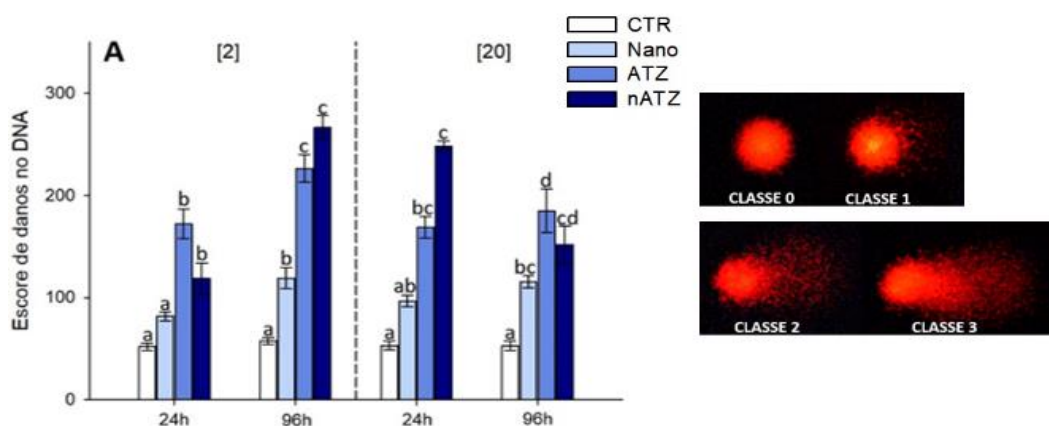


Fig. 6: Valores (média \pm EP, n= 6-10) da PCO (A) e LPO (B) de *P. lineatus* expostos a concentração de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de nanocápsulas (NANO), atrazina (ATZ) e atrazina nanoencapsulada (nATZ), ou apenas à água (CTR), por 24 e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) de um mesmo tempo experimental e mesma concentração.

3.3.4. Biomarcadores genotóxicos

Em relação aos danos causados ao DNA, os peixes expostos a ATZ2 e nATZ2, durante 24 e 96 h ($F= 30,34$ e $F= 136,74$, respectivamente), bem como à ATZ20 e nATZ20, por 24 e 96 h ($H= 33,87$ e $F= 29,34$, respectivamente), apresentaram um escore de danos estatisticamente iguais entre si, mas significativamente maior do que os peixes do grupo CTR (Fig. 7A). Peixes do grupo NANO2 ($F= 136,74$) e NANO20 ($F= 29,34$) também apresentaram escore de danos no DNA significativamente maior em relação ao respectivo CTR no tempo de 96h (Fig. 7A). A frequência AENS, quando consideradas em conjunto (MN + NR + NS + NL), apresentou um aumento significativo somente nos peixes expostos a ATZ20 durante 96h ($F= 4,06$), em relação ao respectivo CTR (Fig. 7B). Quando analisadas individualmente, não foram observadas variações significativas na frequência de cada AEN entre os diferentes tratamentos, porém, constatou-se dentre as AENs uma maior ocorrência de núcleos em forma de rim (Fig. 7D), seguido pelos núcleos segmentados (Fig. 7E), núcleos lobulados (Fig. 7F) e MN (Fig. 7C), os quais só foram observados em peixes expostos a ATZ.



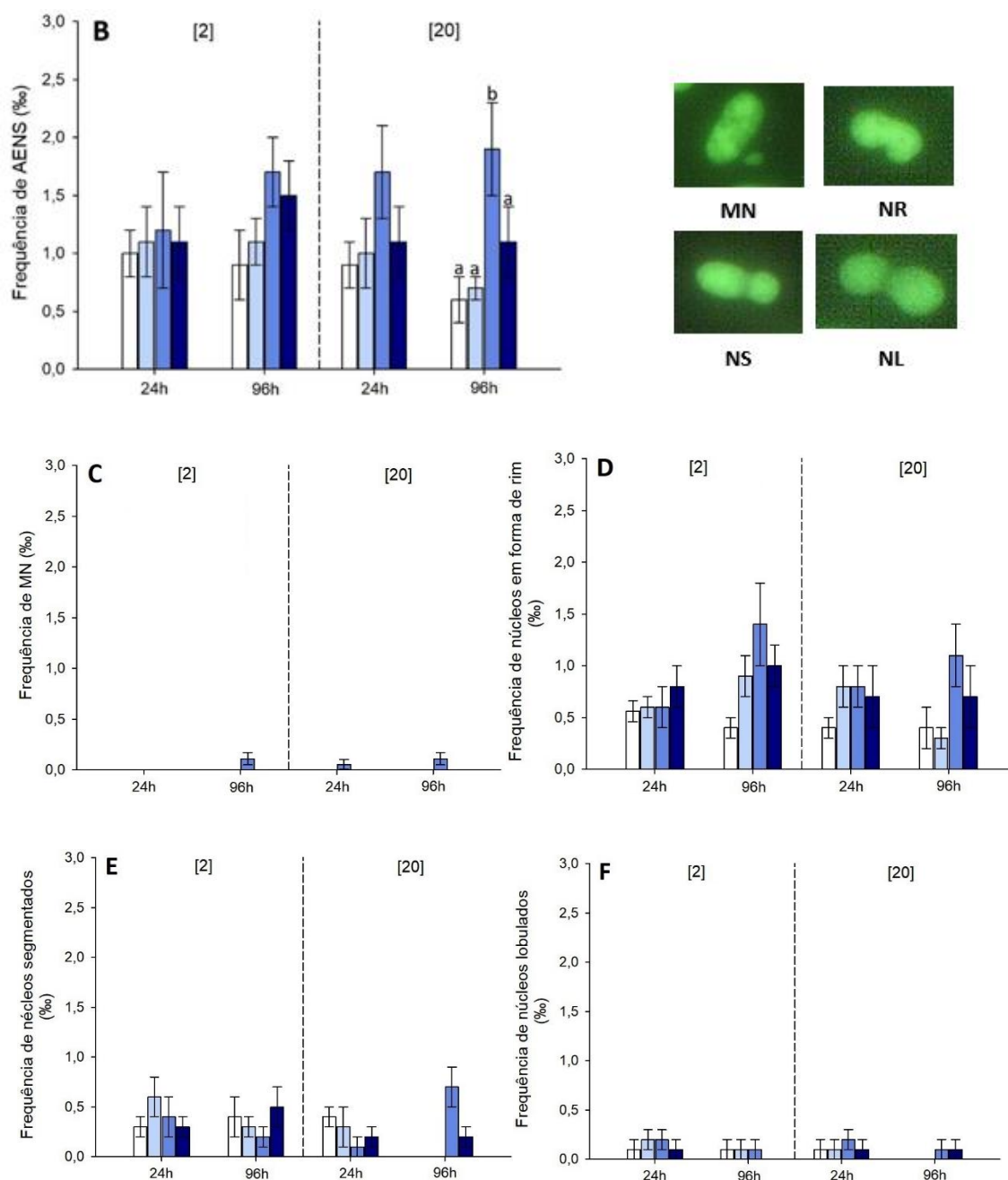


Fig. 7: Valores de (média \pm EP, $n = 6$) do escore de danos no DNA (A) frequência de AENS (‰) (B) frequência de MNS (‰) (C) frequência de núcleos em forma de rim (‰) (D) frequência de núcleos segmentadas (‰) (E) frequência de núcleos lobuladas (‰) (F) de *P. lineatus* expostos a concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de nanocápsulas (NANO), atrazina (ATZ) e atrazina nanoencapsulada (nATZ), ou apenas à água (CTR), por 24 e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) de um mesmo tempo experimental e mesma concentração.

Os biomarcadores que apresentam alterações significativas foram agrupados na Tabela 1. Podemos observar que a maioria das alterações vistas nos peixes expostos

as nanocápsulas também apareceram nos peixes expostos a ATZ nanoencapsulada, sendo indicado pelas setas amarelas. As setas vermelhas indicam alterações vistas nos peixes expostos a ATZ e que se mantiveram-se nos peixes expostos a ATZ nanoencapsulada. Os efeitos vistos nos peixes expostos somente a ATZ nanoencapsula são indicados pelas setas azuis. Podemos notar também um grande número de alterações em peixes expostos a ATZ, indicados pelas setas verdes.

Os valores de IBR foram calculados a partir dos seguintes biomarcadores: hemoglobina, glicose, Ca^{2+} , Ca^{2+} -ATPase, NKA, H^{+} -ATPase, AC, GST, GSH, CAT, GPx, LPO, danos no DNA e frequência de AENS. Nos 4 experimentos realizados, os peixes dos grupos expostos a ATZ apresentaram os maiores valores de IBR, enquanto os peixes expostos as nanocápsulas apresentaram os menores valores, podemos observar também que os valores de IBR apresentaram valores maiores com o aumento da concentração e também valores maiores no maior tempo experimental nos grupos testados (Fig. 8A). Quando os valores de IBR dos 4 experimentos foram considerados (Fig. 8B), constatou-se o maior valor médio (IBR = 30,18) para os peixes expostos à ATZ, seguido pelos peixes do tratamento nATZ (IBR = 23,41) e por fim das nanocápsulas (IBR = 18,90).

Tabela 1: A tabela apresenta alterações significativas em biomarcadores de peixes expostos a duas concentrações de nanocápsulas, ATZ nanoencapsulada e ATZ por 24 e 96 h, onde as setas apontadas para baixo indicam diminuição significativa e as setas apontadas para cima indicam aumento significativo.

[]	NANO				ATZ				nATZ				
	24h		96h		24h		96h		24h		96h		
	2	20	2	20	2	20	2	20	2	20	2	20	
Hb	=	=	↓	=	=	↑	↓	↓	=	=	↓	↓	↓
Glicemia	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	=	=	=
Na ⁺	=	=	=	=	↓	=	=	=	=	↑	=	=	=
K ⁺	=	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	↓
Ca ²⁺	↓	=	↓	=	↓	↓	↓	=	↓	↓	=	↓	↓
NKA	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	=
H ⁺ -ATP	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	=
Ca ²⁺ -ATP	=	↓	↓	=	=	↓	↓	↓	=	=	↓	↓	↓
AC	=	=	=	=	=	↑	↓	=	=	=	=	=	=
GST	=	=	=	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=
GSH	=	=	=	=	=	=	↑	↑	=	=	=	=	=
CAT	=	=	=	=	=	↑	=	↓	=	=	=	=	↓
GPx	=	=	=	=	=	↑	=	↓	=	=	=	=	=
LPO	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=
Danos DNA	=	=	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
AENs	=	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	=

A

	IBR				
	24h		96h		Média
	[2]	[20]	[2]	[20]	
NANO	17,56	17,64	21,97	18,42	18,90
ATZ	25,59	31,89	29,82	33,43	30,18
nATZ	21,44	22,74	26,30	23,17	23,41

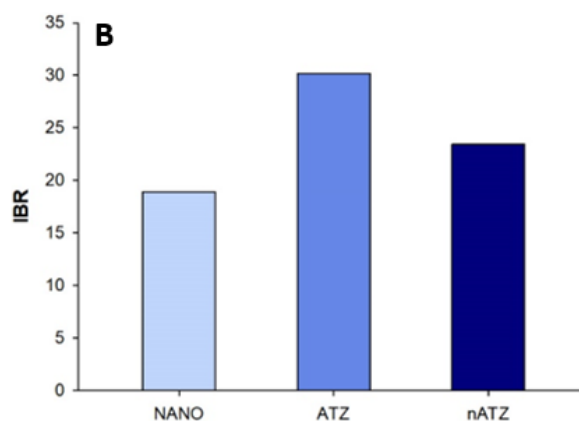


Fig. 8: Valores médios de IBR calculados para *P. lineatus* expostos à nanocápsulas (NANO), atrazina (ATZ) e atrazina nanoencapsulada (nATZ), para cada concentração (2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) e tempo experimental (24 e 96h) (A) e valores médios, considerando-se todos os tempos e concentrações, para cada tratamento (B).

3.4. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou alterações em biomarcadores do peixe *P. lineatus* expostos a ATZ, como também analisou os efeitos causados pela ATZ nanoencapsulada. Os resultados mostram que alguns dos efeitos observados nos peixes expostos à ATZ, tais como aumento na ocorrência de lipoperoxidação e frequência de AENs, aumento da glicemia e no conteúdo de GSH, alterações na atividade da anidrase carbônica e GPx, não foram observados nos peixes expostos ao herbicida nanoencapsulado, e tampouco nos peixes expostos apenas às nanocápsulas. Contudo, a nanoencapsulação não se mostrou eficaz em relação a alterações no conteúdo de hemoglobina, no aumento do escore de danos no DNA, como também na alteração da atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase levando a diminuição da concentração de Ca^{2+} plasmático. O Índice Integrado de Resposta ao Biomarcador (IBR) foi capaz de analisar os resultados dos biomarcadores de forma integrada. Os valores do IBR mostraram claramente um maior efeito da exposição a ATZ em sua formulação convencional em relação à nATZ. O IBR também mostrou que a exposição apenas às nanocápsulas sem a ATZ causou alterações em um menor número de biomarcadores, contudo essas alterações foram as mesmas observadas nos peixes expostos as nanocápsulas contendo ATZ, o que pode nos indicar que a toxicidade vista em peixes expostos a n ATZ pode ter sido causada tanto pelo herbicida, como também pelas nanocápsulas.

As nanocápsulas podem ser inseridas nas células devido à sua grande área superficial e tamanho pequeno e modificações adicionais na superfície podem melhorar ainda mais a absorção celular (Hu e Gao, 2010; Yuan et al., 2016), com isso as

nanocápsulas que contenham herbicidas podem penetrar as células dos animais (Clemente et al., 2013) o que pode explicar a toxicidade observada para o peixe *P. linetaus*. Nesse trabalho as análises realizadas na água, coletadas no início (t0) e no final (t96) dos experimentos, mostraram que as concentrações de nanocápsulas contendo ATZ, assim como as de nanocápsulas sem ATZ, diminuíram do tempo inicial para o tempo final, sugerir que deva ter ocorrido a absorção desses compostos pelo animal.

Na avaliação da toxicidade das NP, a morfologia, a área superficial, o revestimento, a solubilidade e os materiais dos quais as NP são constituídas devem ser considerados. Ensaio realizado com nanocápsulas de PCL sem ATZ mostraram sua fitotoxicidade para *Brassica sp.*, o que pode ser devido às substâncias presentes na sua composição (Pereira et al., 2014). Um desses componentes é o surfactante de polissorbato 80 (Tween 80). Yuan e colaboradores (2016) mostraram que embriões de *Danio rerio* expostos a nanocápsulas de quitosana modificadas com Tween 80 (TmCS-NP) apresentaram aumento aparente da taxa de mortalidade, diminuição na taxa de incubação e aumento das malformações de forma dose dependente, além do aumento do nível de produção de ERO intracelular. Outros compostos utilizados na fase orgânica de preparação das nanocápsulas são os triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico. O ácido cáprico pode ter sido liberado durante a metabolização do triglicerídeo, resultando em toxicidade para o peixe. O estudo de Yang e colaboradores (2018) mostrou que o ácido cáprico (ou ácido decanoico) após ser absorvido induziu estresse oxidativo, pela geração de ERO, e induziu LPO, causando apoptose em trofoblastos humanos. Sabe-se que entre os ácidos graxos, o ácido decanoico é

conhecido por ter uma variedade de atividades biológicas, incluindo efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em células humanas (Kim et al., 2014).

Em relação aos efeitos da ATZ, os peixes expostos a maior concentração de ATZ por 24 h apresentaram um aumento na concentração de hemoglobina, isso pode ter se dado em resposta ao estresse causado pelo herbicida e a necessidade de se aumentar a concentração de oxigênio no organismo (George et al., 2017). Esse aumento da hemoglobina coincide com o aumento da glicemia, também observado nos peixes expostos a mesma concentração de ATZ por 24 h, reforçando a ideia de uma resposta de estresse. Concentrações elevadas de glicose plasmática podem ser explicadas pela mobilização de reservas de glicogênio em resposta ao estresse induzido pelo herbicida (Khan et al., 2016). O aumento da glicemia após exposição a herbicidas triazínicos também já foi relatada para a carpa *Cyprinus carpio* (Blahova et al., 2014; Bhanu e Deepek, 2015; Khan et al., 2016). Nos peixes expostos a ATZ nanoencapsulada não foi observada uma resposta de estresse com o aumento do conteúdo de hemoglobina e glicemia, o que pode ser dado pela liberação mais lenta e conseqüentemente menores quantidades do herbicida disponíveis. Contudo, após 96 h de exposição a NANO2, ATZ (2 e 20) e nATZ (2 e 20) os peixes apresentaram uma diminuição no conteúdo de hemoglobina. Sabe-se que o herbicida livre pode provocar a inibição da formação de hemoglobina ou a mortalidade prematura de glóbulos vermelhos, afetando a capacidade de transporte de oxigênio (Akinrotimi et al., 2010), a mesma inibição pode ter ocorrido nos animais expostos ao herbicida encapsulado, como também em peixes expostos somente as nanocápsulas, as quais também podem ter interferido no transporte de oxigênio.

A concentração de Ca^{2+} plasmática também se mostrou ser bastante sensível à presença de ATZ, tanto na forma livre como nanoencapsulada, como também para as nanocápsulas, pois os peixes expostos à NANO2, ATZ2 e nATZ2, por 24 e 96 h, e à ATZ20 por 24h, apresentaram redução significativa no Ca^{2+} . Essas reduções coincidem em grande parte com decréscimos na atividade da Ca^{2+} -ATPase. A manutenção do cálcio plasmático em teleósteos de água doce envolve a tomada deste íon pelo epitélio branquial, que se dá pela entrada de Ca^{2+} através da membrana apical por um canal de Ca^{2+} , favorecida pela baixa concentração de Ca^{2+} intracelular, e sua saída para o plasma é dirigida pela Ca^{2+} -ATPase, localizada na membrana basolateral da célula (Marshall, 2002). Assim, esses resultados mostram que tanto o herbicida livre como nanoencapsulado, assim como as nanocápsulas, interferem negativamente na homeostase do cálcio em uma espécie de teleósteo de água doce.

As brânquias desempenham um papel vital no transporte de íons (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+}) e com isso mantêm o equilíbrio hidroeletrolítico e ácido-básico em peixes. Por isso a quantificação de íons plasmáticos é considerada um biomarcador sensível a exposição a xenobióticos (Saravanan et al., 2011; Saravanan et al., 2015). Nos peixes expostos à ATZ foi detectada redução significativa na concentração de Na^+ (ATZ2) em 24h e um aumento significativo de potássio (ATZ2) em 96 h. Alterações na concentração destes íons podem ter se dado por alterações transitórias em canais ou trocadores específicos, já que a exposição à ATZ livre não causou alterações significativas na atividade da NKA. Essa ausência de mudanças na NKA está de acordo com os resultados de Paulino et al. (2012), que também não verificaram alterações na atividade da NKA após exposição de *P. lineatus* a 2, 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ. Por outro lado, após 24 h de exposição à ATZ nanoencapsulada (nATZ20) houve um aumento

significativo no Na^+ plasmático, o qual coincide com o aumento na atividade das enzimas NKA e H^+ -ATPase. Sabe-se que a NKA é a principal determinante da concentração de Na^+ a qual contribui para sua tomada pelo epitélio branquial (Aperia et al., 2016) levando ao aumento em seus níveis plasmáticos. Esse aumento da atividade da enzima NKA foi uma resposta transitória visto que em 96h o aumento da atividade não foi observado.

Em relação a atividade da enzima AC, a nATZ não alterou sua atividade, diferentemente da ATZ livre, a qual promoveu aumento na atividade da AC nas primeiras 24 h de exposição, já em 96 h a exposição o herbicida levou a uma redução de sua atividade. Esse efeito pode ter se dado por ação direta da ATZ na enzima, uma vez que já foi observado uma alta afinidade espécie-específica também foi verificada na inibição de AC por agrotóxicos (Lionetto et al., 2012).

Os peixes expostos a ATZ nanoencapsulada não apresentaram alterações na atividade da GST e no conteúdo de GSH hepático, mas os peixes expostos a sua formulação convencional apresentaram uma diminuição na atividade da GST na menor concentração de ATZ e no menor tempo testado. Esta enzima está envolvida principalmente na fase 2 de biotransformação e uma diminuição em sua atividade também foi vista no trabalho de Santos e Martinez (2012), em *P. lineatus* expostos a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ. Essa diminuição indica que a exposição a ATZ interfere no sistema de desintoxicação do organismo (Blahova et al., 2013). Em relação ao conteúdo hepático de GSH, os peixes expostos a ATZ durante 96 h apresentaram um aumento desse parâmetro. Resultado similar foi encontrado no trabalho de Elia e colaboradores (2012) no teleosteo *Lepomis macrochirus* expostos a concentrações bem mais altas de

ATZ (6 e 9 mg L⁻¹). O aumento nos níveis de GSH pode estar relacionado ao aumento de sua demanda para a sua conjugação com o herbicida, a fim de evitar sua bioacumulação nas células hepáticas; como também pode estar relacionado com o aumento na produção de ERO devido à exposição a ATZ, a fim de prevenir danos oxidativos. Sabe-se que a GSH é eficiente para evitar a peroxidação lipídica, o que vai de encontro com o resultado encontrado nesse trabalho, pois não houve aumento da lipoperoxidação nos peixes que apresentaram aumento de GSH.

As enzimas antioxidantes primárias (SOD, CAT e GPx) constituem a primeira linha de defesa contra as ERO. As SODs são uma grande família de enzimas que dismutam o superóxido em peróxido de oxigênio e água. CAT e GPx são responsáveis pela desintoxicação de peróxido de oxigênio em água (Nwani et al., 2010). No presente trabalho não foram observadas alterações consistentes das enzimas antioxidantes em peixes expostos ao herbicida nanoencapsulado, porém o mesmo não foi visto em peixes expostos a sua formulação convencional. Os resultados mostraram um aumento na atividade da CAT e GPx nas primeiras 24 h de exposição a ATZ20, que pode ser uma resposta ao aumento de ERO gerado pela exposição ao herbicida (John et al., 2001; Vasanth et al., 2013). A exposição a ATZ também levou a um aumento da atividade enzimática antioxidante em *Poecilia sphenops* (Vasanth et al., 2013) e da enzima CAT em fêmeas de *Danio rerio* (Jin et al., 2010). Por outro lado, após 96 h de exposição à ATZ20 ocorreu redução na atividade de CAT e GPx. Nos animais expostos à nATZ20 somente a atividade da CAT mostrou diminuição. Reduções semelhantes na CAT e GPx também foram relatadas para os teleósteos *Rhamdia quelen* (Mela et al., 2013), em *Labeo rohita* (Prabakaran et al., 2014) e em embriões de *D. rerio* (Adeyemi et al., 2015) expostos a ATZ. O mecanismo de inibição das enzimas antioxidantes ainda é

desconhecido (Silva et al., 2011). Sugere-se que os xenobióticos podem inibir a transcrição de genes específicos, o que resulta em diminuição dos níveis de RNAm o que reflete em atividades mais baixas (Silva et al., 2011). A baixa atividade dessas enzimas e a produção de ERO em excesso em animais expostos a ATZ, pode levar a danos celulares (Sun et al., 2006).

Entre os principais danos causados pelo excesso de ERO destaca-se a peroxidação lipídica (LPO), que é o passo inicial de dano na membrana celular, podendo levar a célula a apoptose; a LPO pode ser causada por agrotóxicos, metais e outros xenobióticos (Livingstone, 2001). No presente estudo observou-se um aumento de LPO apenas no fígado dos peixes expostos a ATZ2, nas primeiras 24 h, sugerindo um desequilíbrio pró-oxidante, contudo em 96 h de exposição não foi visto o aumento indicando uma eficiência das defesas antioxidantes. Esse aumento nas primeiras 24 h não foi observado em peixes expostos a ATZ nanoencapsulada, o que nos mostra que nas concentrações testadas a encapsulação da ATZ foi eficaz para evitar danos a membrana plasmática em *P. lineatus*. O aumento de LPO também foi registrado para *C. punctatus* (Nwani et al., 2010), *L. rohita* (Prabakaran et al., 2014) e *P. sphenops* (Vasanth et al., 2013) em resposta à exposição à ATZ. Assim, pode-se sugerir que a LPO pode estar associada ao excesso de ERO resultante do metabolismo da ATZ, levando a peroxidação dos lipídeos das membranas em células hepáticas.

Entretanto, a ATZ nanoencapsulada não se mostrou eficaz em evitar os danos no DNA de eritrócitos, pois foi observado um aumento de danos nos peixes expostos à nATZ em todos os tempos e concentrações testadas, assim como ocorreu com a ATZ livre, o que indica o potencial genotóxico desses compostos. Os derivados de s-triazina,

que inclui a atrazina, são capazes de interação direta com o DNA, de forma tempo-dependente (Oliveira-Brett e Silva, 2002). Essa interação se dá por formação de adutos entre o herbicida e as bases púricas do DNA, adenina e guanina. Esses resultados corroboram resultados anteriormente encontrados para a mesma espécie de peixe, que mostraram aumento na ocorrência de danos no DNA de eritrócitos, células hepáticas e branquiais após exposição a 2 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ (Santos e Martinez, 2012). Grillo e colaboradores (2012) realizaram testes genotóxicos em linfócitos humanos com o herbicida ATZ em sua formulação convencional e nanoencapsulada e os resultados também mostraram que todos os tratamentos foram significativamente diferentes do CTR, porém também foram diferentes entre si, e o encapsulamento dos herbicidas diminuiu em 50% os danos causados ao DNA.

A exposição apenas às nanocápsulas de PCL por 96 h aumentou o escore de danos no DNA de *P. lineatus*. A hidrólise de episol-caprolactone resulta na formação do ácido 6-hidroxi-hexanoico (Karande et al., 2017). No trabalho realizado com larvas de *Danio rerio* a exposição subletal a ésteres do ácido adípico, análogo ao ácido 6-hidroxi-hexanoico, causou danos ao DNA de forma dose dependente induzindo quebras na cadeia de DNA detectadas em células das larvas, como também induziu a expressão de genes relacionados ao estresse e causou deformidades morfológicas (Boran e Terzi, 2017).

Em relação aos danos mutagênicos, somente nos peixes expostos a ATZ20, durante 96 h, apresentaram aumento significativo na frequência de AENs. As AENs quando representadas separadamente mostraram que a maior ocorrência se deu em núcleos em forma de rim, seguido de segmentado e após lobulado. As causas que

original a formação das anormalidades nucleares ainda é incerta, contudo uma teoria atribui seu aparecimento a mudanças em proteínas do citoesqueleto, responsáveis pela manutenção da forma nuclear (Ghisi et al., 2014). Dentre as AENs, a de menor ocorrência foi a de MN, contudo vale ressaltar que MN só foram detectados nos peixes expostos a ATZ. Sabe-se que a indução máxima de MN ocorre normalmente de um a cinco dias após a exposição (Nwani et al., 2011), o que está de acordo com a formação de MN com 24 e 96 h de exposição observada nesse trabalho. A exposição a xenobióticos pode levar a alterações na formação do fuso mitótico, causar danos ou perdas cromossômicas, o que conseqüentemente, pode resultar na formação de MN (Viana et al., 2017). Trabalhos anteriores mostram que a exposição a ATZ leva ao aparecimento de MN de forma dose dependente (Nwani et al., 2011; Piancini et al., 2015).

O desenvolvimento de um sistema sistemas de liberação controlada podem atenuar os impactos negativos de agrotóxicos no meio ambiente, bem como aumentar a segurança alimentar. No entanto, alguns trabalhos ainda precisam ser realizados para sua regulamentação e utilização no mercado agrícola. Com isso esse trabalho é importante para compreender a toxicidade da ATZ nanoencapsulada em um organismo não-alvo avaliando seu risco ecológico. Os resultados da análise integrada dos biomarcadores, pelo IBR, nos mostra que a ATZ apresentou uma maior toxicidade ao peixe *P. lineatus*, em comparação com sua formulação nanoencapsulada. O que nos mostra que ATZ nanoencapsulada foi capaz de proteger de uma forma geral o animal dos efeitos do herbicida, indicando que a ATZ nanoencapsulada é menos toxica para o peixe *P. lineatus* em comparação com sua formulação convencional. A redução de sua toxicidade por estar relacionada com sua liberação mais específica, controlada e

localizada do princípio ativo no alvo. Além de ser menos tóxica, trabalhos anteriores já mostraram que a ATZ nanoencapsulada permite a aplicação de doses menores do herbicida, sem perda de eficiência (Oliveira et al., 2015b; Souza et al., 2018), trazendo benefícios para o ambiente.

REFÊRENCIAS

- Adeyemi J.A., Adewale O.O., Oguma A.Y., 2014. Mortality, oxidative stress and hepatotoxicity in juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell, exposed to lead and cypermethrin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 529–533.
- Adeyemi J.A., Martins-Junior A.C., Barbosa Jr F., 2015. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 172–173, 7-12
- Akinrotimi O.A., Abu O.M.G., Bekbele D.O., Udeme-Naa B., Aranyo A.A., 2010. Haematological characteristics of *Tilapia guineensis* from Buguma creek, Niger delta, Nigeria. *Electronic J Environ. Agric. Food Chem.* 9, 1415-1422.
- Ames B.N., 1996. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* 8, 115–118.
- Aperia A., Akkuratov E.E., Fontana J.M., Brismar H., 2016. Na⁺-K⁺-ATPase, a new class of plasma membrane receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 310, 491-295.
- Beliaeff B., Burgeot T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 1316-1322.
- Beutler E., 1975. *Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods.* New York: Grune and Stratton.

- Beutler E., Durom O., Kelly B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882–888.
- Bhanu A.P., Deepak M., 2015. Impact of cypermethrin on biochemical aspects of clinical importance in the blood of freshwater fish *Cyprinus carpio*. *J. Entomol. Zool. Stud.* 3, 126-128.
- Blahova J., Plhalova L., Hostovsky M., Divisova L., Dobsikova R., Mikulikova I., Svobodova Z., 2013. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *Food Chem. Toxicol.* 61, 82–85.
- Blahova J., Modra H., Sevcikova M., Marsalek P., Zelnickova L., Skoric M., Svobodova Z., 2014. Evaluation of Biochemical, Haematological, and Histopathological Responses and Recovery Ability of Common Carp (*Cyprinus carpio L.*) after Acute Exposure to Atrazine Herbicide. *Biomed Res Int.* 8.
- Boran H., Terzi S., 2017. Stress-Induced Transcriptional Changes and DNA Damage Associated with Bis(2-ethylhexyl) Adipate Exposure in Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 99, 308-314.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Camejo G., Wallin B., Enojärvi M., 1998. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiterplates. In: Armstrong, D. (Ed.), *Free Radical and Antioxidants Protocols*. Humana Press, New Jersey, pp. 377–387.
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 2123–2136.

- Cerejeira M.J., Viana P., Batista S., Pereira T., Silva E., Valério M.J., Silva-Fernandes A.M., 2003. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water. Res.* 37, 1055–1063.
- Clemente Z., Grillo R., Jonsson M., Santos N.Z., Feitosa L.O., Lima R., 2014. Ecotoxicological evaluation of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules containing triazine herbicides. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 4911–4917.
- Colombo G., Clerici M., Garavaglia M.R., Giustarini D., Rossi R., Milzani A., Dalle-Donne I., 2016. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *1019*, 178-190.
- CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº 357 de 17 de março de.
- de Oliveira J.L., Campos E.V.R., da Silva C.G.M., Pasquoto T., Lima R., Fraceto L.F, 2015. Solid Lipid Nanoparticles Co-loaded with Simazine and Atrazine: Preparation, Characterization, and Evaluation of Herbicidal Activity. *J. Agr. Food Chem.* 63, 422-432.
- Eggens M. L., Galgani F., 1992. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish-fast determination with a fluorescence plate-reader. *Mar. Environ. Res.* 33, 213-221.
- Ehrsam M., Knutie S.A., Rohr J.R., 2016. The herbicide atrazine induces hyperactivity and compromises tadpole detection of predator chemical cues. *Environ. Toxicol Chem.* 35, 2239-2244.
- Elia A.C., Waller W.T., Norton S.J., 2002. Biochemical responses of Bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus* Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 809-816.

- Fraceto L.F., Grillo R., de Medeiros G.A., Scognamiglio V., Rea G., Bartolucci C., 2016. Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have? *Front. Environ. Sci.* 4, 20.
- George A.D.I., Akinrotimi O.A., Nwokoma U.K., 2017. Haematological Changes in African Catfish (*Clarias Gariepinus*) Exposed to Mixture of Atrazine and Metolachlor in the Laboratory. *J. FisheriesSciences.com* 11, 48-54.
- Ghisi N.C, de Oliveira E.C., Fávaro L.F, de Assis H.C.S, José Prioli A.J., 2014. In Situ Assessment of a Neotropical Fish to Evaluate Pollution in a River Receiving Agricultural and Urban Wastewater. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 6, 699–709.
- Gibbs A., Somero G.N., 1989. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. *J. Exp. Biol.* 143, 475-942.
- Grillo R., Dos Santos N.Z.P., Maruyama C.R., Rosa A.H., De Lima R., Fraceto L. F., 2012. Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *J. Hazard. Mater.* 231, 1–9.
- Hassan N.M., Nemat A.M.M., 2005. Oxidative stress in herbicide treated broad bean and maize plants. *Acta. Physiol. Plant.* 27, 429–438.
- Hopkins J., Tudhope G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haemat.* 25, 563 - 575.
- Hu Y.L., Gao J.G., 2010. Potential neurotoxicity of nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 394, 115-121.
- Jin Y., Zhang X., Shu L., Chen L., Sun L., Qian H., Liu W., Fu Z., 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 78, 846–852.

- John S., Kale M., Rathore N., Bhatnagar D., 2001. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J. Nutr. Biochem.*, 12, 500-504.
- Kah M., Beulke S., Tiede K., Hofmann T., 2013. Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. *Crit Rev. Env. Sci. Tec.* 43, 1823-1867.
- Kah M., Hofmann T., 2014. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environ. Int.* 63, 224-235.
- Karande R., Salamanca D., Schmid A., Buehler K., 2017. Biocatalytic conversion of cycloalkanes to lactones using an in-vivo cascade in *Pseudomonas taiwanensis* VLB120. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 315-312.
- Keen J.H., Habig W.H., Jakoby W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 20, 6183–6188.
- Khan A., Shah N., Gul A., Najmu-Us-Sahar, Ismail A., Muhammad, Aziz F., Farooq M., Adnan M., Rizwan M., 2016. Comparative Study of Toxicological Impinge of Glyphosate and Atrazine (Herbicide) on Stress Biomarkers; Blood Biochemical and Hematological Parameters of the Freshwater Common Carp (*Cyprinus carpio*). *J. Environ. Stud.* 25, 1995-2001.
- Kim H.J, Yoon H.J., Kim S.Y., Yoon Y.R., 2014. A medium-chain fatty acid, capric acid, inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation via the suppression of NF-kappaB signaling and blocks cytoskeletal organization and survival in mature osteoclasts. *Mol. Cell* 37, 598-604.
- Kumar S., Bhanjanaa G., Sharmaa A., Sidhub M.C., Dilbaghi N., 2014. Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 101, 1061-1067.

- Kumar V., Upadhyay N., Singh S., Singh J., Kaur P., 2013. Thin-layer chromatography: comparative estimation of soil's atrazine. *Curr. World. Environ.* 8,469–472. 4
- Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.P., Shacter E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzimol.* 233, 346-357.
- Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M. E., Erroi E., Schettino T., 2012. Carbonic Anhydrase as Pollution Biomarker: An Ancient Enzyme with a New Use. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 9, 3965-3977.
- Livingstone D.R., 2001. Contaminant stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Luvisi A., 2016. Electronic identification technology for agriculture, plant, and food. A review. *Agron. Sust. Devel.* 36, 13.
- Marshall W.S., 2002. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and respective synthesis. *J. Exp. Zool.* 293, 264–283.
- McCord J.M., Fridovich I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Mela M., Guiloski I.C., Doria H.B., Randi M.A.F., de Oliveira Ribeiro C.A., Pereira L., de Assis H.S., 2013. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 13–21.
- Mishra S., Singh H.B., 2015. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1097–1107.
- Moller I.M., Rogowska-Wrzesinska A., Rao R.S.P., 2011. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J. Proteom.* 74, 2228-2242.

- Nakka S., Godar A.S., Thompson C.R., Peterson D.E., Jugula M., 2017. Rapid detoxification via glutathione S-transferase (GST) conjugation confers a high level of atrazine resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Pest. Manag. Sci.* 73, 2236 – 2243.
- Nemat A.M.M., Hassan N.M., 2006. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. *Plant. Phys. Biochem.* 44, 202–210.
- Nwani C.D., Nagpure N.S., Kumar R., Kushwaha B., Kumar P., Lakra W.S., 2011. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 314–322.
- Oliveira H.C., Stolf-Moreira R., Martinez C.B., Grillo R, de Jesus M.B, Fraceto L.F, 2015. Nanoencapsulation Enhances the Post-Emergence Herbicidal Activity of Atrazine against Mustard Plants. *Plos One*, 10.
- Oliveira-Brett A.M., Silva L.A., 2002. A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s triazinederivatives. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 717–723.
- Parisi C., Vignani M., Rodríguez-Cerezo M., 2015. Agricultural Nanotechnologies: What are the current possibilities? *Nano Today* 10, 124-127.
- Paulino M.G., Sakuragui M.M., Fernandes M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 86, 1–7.
- Pereira A.E., Grillo R., Mello N.F., Rosa A.H., Fraceto L.F., 2014. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an

- alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. *J. Hazard. Mater.* 268, 207–215.
- Piaincini L.D.S., Santos G.S., Tincani F.H., Cestari M.M., 2015. Piscine micronucleus test and the comet assay reveal genotoxic effects of Atrazine herbicide in the neotropical fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 10, 55-60.
- Prabakaran S., Pugazhendy K., Revathi A., Jayanthi C., 2014. Hepatoprotective Effect of *Pisonia alba* and *Cardiospermum halicacabum* in Atrazine Toxicity on LPO and some Antioxidant Activities in the Liver Tissue of Fresh Water Fish *Labeo rohita*. *Int. J. Pharm. Biol. Sci. Arch.* 5, 174-179.
- Sanchez W., Burgeot T., Porcher J., 2013. A novel “integrated biomarker response” calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 20, 2721-2725.
- Santos T.G., Martinez C.B.R., 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a neotropical fish species. *Chemosphere.* 89, 1118–1125.
- Santos, K.C., Martinez, C.B.R., 2014. Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup®, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 100. 7–14
- Saravanan M., Kim J., Kim H., Kim S., Ko D., Hur J., 2015. Ecotoxicological impacts of isoprotiolane on freshwater fish *Cyprinus carpio* fingerlings: a multi-biomarker assessment. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 58, 491-499.
- Saravanan M., Vidhya A.E., Ramesh M., Malarvizhi A., Kavitha C., 2011. Impact of endosulfan on certain hematological and biochemical parameters of catfish *Labeo fimbriatus*: sublethal study. *Toxicol. Indus. Hlth.* 27, 555–562.

- Schwab A.P., Splichal P.A., Banks M.K., 2006. Persistence of atrazine and alachlor in ground water aquifers and soil. *Water. Air Soil Pollut.* 171, 203–235.
- Sekhon B. S., 2014. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 7,31–53.
- Shang Q., Shi Y.L., Zhang Y.H., Zheng T., Shi H.Y., 2013. Pesticide-conjugated polyacrylate nanoparticles: novel opportunities for improving the photostability of emamectin benzoate. *Polym. Advan. Technol.* 24, 137-143.
- Silva C.A., Magalhães V.F., Oba E., Ramsdorf W.A., Cestari M.M., Oliveira Riberiro C.A., Silva de Assis H.C., 2011. First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicon.* 57, 141–147.
- Singh N.P., Mccoy T.M., Tice R.R., Schneider E.L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Singh S., Kumar V., Chauhan A., Datta S., Wani A. B., Singh N., Singh J., 2017. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. *Environ. Chem. Lett.*, 1-27.
- Sinha V.R., Bansal K., Kaushik R., Kumria R., Trehan A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Intern. J. Pharma.* 278, 1–23.
- Sousa G.F.M., Gomes D.G, Campos E.V.R., Oliveira J.L., Fraceto L.F., Stolf-Moreira R., Oliveira H.C., 2018. Post-Emergence Herbicidal Activity of Nanoatrazine Against Susceptible Weeds. *Front. Environ. Sci.* 6.
- Su Y.H., Zhu Y.G., 2006. Bioconcentration of atrazine and chlorophenols into roots and shoots of rice seedlings. *Environ. Pollut.* 139, 32–39.

- Sun Y., Yu H., Zhang J., Yin Y., Shi H., Wang X., 2006. Bioaccumulation depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere* 63, 1319–1327.
- Suvetha L., Ramesh M., Saravanan M., 2010. Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29, 44–49.
- Szigeti Z., Lehoczki E., 2003. A review of physiological and biochemical aspects of resistance to atrazine and paraquat in Hungarian weeds. *Pestic. Manag. Sci.* 59, 451–458.
- Tellis M.S, Lauer M.M., Nadella S., Bianchini A., Wood C.M., 2013. Ionic status, calcium uptake, and Ca^{2+} -ATPase activity during early development in the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 166, 272–277.
- Tong Y., Wu Y., Zhao C., Xu Y., Lu J., Xiang S., Zong F., Wu X., 2017. Polymeric nanoparticles as metolachlor carrier: water-based formulation for hydrophobic pesticides and absorption by plants. *J. Agric. Food Chem.* 65, 7371-7378.
- Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., Sofuni, T., 1992. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Sci. Technol.* 25, 235–240.
- Vasanth S., Ganesh A., Vijayakumar T.S., Karthikeyeni S., Manimegalai M., Subramanian P. Impacts and Impairments of Atrazine on Male *Poecilia sphenops*. *Indian J. Adv. Chem. Sci.* 2, 62-70.
- Viana L.F, Suárez Y.R., Cardoso C.A.L, Solórzano J.C.J, Crispim B.A., Grisolia A.B., Lima-Junior S.E., 2017. Erythrocyte Nuclear Abnormalities in *Astyanax lacustris*

- in Response to Landscape Characteristics in Two Neotropical Streams. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 1-8.
- Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Lunardelli, B., de Oliveira, L.F., da Costa Cabrera, L., Risso, W.E., Primel, E.G., Meletti, P.C., Fillmann, G., Martinez, C.B.R., 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. Sci. Total Environ. 542, 44–56.
- Vijayavel K., Gopalakrishnan S., Balasubramanian M.P., 2007. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. Chemosphere 69, 979–986.
- Vitale A.M., Monserrat J.M., Castilho P., Rodriguez E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol. 122C, 121–129.
- Wang P., Lombi E., Zhao F., Kopittke P.M., 2016. Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. Trends Plant. Sci. 21, 699-712.
- Yang C., Lim W., Bazer F. W., Song G., 2018. Decanoic acid suppresses proliferation and invasiveness of human trophoblast cells by disrupting mitochondrial function. Toxicol. Appl. Pharmacol. 339, 121-132.
- Yuan Z., Li Y., Hu Y., You J., Higashisaka K., Nagano K., Tsutsumi Y., Gao J. 2016. Chitosan nanoparticles and their Tween 80 modified counterparts disrupt the developmental profile of zebrafish embryos. Int. J. Pharm. 515, 644-656.

Zadeh A.K., Sohrab A.D., Alishahi M., Khazaei S.H., Asgari H.M., 2016. Evaluation of acute and sub-lethal toxicity of herbicide, atrazine, on hematological parameters of *Tor grypus*. J. Vet. Res. 71, 295–301.