



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO TEIXEIRA DE SOUSA

**MODO DE AÇÃO DE NANOATRAZINA EM *Zea mays* L. E
PLANTAS DANINHAS SUSCETÍVEIS E TOLERANTES AO
HERBICIDA**

BRUNO TEIXEIRA DE SOUSA

**MODO DE AÇÃO DE NANOATRAZINA EM *Zea mays* L. E
PLANTAS DANINHAS SUSCETÍVEIS E TOLERANTES AO
HERBICIDA**

Tese apresentada ao Departamento de
Agronomia da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito à obtenção do
título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Giliardi Dalazen

Londrina - PR
2024

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

S725m Sousa, Bruno Teixeira de.
Modo de ação de nanoatrazina em Zea mays L. e plantas daninhas suscetíveis e tolerantes ao herbicida / Bruno Teixeira de Sousa. - Londrina, 2024.
191 f. : il.

Orientador: Halley Caixeta Oliveira.
Coorientador: Giliardi Dalazen.
Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Bidens pilosa L. - Tese. 2. Estresse oxidativo em plantas - Tese. 3. Nanoherbicida - Tese. 4. Raphanus sativus L. - Tese. I. Oliveira, Halley Caixeta . II. Dalazen, Giliardi . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

BRUNO TEIXEIRA DE SOUSA

**MODO DE AÇÃO DE NANOATRAZINA EM *Zea mays* L. E
PLANTAS DANINHAS SUSCETÍVEIS E TOLERANTES AO
HERBICIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto
Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba -
UNESP

Prof. Dr. Adriano Buzutti de Siqueira
Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT

Prof. Dr. José Antonio Pimenta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Catarine Markus
Universidade Federal do Rio Grande do Sul -
UFRGS

Londrina, 25 de abril de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, por todas as oportunidades que pude aproveitar e por toda a força que me deu para superar as dificuldades dessa trajetória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira, e ao meu Co-Orientador, Prof. Dr. Giliardi Dalazen, pela orientação, pelo apoio e pela amizade ao longo dos anos de orientação. Agradeço por compreenderem as dificuldades pelas quais passei durante esse período e, por sempre me apresentarem novas oportunidades para superá-las.

À minha família, em especial a minha mãe Solange Aparecida Teixeira, pelo amor, apoio, incentivo, estímulo ao estudo e, principalmente, por ter segurado as pontas durante o período da pandemia, o que permitiu que eu chegasse até aqui. A sua força e coragem são admiráveis, mãe!

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto e ao Pós-Doutorando Anderson do Espírito Santo Pereira, do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP – Campus Sorocaba, por fornecerem as nanoformulações, objeto de estudo desta tese.

Aos amigos de longa data que acompanharam minha trajetória e aos novos amigos que fiz aqui na cidade de Londrina, Anderson Calzavara, André Vicente, Diego Gomes, Isabela Carvalho, Janaína Silva, José Flavio, Karina Sanada, Lara Bardy, Mariana Carvalho, Mariana Hertel, Michele Accácio, Rafael Caetano, Tatiane Debiasi e Thiago Montagner, por toda ajuda e todo o apoio. Com vocês, a vida pode ser mais leve e mais divertida, mesmo nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Valdir Zucareli, à Me. Andréia de Paula Carneiro Martins e à Prof. Dra. Érica Marusa Pergo Coelho, pela amizade e colaboração, permitindo a utilização da estrutura dos laboratórios de Bioquímica e Botânica da Universidade Estadual de Maringá – Campus de Umuarama.

À Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, ao Laboratório de Ecofisiologia Vegetal (LEFIV), e a todos os professores e servidores do campus da universidade que tive oportunidade de conhecer. Agradeço pelo suporte, conhecimento e pela troca que pudemos ter.

Aos membros que compõem a banca de defesa, Prof. Dr. Adriano Buzutti de Siqueira, Profa. Dra. Catarine Markus, Prof. Dr. José Antonio Pimenta e

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, por aceitarem o convite e pelas contribuições para o aperfeiçoamento do meu trabalho.

Ao Programa Institutos Nacionais de Ciência, Tecnologia e Inovação – INCT: Nanotecnologia para Agricultura Sustentável (CNPq, INCT NanoAgro #405924/2022-4).

A Todos que contribuíram de alguma maneira, direta ou indiretamente, para a realização do meu trabalho e para o meu crescimento pessoal durante esta etapa, meu muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação Araucária.

Respeito muito minhas lágrimas
Mas ainda mais minha risada [...]
(Caetano Veloso)

RESUMO

SOUSA, Bruno Teixeira de. **Modo de ação de nanoatrazina em *Zea mays* L. e plantas daninhas suscetíveis e tolerantes ao herbicida.** 2024. 192f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

O desenvolvimento de nanossistemas carreadores visa melhorar a aplicação e disponibilização de ingredientes ativos (i.a.) na agricultura; e as propriedades físico-químicas destes sistemas são essenciais para o seu sucesso. A nanoencapsulação da atrazina potencializa a sua atividade herbicida no controle pós-emergente de plantas daninhas, porém, espera-se que o aumento na atividade herbicida não cause efeitos negativos sobre plantas de milho. Objetivou-se avaliar os efeitos da aplicação de três nanossistemas carreadores de atrazina e da formulação convencional deste herbicida na tolerância de plantas de milho e na suscetibilidade de duas espécies de plantas daninhas (*Bidens pilosa* e *Raphanus sativus*). As investigações foram divididas em três etapas. 1- Tolerância pós-emergente das plantas de milho às formulações atrazina comercial (ATZ) e atrazina contida em nanocápsulas (NCs) de poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), em NCs PCL+ATZ com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou NCs de zeína (ZN+ATZ), além das três nanoformulações sem i.a. (PCL, PCL/CS e ZN), com medidas morfológicas, fisiológicas e bioquímica das plantas; 2- Atividade herbicida das formulações ATZ, PCL+ATZ e ZN+ATZ em pós-emergência das plantas de *B. pilosa* e *R. sativus*, com avaliações fisiológicas e bioquímicas das plantas; 3- Atividade herbicida pós-emergente da formulação PCL/CS+ATZ em comparação às formulações ATZ e PCL+ATZ em plantas de *B. pilosa*, por aplicação foliar (com avaliações fisiológicas e controle de plantas) e por exposição das plantas às formulações via hidroponia (com avaliações fisiológicas e microscopia confocal). Os resultados obtidos foram: as formulações de nanoatrazina inibiram em maior proporção a atividade do FSII das plantas de milho. Os marcadores de estresse oxidativo (resultantes da inibição do FSII) e a atividade enzimática antioxidante foram observados em maior intensidade nas plantas de milho que receberam aplicação de nanoatrazina, enquanto nas plantas aplicadas com ATZ houve maior atividade detoxificante de glutathione S-transferase (GST) e menor nível de estresse. As plantas de milho apresentaram tolerância para todas as formulações testadas. As formulações PCL+ATZ e ZN+ATZ potencializaram a atividade herbicida de atrazina em *B. pilosa* e *R. sativus*, promovendo maior inibição da atividade do FSII e extravasamento de eletrólitos em relação a ATZ. Em plantas de *B. pilosa*, a aplicação de ZN+ATZ resultou na maior atividade enzimática antioxidante em relação as demais formulações. Para ambas espécies houve inibição da atividade detoxificante de GST. A atividade herbicida pós-emergente de PCL+ATZ foi potencializada com o revestimento por quitosana da formulação PCL/CS+ATZ, levando a maiores porcentagens de inibição do FSII e melhor controle de plantas daninhas. Já em exposição via hidroponia, a absorção radicular foi prejudicada, podendo ser observada a interação entre as NCs PCL/CS+ATZ e as camadas superficiais das raízes. Os três nanossistemas carreadores de atrazina testados aumentaram a eficiência do i.a. nas aplicações em pós-emergência. O combate ao estresse oxidativo é um mecanismo importante de tolerância das plantas de milho à nanoatrazina. O modo de ação de nanoatrazina variou conforme a espécie daninha

alvo da aplicação. As interações entre cargas elétricas das NCs e das camadas externas das plantas são ponto chave para o sucesso da aplicação.

Palavras-chave: *Bidens pilosa* L.; estresse oxidativo em plantas; FSII; nanoherbicida; *Raphanus sativus* L.

ABSTRACT

SOUSA, Bruno Teixeira de. **Mode of action of nanoatrazine on *Zea mays* L. and weeds susceptible and tolerant to the herbicide**. 2024. 192f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

The development of carrier nanosystems aims to improve the application and availability of active ingredients (a.i.) in agriculture; and the physicochemical properties of these systems are essential for their success. The nanoencapsulation of atrazine enhances its herbicidal activity in the post-emergence control of weeds, however, it is expected that the increase in herbicidal activity will not cause negative effects on corn plants. The objective was to evaluate the effects of the application of three atrazine-carrying nanosystems and the conventional formulation of this herbicide on the tolerance of corn plants and the susceptibility of two weed species (*Bidens pilosa* and *Raphanus sativus*). The investigations were divided into three stages. 1- Post-emergence tolerance of corn plants to commercial atrazine (ATZ) and atrazine formulations contained in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules (NCs) (PCL+ATZ), in PCL+ATZ NCs with chitosan coating (PCL/CS+ATZ) or zein NCs (ZN+ATZ), in addition to the three nanoformulations without AI (PCL, PCL/CS and ZN), with morphological, physiological and biochemical measurements of plants; 2- Herbicidal activity of ATZ, PCL+ATZ and ZN+ATZ formulations in post-emergence of *B. pilosa* and *R. sativus* plants, with physiological and biochemical evaluations of the plants; 3- Post-emergence herbicidal activity of the PCL/CS+ATZ formulation in comparison to the ATZ and PCL+ATZ formulations on *B. pilosa* plants, by foliar application (with physiological evaluations and plant control) and by exposure of the plants to the formulations via hydroponics (with physiological assessments and confocal microscopy). The results obtained were: nanoatrazine formulations inhibited the photosystem II (PSII) activity of corn plants to a greater extent. Oxidative stress markers (resulting from PSII inhibition) and antioxidant enzymatic activity were observed in greater intensity in corn plants that received application of nanoatrazine, while in plants applied with ATZ there was greater detoxifying activity of glutathione S-transferase (GST) and lower stress levels. Corn plants showed tolerance to all formulations tested. The PCL+ATZ and ZN+ATZ formulations enhanced the herbicidal activity of atrazine in *B. pilosa* and *R. sativus*, promoting greater inhibition of PSII activity and electrolyte leakage in relation to ATZ. In *B. pilosa* plants, the application of ZN+ATZ resulted in the highest antioxidant enzymatic activity in relation to the other formulations. For both species there was inhibition of the detoxifying activity of GST. The post-emergence herbicidal activity of PCL+ATZ was enhanced with the chitosan coating of the PCL/CS+ATZ formulation, leading to higher percentages of PSII inhibition and better weed control. However, when exposed via hydroponics, root absorption was impaired, and the interaction between the PCL/CS+ATZ NCs and the superficial layers of the roots could be observed. The three atrazine-carrying nanosystems tested increased the efficiency of a.i. in post-emergence applications. Combating oxidative stress is an important mechanism of corn plant tolerance to nanoatrazine. The mode of action of nanoatrazine varied depending on the weed species targeted for application. The interactions between the electrical charges of the

NCs and the external layers of the plants are a key point for the success of the application.

Palavras-chave: *Bidens pilosa* L.; nanoherbicide; oxidative stress in plants; PSII; *Raphanus sativus* L.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inibição da eficiência máxima do fotossistema II (FSII) em plantas de milho (*Zea mays*) nos períodos de **(a)** 24 h, **(b)** 48 h, **(c)** 72 h, **(d)** 96 h e **(e)** sete dias após aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ), nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ); e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) e zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volume de formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$73

Figura 2. Taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) em plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ), e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) ou zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2); nos tempos de **(a)** 24, **(b)** 48, **(c)** 72 e **(d)** 96 horas após aplicação. Em **(a)**, letras minúsculas diferentes indicam diferença entre formulações, e letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre volumes de formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$. Em **(b)**, **(c)** e **(d)**, letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações dentro do mesmo volume de formulação, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volumes dentro da mesma formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$75

Figura 3. Taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) em plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ), e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) ou zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2); nos tempos de **(a)** sete, **(b)** 14 e **(c)** 21 dias após aplicação. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre

formulações, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volumes de formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$77

Figura 4. Condutância estomática (g_s) em plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ), e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) ou zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2); nos tempos de **(a)** 48 e **(b)** 72 horas após aplicação. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações dentro do mesmo volume pelo teste Tukey $p \leq 0,05$, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volumes dentro da mesma formulação pelo teste F $p \leq 0,05$78

Figura 5. **(a)** Número de folhas expandidas, **(b)** Diâmetro do colmo, **(c)** Altura de plantas e **(d)** Comprimento de raiz de plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ), em nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS+ATZ), nanocápsulas por zeína (ZN+ATZ) e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) e zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2). Em **(a)**, **(b)**, e **(c)** letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações dentro do mesmo volume, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volumes dentro da mesma formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$. Em **(d)**, letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os volumes de formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$80

Figura 6. **(a)** Massa fresca de parte aérea (MFPA), **(b)** Massa fresca de raízes (MFR), **(c)** Massa seca de parte aérea (MSPA) e **(d)** Massa seca de raízes (MSR) de plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ), em nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS+ATZ), nanocápsulas por zeína (ZN+ATZ) e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) e zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹

(D2). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações dentro do mesmo volume pelo teste Tukey $p \leq 0,05$, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volumes dentro da mesma formulação pelo teste F $p \leq 0,05$82

Figura 7. (a) Índice SPAD, (b) quantidade de dienos conjugados (DC), (c) quantidade de malondialdeído (MDA) e (d) quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha^{-1} ; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$85

Figura 8. Atividade da (a) glutational S-transferase (GST), (b) ascorbato peroxidase (APX), (c) catalase (CAT), (d) peroxidases (POD), e (e) superóxido dismutase (SOD) em folhas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha^{-1} ; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Em (a), letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos independente do tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos, independente do tratamento, pelo teste Tukey $p \leq 0,05$. Em (b), (c) e (d), letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$89

Figura 9. Análise de componentes principais das variáveis fisiológicas e bioquímicas avaliadas em plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha^{-1}91

Figura 10. Mapa de calor das variáveis fisiológicas e bioquímicas avaliadas em plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona)

(PCL+ATZ), nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹.93

Figura 11. Deposição das gotas da calda de aplicação de atrazina nas formulações (a) convencional (ATZ) e nanoencapsulada por (b) poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), (c) poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou (d) zeína (ZN+ATZ) e (e) água sobre folhas de plantas de milho (*Zea mays*) no momento da aplicação.99

Figura 12. (a) Inibição da eficiência máxima do fotossistema II (FSII) e **(b)** Inibição da taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) em plantas de *Raphanus sativus* nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA) de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos independente do tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos, independente do tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$120

Figura 13. (a) Inibição da eficiência máxima do fotossistema II (FSII) e **(b)** Inibição da taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) em plantas de *Bidens pilosa* nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA) de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$122

Figura 14. Folhas de *Raphanus sativus* sem e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹; às 24, 48 e 72 horas após aplicação.123

Figura 15. Folhas de *Bidens pilosa* sem e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹; às 24, 48 e 72 horas após aplicação.124

Figura 16. Marcadores de estresse oxidativo **(a)** peróxido de hidrogênio (H₂O₂), **(b)** malondialdeído (MDA) e **(c)** extravasamento de eletrólitos (EE) em plantas de *Raphanus sativus* sem aplicação de atrazina (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona)

(PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Em **(a)** e **(b)**, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos independente do tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos, independente do tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$. Em **(c)**, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$126

Figura 17. Marcadores de estresse oxidativo **(a)** peróxido de hidrogênio (H₂O₂), **(b)** malondialdeído (MDA) e **(c)** extravasamento de eletrólitos (EE) em plantas de *Bidens pilosa* sem aplicação de atrazina (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ε-caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$129

Figura 18. Atividade da **(a)** ascorbato peroxidase (APX), **(b)** catalase (CAT), **(c)** peroxidases (POD) e **(d)** superóxido dismutase (SOD) e **(e)** glutathiona S-transferase (GST), em plantas de *Raphanus sativus* sem aplicação de atrazina (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ε-caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Em **(a)** e **(b)**, letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento por teste Tukey $p \leq 0,05$. Em **(c)**, **(d)** e **(e)**, letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos independente do tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos independente do tratamento por teste Tukey $p \leq 0,05$132

Figura 19. Atividade da **(a)** ascorbato peroxidase (APX), **(b)** catalase (CAT), **(c)** peroxidases (POD) e **(d)** superóxido dismutase (SOD) e **(e)** glutathiona S-transferase (GST) em plantas de *Bidens pilosa* sem aplicação de atrazina (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ε-caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Em **(a)**, **(b)**, **(c)** e **(d)**, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras

minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$. Em (e), letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos independente do tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos independente do tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$136

Figura 20. Análise de componentes principais (PCA) das variáveis fisiológicas e bioquímicas avaliadas em plantas de *Raphanus sativus* e *Bidens pilosa* sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹.138

Figura 21. Mapa de calor das variáveis fisiológicas e bioquímicas avaliadas em plantas de *Raphanus sativus* e *Bidens pilosa* sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹.140

Figure 22. Size distribution, average hydrodynamic size, polydispersity index (PDI) and zeta potential for the nanoformulations: (a, b, c) control polycaprolactone (PCL) nanocapsules; (d, e, f) polycaprolactone nanocapsules containing atrazine (PCL-ATZ); (g, h, i) control polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS); (j, k, l) polycaprolactone nanocapsules containing atrazine and coated with chitosan (PCL/CS+ATZ); (m) morphology and (n) size distribution of PCL/CS+ATZ nanocapsules; (o) encapsulation efficiency of atrazine in PCL/CS+ATZ nanocapsules for a period of 120 days.165

Figure 23. (a) In vitro release curves for commercial atrazine (ATZ) and polycaprolactone nanocapsule nanoformulation containing atrazine and coated with chitosan (PCL/CS+ATZ). (b) Release data fitted to the Korsmeyer and Peppas kinetic model.166

Figure 24. Inhibition of photosystem II (PSII) activity of *Bidens pilosa* plants at 24 (a), 48 (b), 72 (c), and 96 (d) hours after foliar application of commercial atrazine (ATZ), polycaprolactone nanocapsules containing atrazine (PCL+ATZ) and atrazine-containing polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS+ATZ) in three doses of active ingredient (200, 1000, and 2000 g a.i. ha⁻¹). Different uppercase letters indicate differences between formulations within the same dose, and different

lowercase letters indicate differences between doses of the same formulation by Tukey's test ($p \leq 0.05$). Data represent means \pm standard deviation ($n = 5$).168

Figure 25. (a) Images of representative units, (b) shoot dry mass (SDM) reduction and (c) root dry mass (RDM) reduction of *Bidens pilosa* plants 14 days after application of commercial atrazine (ATZ), polycaprolactone nanocapsules containing atrazine (PCL+ATZ) and atrazine-containing polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS+ATZ) in three doses of active ingredient (200, 1000 and 2000 g a.i. ha⁻¹). Different uppercase letters indicate differences between formulations regardless of dose, and different lowercase letters indicate differences between doses regardless of formulation by Tukey test $p \leq 0.05$. Data represent means \pm standard deviation ($n = 5$).170

Figure 26. (a) Inhibition of photosystem II (PSII) activity and (b) inhibition of the relative electron transport rate (rETR) of *Bidens pilosa* plants exposed to atrazine (8 mg L⁻¹) in hydroponic system with conventional formulation (ATZ) or polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS+ATZ). The presence of an asterisk (*) indicates a significant difference between the PCL/CS+ATZ and conventional formulation (ATZ) within each time analyzed according to the F test ($p \leq 0.05$). Data represent means \pm standard deviation ($n = 8$).171

Figure 27. Quantification of endogenous atrazine levels in (a) roots, (b) stems, and (c) leaves of *Bidens pilosa* plants exposed to atrazine (8 mg L⁻¹) in a hydroponic system with conventional formulation (ATZ) or atrazine-containing polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS+ATZ). The presence of an asterisk (*) indicates a significant difference between the PCL/CS+ATZ and conventional formulation (ATZ) within each time analyzed according to the F test ($p \leq 0.05$). Data represent means \pm standard deviation ($n = 5$).172

Figure 28. Fluorescence intensity measured in root, stem, and leaf extracts of *B. pilosa* plants hydroponically exposed to the atrazine-containing polycaprolactone nanocapsules coated with fluorescently-labeled chitosan (PCL/CSf+ATZ nanoformulation). Different lowercase letters indicate differences among time-points according to Tukey's test ($p \leq 0.05$). Data represent means \pm standard deviation ($n = 5$).173

Figure 29. Representative confocal microscopy images of chitosan-coated PCL nanocapsules containing atrazine and labeled with FITC (PCL/CSf+ATZ) in *B. pilosa* tissues as a function of exposure time in the hydroponic system (1, 2, 4, 12, 24, and 36 h after exhibition). The figure shows representative images of the root maturation zone, root branching zone, and leaf. Images were obtained at 20x magnification. The negative control refers to plants maintained in distilled water. Stoma (st), trichomes (tr), vascular cylinder (vc), vessel element (ve), cortex (co), epidermis (ep), absorbent hairs (rh). Bars = 50 μ m. Data represent means \pm standard deviation (n = 3).**174**

Figure 30. Fluorescence intensity measured as arbitrary fluorescence units (A.F.U.) by confocal microscopy in the (a) root maturation zone, (b) root branching zone, and (c) adaxial surface of the leaf. The negative control refers to plants maintained in distilled water. Letters indicate differences between time intervals (Tukey's test, $p \leq 0.05$) in each region. Data represent mean \pm standard deviation (n = 3).**176**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atributos químicos do solo utilizado como substrato no experimento com milho e formulações de atrazina.	60
Tabela 2. Concentração final de sais da solução nutritiva aplicada aos vasos cultivados com milho.	62
Tabela 3. Resumo da análise de variância para as variáveis fisiológicas de inibição da eficiência máxima do fotossistema II (In.FSII), taxa relativa de transporte de elétrons (rETR) e condutância estomática em plantas de milho (<i>Zea mays</i>) após a aplicação das formulações de atrazina convencional, atrazina nanoencapsulada e nanocápsulas poliméricas sem ingrediente ativo em duas doses.	71
Tabela 4. Resumo da análise de variância para as variáveis biométricas número de folhas expandidas (NF), diâmetro do caule (DC), altura de plantas (AP), comprimento de raízes (CR), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa fresca de raízes (MFR), massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) em plantas de milho (<i>Zea mays</i>) após a aplicação das formulações de atrazina convencional, atrazina nanoencapsulada e nanocápsulas poliméricas sem ingrediente ativo em duas doses.	79
Tabela 5. Atributos químicos do solo utilizado como substrato no experimento com milho e formulações de atrazina.	111
Table 6. Visual evaluation scores of control of <i>Bidens pilosa</i> plants 14 days after application of atrazine at doses of 200, 1000, and 2000 g a.i. ha ⁻¹ in the formulations: conventional (ATZ), polycaprolactone nanocapsules (PCL+ATZ), or polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS+ATZ).	169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALS	Acetolactato sintase
APX	Ascorbato peroxidase
ATZ	Atrazina convencional
CAT	Catalase
D1	Dose 1000 g i.a. ha ⁻¹
D2	Dose 2000 g i.a. ha ⁻¹
DAA	Dias após aplicação
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FSII	Fotossistema II
HAA	Horas após aplicação
Kg ha ⁻¹	Quilograma por hectare
MDA	Malondialdeído
NCs	Nanocápsulas
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PCL+ATZ	Atrazina em NCs de PCL
PCL/CS	NCs de PCL com revestimento de quitosana
PCL/CS+ATZ	Atrazina em NCs de PCL com revestimento de quitosana
POD	Peroxidase
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
ZN	Zeína
ZN+ATZ	Atrazina em NCs de zeína

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1. MILHO	26
2.1.1. Importância Econômica.....	26
2.1.2. Fisiologia do Desenvolvimento	27
2.1.3. Controle de Plantas Daninhas no Cultivo de Milho	28
2.2. PLANTAS DANINHAS.....	29
2.2.1. Controle Químico de Plantas Daninhas	30
2.2.2. Mecanismos de ação dos herbicidas	30
2.2.2.1. Inibidores da fotossíntese no fotossistema II	30
2.2.2.1.1. <i>Atrazina</i>	31
2.2.3. Suscetibilidade, Tolerância e Resistência.....	33
2.2.3.1. Tolerância e resistência à atrazina	34
2.2.4. Nabo Forrageiro (<i>Raphanus sativus</i> L.)	36
2.2.5. Picão (<i>Bidens pilosa</i> L.)	36
2.3. NANOTECNOLOGIA.....	37
2.3.1. Nanopartículas Poliméricas	38
2.3.2. Atrazina Nanoencapsulada.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO I	57
3. RESPOSTAS DE TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE MILHO (<i>ZEA MAYS</i> L.) A TRÊS NANOFORMULAÇÕES DE ATRAZINA.....	57
3.1. RESUMO.....	57
3.2. INTRODUÇÃO.....	58
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.3.1. Material Vegetal e Condição de Cultivo	59
3.3.2. Formulações	60
3.3.3. Experimento 1	62
3.3.4. Experimento 2.....	63

3.3.5.	Avaliações.....	63
3.3.5.1.	Avaliações fisiológicas	63
3.3.5.2.	Avaliações biométricas	65
3.3.5.3.	Avaliações bioquímicas.....	66
3.3.6.	Análise Estatística.....	70
3.4.	RESULTADOS	70
3.4.1.	Experimento 1	70
3.4.1.1.	Avaliações fisiológicas	70
3.4.1.2.	Variáveis morfológicas.....	78
3.4.2.	Experimento 2	83
3.4.2.1.	Avaliações bioquímicas.....	83
3.4.3.	Análise de Componentes Principais e Mapa de Calor	90
3.5.	DISCUSSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
	CAPÍTULO II	108
	4. MODO DE AÇÃO DE NANOATRAZINA EM PLANTAS DANINHAS COM DIFERENTE SUSCETIBILIDADE AO INGREDIENTE ATIVO.....	108
4.1.	RESUMO.....	108
4.2.	INTRODUÇÃO.....	109
4.3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	111
4.3.1.	Material Vegetal e Condições de Cultivo	111
4.3.2.	Formulações	112
4.3.3.	Delineamento Experimental	113
4.3.4.	Avaliações.....	113
4.3.4.1.	Avaliações fisiológicas	113
4.3.4.2.	Avaliações bioquímicas.....	115
4.3.5.	Análise Estatística.....	119
4.4.	RESULTADOS	119
4.4.1.	Parâmetros Fisiológicos.....	119
4.4.2.	Sintomas Visuais	122
4.4.3.	Marcadores de Estresse Oxidativo	124
4.4.4.	Atividades Enzimáticas	129
4.4.5.	Análise de Componentes Principais e Mapa de Calor	137

4.5.	DISCUSSÃO.....	140
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
	 CAPÍTULO III	 154
	5. CHITOSAN COATING AS A STRATEGY TO INCREASE POST-EMERGENT HERBICIDAL EFFICIENCY AND ALTER THE INTERACTION OF NANOATRAZINE WITH <i>BIDENS PILOSA</i> L. PLANTS¹	154
5.1.	ABSTRACT	154
5.2.	INTRODUCTION.....	155
5.3.	MATERIAL AND METHODS.....	157
5.3.1.	Synthesis of Nanoformulations	157
5.3.2.	Functionalization of Chitosan with FITC and Preparation of Labeled Nanoformulations	158
5.3.3.	Characterization and Stability of Nanoformulations	158
5.3.4.	Release Assays	159
5.3.5.	Herbicidal Activity Assay	160
5.3.6.	Absorption and Translocation Assay in Hydroponic System.....	162
5.3.7.	Confocal Microscopy.....	162
5.3.8.	Extraction and Quantification of Atrazine and Fluorescent Probe in Plant Tissues	163
5.3.9.	Statistical Analysis	164
5.4.	RESULTS	164
5.4.1.	Characterization and Stability of Nanoformulations	164
5.4.2.	Herbicidal Activity Evaluation.....	166
5.4.3.	Evaluation of Absorption and Transport of Nanocapsules in Hydroponic System	171
5.5.	DISCUSSION.....	176
	REFERENCES.....	179
	 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 184
	 APÊNDICE A	 186
	APÊNDICE B	187

1. INTRODUÇÃO

Dentre as práticas de manejo de cultivos agrícolas está o controle de plantas daninhas, que tem como finalidade propiciar um ambiente favorável para o desenvolvimento das plantas de interesse cultivadas. Durante o cultivo do milho, os herbicidas compostos pelo ingrediente ativo (i.a.) atrazina são a base para o controle químico de plantas daninhas, pois, assim como a cana-de-açúcar e sorgo, as plantas de milho toleram a aplicação desse i.a. sem comprometer o seu desenvolvimento.

A atrazina é uma molécula herbicida inibidora da atividade do fotossistema II (FSII), indicada para o controle de plantas daninhas eudicotiledôneas e algumas gramíneas em modalidade de pré e pós-emergência inicial. O mecanismo de ação da atrazina consiste em competir pelo sítio de ligação da plastoquinona na proteína D1 presente no FSII, inibindo a sua atividade ao interromper o fluxo de elétrons para o fotossistema I. Essa interrupção resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's). A morte das plantas é então causada pelo estresse oxidativo gerado pelas ERO's, que levam a danos irreversíveis em membranas e outros componentes celulares.

Algumas espécies de plantas daninhas são tolerantes à molécula de atrazina por apresentarem modificações no sítio de ligação da proteína D1, metabolismo de detoxificação ou alterações em sua morfologia e anatomia, que dificultam a penetração e translocação do herbicida. Outro desafio diante a utilização de atrazina é o fato de ser banida da agricultura em países europeus devido aos casos de contaminação ambiental dos recursos hídricos (SINGH et al., 2018). No Brasil, a presença desse herbicida em recursos hídricos de regiões agrícolas também já foi detectada, em quantidades superiores ao recomendado pela legislação (DIAS et al., 2018). Assim, metodologias que aprimorem a atividade herbicida dessa molécula são bem-vindas, sobretudo, com o intuito de reduzir a quantidade de i.a. aplicada.

Por meio da incorporação da nanotecnologia à agricultura, torna-se promissor o desenvolvimento de produtos mais eficientes, de menor impacto ambiental e economicamente viáveis. A aplicação de agrotóxicos por meio de nanossistemas carreadores baseados em nanopartículas poliméricas tem demonstrado grande potencial de aperfeiçoamento de ingredientes ativos já disponíveis no mercado. Ao serem incorporadas em nanopartículas poliméricas, as moléculas de i.a. ficam protegidas de fatores ambientais de degradação e são melhoradas as características de adesão, penetração e translocação. Desse modo, os nanossistemas são capazes de

aumentar a eficiência, estabilidade e segurança, e reduzir as perdas no processo de aplicação dos agrotóxicos.

A nanoformulação de atrazina (nanoatrazina) com base em nanopartículas do polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL) tem demonstrado excelentes resultados de eficiência herbicida no controle de plantas daninhas. O aumento da eficiência herbicida de nanoatrazina já foi encontrado nos ambientes de casa de vegetação e campo, no controle de plantas da espécie modelo *Brassica juncea* (mostarda) e das daninhas *Amaranthus viridis* (caruru), *Bidens pilosa* (picão), *Digitaria insularis* (capim-amargoso) e *Raphanus raphanistrum* (nabiça) (OLIVEIRA et al., 2015a; Sousa et al., 2018; SOUSA et al., 2020; TAKESHITA et al., 2021). Contudo, a maior eficiência da nanoatrazina foi limitada no controle de plantas da espécie *Alternanthera tenela* (apaga-fogo), evidenciando que a espécie alvo da aplicação também influencia nos resultados (SOUSA et al., 2022).

A maior absorção de nanoatrazina por aberturas naturais das folhas (como estômatos e hidatódios) é citada como um dos fatores responsáveis pelo aumento da eficiência herbicida (BOMBO et al., 2019; TAKESHITA et al., 2021). Dessa maneira, a chegada do ingrediente ativo ao seu local de ação é facilitada, ocorre mais rapidamente e em maior quantidade, e leva ao aumento do estresse oxidativo causado às plantas (OLIVEIRA et al., 2015). Além disso, foi observado que a absorção de nanoatrazina pelas raízes via exposição em hidroponia também foi aumentada em comparação à formulação convencional, com rápida translocação do i.a. para a parte aérea e maior porcentagem de inibição do FSII (PREISLER et al., 2022).

Devido a maior eficiência herbicida proporcionada à molécula de atrazina pelo processo de nanoencapsulação utilizando o polímero PCL, a tolerância das plantas de milho foi comprometida em estudo desenvolvido a campo. A aplicação de nanoatrazina na dose 2000 g i.a. ha⁻¹ comprometeu o desenvolvimento das plantas de milho, inibindo a atividade do FSII em maior proporção que o i.a. convencional (em um curto período após a aplicação), reduzindo a altura e o acúmulo de massa das plantas avaliadas em longo prazo (SOUSA, 2020). Em casa de vegetação, (em experimento realizado anteriormente ao campo), a nanoatrazina havia causado apenas a inibição da atividade do FSII de maneira transitória, sem comprometer o crescimento e o acúmulo de massas das plantas de milho em curto prazo (OLIVEIRA et al., 2015b).

Assim, surgem novos desafios para o desenvolvimento dos nanossistemas carreadores de atrazina. Há a necessidade de serem aperfeiçoados a

fim de que apresentem baixa ou nenhuma fitotoxicidade às plantas não-alvo da aplicação, mais ainda sim conservando a maior atividade herbicida contra as plantas daninhas. Dois novos sistemas foram desenvolvidos pelo grupo de estudos do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da Universidade Estadual Paulista, o primeiro com a utilização de uma nova matriz polimérica para síntese de nanopartículas, a zeína, uma proteína produzida pelas plantas de milho; e o segundo por meio da modificação do sistema já existente, utilizando a técnica de revestimento das nanocápsulas de PCL com quitosana.

Apesar dos avanços e descobertas de fatores que promovem a maior eficiência de nanoatrazina, ainda existem pontos que não estão esclarecidos, como a interferência dos nanossistemas na geração de estresse oxidativo, atividade enzimática antioxidante e de detoxificação do i.a., ou a possível fitotoxicidade dos polímeros utilizados na síntese das nanocápsulas às plantas. A principal hipótese levantada para o desenvolvimento deste estudo é de que o aumento da eficiência herbicida de nanoatrazina no controle de plantas daninhas e fitotoxicidade às plantas de milho são dependentes de características das formulações e das espécies vegetais avaliadas.

O presente estudo, teve como objetivo geral avaliar a tolerância de plantas de milho a três nanossistemas carreadores de atrazina e a atividade herbicida desses nanossistemas no controle de plantas daninhas com diferente suscetibilidade à atrazina, por meio de análises morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das plantas de milho e análises morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e o controle de plantas daninhas. Teve como objetivos específicos: I) avaliar a tolerância das plantas de milho à atrazina contida nos nanossistemas de nanocápsulas de PCL, PCL revestidas com quitosana ou zeína; II) avaliar a atividade herbicida de atrazina contida nos nanossistemas de nanocápsulas de PCL ou zeína em espécies de plantas daninhas com diferente suscetibilidade ao ingrediente ativo. III) avaliar as respostas do revestimento das nanocápsulas de PCL com quitosana comparadas as mesmas nanocápsulas sem o revestimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MILHO

2.1.1. Importância Econômica

O milho (*Zea mays* L.) ocupa a segunda posição entre as culturas de maior importância econômica para a agricultura brasileira, sendo cultivado principalmente na região Centro-Sul (CONAB, 2023; SILVA et al., 2019; SOUZA; BARBOSA, 2015). No cenário global, também ocupa a segunda posição quanto a área de cultivo, totalizando cerca de 197 milhões de hectares cultivados (ERENSTEIN et al., 2022). Inicialmente, seu cultivo era feito em pequenas propriedades apenas para o consumo local, e passou a ocupar as áreas de grandes propriedades a partir da expansão do comércio de grãos, quando se tornou uma fonte de renda (MUNDSTOCK; SILVA, 2005). Trata-se de uma cultura com grande importância socioeconômica ao agronegócio brasileiro, versátil, de elevado potencial produtivo e cultivo destinado à produção de silagem ou grãos (ALVES et al., 2015; OLIGINI et al., 2019). Entre 70 e 80% da produção de grãos é utilizada para fabricar rações para aves, suínos e bovinos, e o restante consumido pela indústria para produção de óleo e etanol, e pela alimentação humana em forma de farinha, amido, milho verde e pipoca (ALVES et al., 2015; MUNDSTOCK; SILVA, 2005; OLIGINI et al., 2019; SILVA et al., 2020).

Um diferencial da cultura do milho é a possibilidade de cultivo de mais de uma safra dentro de um mesmo ano agrícola (ARTUZO et al., 2019). No Brasil, no ano agrícola (2022/23), foram cultivados aproximadamente 22,3 milhões de hectares de milho, sendo 20% dessa área cultivados em primeira safra, 77% em segunda safra e 3% em terceira safra, com uma produtividade de 6.160 kg ha⁻¹, 5.947 kg ha⁻¹ e 3.617 kg ha⁻¹, respectivamente, que resultou em uma produção de aproximadamente 131,9 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2023). No estado do Paraná, em mesmo ano agrícola, a área de milho destinada ao cultivo de grãos correspondeu a aproximadamente 2,8 milhões de hectares, sendo 379,1 mil hectares cultivados em primeira safra e o restante na segunda, produtividades de 10.135 kg ha⁻¹ e 5.972 kg ha⁻¹, respectivamente, e produção de aproximadamente 18 milhões de toneladas de grãos (SEAB/DERAL, 2023).

A partir do primeiro levantamento da safra de grãos realizado pela *Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB* no ano agrícola de 1976/77, ao longo de 46 safras pode-se notar que no Brasil a área destinada ao cultivo de milho teve

acréscimo de aproximadamente 89%, saindo de 11,8 milhões de hectares e chegando a marca de 22,3 milhões de hectares cultivados, com aumento de cerca de 221% de produtividade, saltando de 1.632 kg ha⁻¹ para 5.241 kg ha⁻¹, e aumento de 594% de produção, alcançando a marca de 131,9 milhões de toneladas de grãos colhidas no ano agrícola 2022/23, ante aos 19 milhões iniciais (CONAB, 2023). O aumento de produtividade ao longo de 46 safras é fruto da seleção de cultivares com alto potencial produtivo e da adoção de novas práticas de cultivo, que envolvem o preparo do solo, adubação e controle de pragas, doenças e plantas daninhas (GALVÃO et al., 2014). O potencial produtivo do milho em segunda e terceira safra geralmente mostra-se menor que o cultivado em primeira safra devido a condições adversas do ambiente, como o menor volume de precipitação, temperaturas baixas e menor radiação solar (CRUZ et al., 2013).

2.1.2. Fisiologia do Desenvolvimento

Após o plantio do milho, independente do ciclo e da cultivar escolhida, o desenvolvimento das plantas poderá ser acompanhado por escalas fenológicas. A escala fenológica mais utilizada é a escala de Ritchie, Hanway e Benson (1993), que tem como base Hanway (1963) acrescentada de maiores detalhamentos do desenvolvimento das plantas (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014). Nessa escala são expostas as principais características, necessidades e riscos para a cultura, desde a germinação e emergência de plântulas, estádios de desenvolvimento vegetativo (V), até os estádios reprodutivos (R), enumerados em ordem crescente.

Desde que não haja deficiência hídrica, a temperatura do ar e a irradiação solar se tornam os elementos climáticos limitantes para a produção de milho (SOUZA; BARBOSA, 2015; WAGNER et al., 2011). A partir do estágio V₂ inicia-se o processo de acúmulo de biomassa via fotossíntese. A região de crescimento das plantas (meristema) nesse momento situa-se abaixo do solo, onde permanece até o estágio de desenvolvimento V₁₀. Quando as plantas atingem por volta do estágio V₄ e V₅, todas as suas estruturas vegetativas (folhas), bem como os primórdios das inflorescências já estão formados. Desse modo, começam a ser estabelecidos os potenciais produtivos das plantas, como o número de fileiras por espiga, número de grãos por fileiras e número total de grãos por espiga. A partir desse ponto, o desenvolvimento vegetativo ocorre pela emissão das novas folhas e o incremento de massa fresca até a emissão do pendão

(V_T), momento em que o desenvolvimento vegetativo cessa e têm início o desenvolvimento reprodutivo (BARROS; CALADO, 2014).

O conhecimento sobre a fenologia da cultura do milho a partir das caracterizações das plantas é fundamental para que se tenha conhecimento das relações das plantas com as condições ambientais, das suas sensibilidades e necessidades, de acordo com cada estágio de desenvolvimento (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014). Ainda, possibilita que sejam montadas as estratégias de manejo adequadas exigidas pela cultura, como por exemplo, o controle de plantas daninhas, pragas e doenças, adubação, irrigação, entre outros (KOZLOWSKI, 2002).

2.1.3. Controle de Plantas Daninhas no Cultivo de Milho

A prática de controle de plantas daninhas durante o cultivo de milho é indispensável, visto que as perdas em produtividade causadas pela presença dessas plantas estão em torno de 15%, podendo atingir até 90%. Os efeitos negativos no desenvolvimento das plantas de milho causados por plantas daninhas variam de acordo com o grau de infestação, espécie, estágio fenológico da cultura e a duração do período de interferência (CONSTANTIN et al., 2007; KOZLOWSKI; KOEHLER; PITELLI, 2009). O milho é uma espécie de planta cultivada que tem grande potencial de competição e supressão do crescimento de plantas daninhas. Porém, é preciso que ela se estabeleça em condições favoráveis para que ocupe o papel de espécie dominante diante da comunidade de plantas infestantes (KOZLOWSKI; KOEHLER; PITELLI, 2009).

O período total de prevenção a interferência (PTPI) das plantas daninhas na cultura do milho ocorre entre os estádios V₂ e V₇ (entre a segunda e sétima folhas expandidas). A partir de V₅, a falta de um controle eficiente implicará em menor rendimento de grãos, pois, no estágio V₆ ocorre a determinação do primeiro potencial de produtividade da cultura, o número de fileiras de grãos por espiga (CIAMPITTI; ELMORE; LAUER, 2011; KOZLOWSKI, 2002). Assim, se o controle de plantas daninhas na cultura do milho for realizado tardiamente, essa ação será irrelevante em contribuir para o aumento de produtividade, pois a partir do momento em que as plantas já definiram o seu potencial produtivo não há mais respostas a interferência das plantas daninhas (KOZLOWSKI; KOEHLER; PITELLI, 2009).

A utilização do método de controle químico de plantas daninhas na cultura do milho proporciona maior eficiência e elevado rendimento operacional para

grandes áreas de cultivo mas, fica condicionada à escolha correta do produto e ao momento adequado da aplicação (CARVALHO et al., 2010; KARAM, 2009; TERRA et al., 2014). No quesito época de aplicação, o sucesso do controle químico fica condicionado ao momento adequado para que a aplicação do herbicida não cause injúrias às plantas de milho nem afete o seu potencial produtivo, e que coincida com o momento de maior suscetibilidade das plantas daninhas (LÓPES-OVEJERO et al., 2003). Durante o cultivo de milho segunda safra, dentre as técnicas do manejo integrado de plantas daninhas pelo controle químico, o ingrediente ativo atrazina compõe a maioria dos herbicidas utilizados (GRIGOLLI, 2016; RODRIGUES et al., 2019). As plantas de milho são tolerantes à atrazina pois apresentam em seu metabolismo a capacidade de metabolizar e detoxificar essa molécula herbicida (CHERIFI, et al., 2001; EVANS JUNIOR et al., 2017), o que permite uma aplicação segura do herbicida sem comprometer o seu desenvolvimento.

2.2. PLANTAS DANINHAS

Planta daninha pode ser definida como qualquer espécie de planta que ocorra em local não desejado pelo homem, sobretudo, nas atividades agrícolas (CONSTANTIN et al., 2013; SILVA et al., 2021). Assim, até mesmo espécies de interesse agrícola podem ser consideradas plantas daninhas, dependendo da época em que aparecem nas lavouras (SCAVO; MAUROMICALE, 2020). Apesar de algumas das espécies consideradas plantas daninhas possuírem propriedades medicinais ou fazerem parte do grupo das PANCs (Plantas Alimentícias Não Convencionais), na maioria das vezes, estão relacionadas a aspectos negativos à saúde humana. Essas plantas são capazes de causar alergias, intoxicação ou problemas e prejuízos em rodovias, ferrovias, calçadas, jardins, e principalmente em pastagens e lavouras (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2011).

Quando presente nas lavouras, os prejuízos em produtividade podem ser diretos devido a competição por água, luz, nutrientes e liberação de compostos alelopáticos, ou indiretos, atuando como hospedeiras alternativas de pragas, doenças e nematoides, além de dificultar a operação de colheita (CONSTANTIN et al., 2013; KOZLOWSKI; KOEHLER; PITELLI, 2009; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2011). Geralmente, as espécies de plantas daninhas verdadeiras têm maior rusticidade, característica que

proporciona vantagem em seu estabelecimento e propagação mesmo que em ambientes com condições adversas (CONSTANTIN et al., 2013).

2.2.1. Controle Químico de Plantas Daninhas

O controle de plantas daninhas caracteriza-se por uma prática que busca suprimir o crescimento e/ou reduzir o número de plantas daninhas em uma área (VARGAS; PEIXOTO; ROMAN, 2006). A adoção do método de controle químico apresenta características positivas como a possibilidade de controle das plantas daninhas ainda no início do ciclo de cultivo, controle efetivo na linha de semeadura, flexibilidade quanto à época de aplicação e elevado rendimento operacional (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2011). Existem algumas limitações quanto à utilização de herbicidas, como a necessidade de uniformidade de aplicação e distribuição do ingrediente ativo, calibração correta do equipamento, seleção de biótipos de plantas resistentes, ocorrência de deriva e o lançamento de resíduos tóxicos no meio ambiente (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2011; TERRA et al., 2014)

2.2.2. Mecanismos de ação dos herbicidas

Os herbicidas podem ser classificados quanto à seletividade (seletivos e não-seletivos), translocação (de contato ou sistêmico), época de aplicação (pré-plantio e incorporado, pré-emergente ou pós-emergente), estrutura química e mecanismo de ação, sendo a última uma das mais utilizadas para a escolha do produto (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2011). Os mecanismos de ação descrevem a principal rota metabólica afetada pelo herbicida na planta (CHRISTOFFOLETI et al., 2016). A classificação dos herbicidas quanto ao mecanismo de ação permite o planejamento e a escolha do produto para um controle eficiente de plantas daninhas. Segundo o *Comitê de Ação a Resistência aos Herbicidas* (HRAC), existem 15 grupos herbicidas com diferentes mecanismos de ação (HRAC, 2022).

2.2.2.1. Inibidores da fotossíntese no fotossistema II

Segundo a classificação do HRAC, os herbicidas compostos por ingredientes ativos inibidores da fotossíntese no fotossistema II (FSII) representam o grupo C, que é subdividido nas classes C1, C2 e C3. Essa subdivisão é pelo fato de

diferentes grupos químicos compartilhem o mesmo mecanismo de ação, mas com moléculas que se acoplam à proteína D1 de maneiras diferentes (OLIVEIRA JUNIOR et al, 2011). As classes C1 e C2 representam as moléculas de ativos acopladores da D1 serina 264, compreendendo as amidas, triazinas, triazinonas, triazolinonas, uracilas e ureias. Já a classe C3 representa os ativos acopladores da D1 histidina 215 e compreende as benzotiadiazinonas e nitrilas (HRAC, 2022).

2.2.2.1.1. *Atrazina*

A molécula química atrazina (6-chloro-N²-ethyl-N⁴-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) é a mais importante do grupo das triazinas, e seu uso na agricultura com ação herbicida é destacado (COUTINHO et al., 2005). Sua aplicação é recomendada principalmente para o controle de plantas daninhas na cultura do milho, sorgo e cana-de-açúcar (BRASIL, 2020). Ela foi introduzida no mercado no ano de 1958 e tem sido amplamente utilizada desde a década de 1970 (GOLLA et al., 2011; NAKKA et al., 2017). Os herbicidas que contêm atrazina como ingrediente ativo são recomendados para o controle de plantas daninhas eudicotiledôneas e algumas gramíneas, nas modalidades de aplicação de pré e pós-emergência inicial (COUTINHO et al., 2005; HANSEN et al., 2013; KARAM, 2009; SILVA et al., 2013). Por se tratar de um herbicida sistêmico, sua absorção ocorre em maior parte pelas raízes, chegando na parte aérea das plantas a partir da translocação via xilema (KARAM, 2009; SILVA et al., 2013).

Uma vez presente no metabolismo vegetal, seu modo de ação é inibir a fotossíntese ao inibir a atividade do FSII e gerar estresse oxidativo, o que resulta na morte das plantas. Por meio da competição com a plastoquinona Q_B pelo sítio de ligação à proteína D1, a molécula de atrazina interrompe o transporte de elétrons da plastoquinona Q_A para a Q_B na cadeia de transporte de elétrons. As plastoquinonas são moléculas importantes no transporte de elétrons entre o FSII e o fotossistema I. Com a interrupção do transporte, a geração de ATP em consequência da cadeia de transporte de elétrons e a redução de NADP⁺ em NADPH ao fim desta cadeia também é interrompida, tendo assim como primeiro resultado negativo às plantas a interrupção da fixação de CO₂ (DAYAN et al., 2019; NAKKA et al., 2017). Na presença de luz e com o fluxo de elétrons interrompido, as moléculas de clorofila continuam captando energia luminosa e atingindo o estado de excitação, mas ficam impossibilitadas de transferir a

energia ou os elétrons a seus receptores usuais. Dessa forma, estes elétrons liberados podem reagir com moléculas de oxigênio e formar espécies reativas (ERO's) que danificam componentes celulares (TAIZ et al., 2017). A morte das plantas após a aplicação de atrazina será resultante da destruição de membranas, morte das células e dos tecidos em decorrência da oxidação de moléculas biológicas (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2011). Por exemplo, a peroxidação de lipídeos por ação das ERO's está associada à perda da função de biomembranas (LIMA; ABDALLA, 2001). O sintoma inicial característico da aplicação desse herbicida é a clorose entre as nervuras e nas bordas das folhas, em decorrência da foto-oxidação das moléculas de clorofila e que evoluem para necrose em função da morte das células e do tecido vegetal devido com a oxidação de outras biomoléculas (KARAM; OLIVEIRA, 2007). Quando aplicado em modalidade pré-emergente, a morte das plantas suscetíveis ocorre somente após a emergência, quando as plântulas entram em contato com a luz solar e então são desencadeadas as reações de inibição da atividade do FSII e geração de estresse oxidativo (KARAM; GAMA, 2008).

Por ser utilizada em larga escala e em decorrência da baixa afinidade com os componentes do solo, a atrazina e seus compostos secundários são frequentemente encontrados em águas superficiais e subterrâneas de regiões agrícolas. Somado à sua característica de persistência no ambiente de 41-231 dias, representa um risco ambiental (ALBUQUERQUE et al., 2020; HANSEN et al., 2013; SINGH et al., 2018). Este ingrediente ativo está banido da União Europeia desde o ano de 2004, é de uso restrito no Estados Unidos da América e restringido na Austrália por conta das concentrações encontradas em águas subterrâneas e superficiais serem superiores ao estabelecidos pelas agências ambientais de cada localidade (HANSEN et al., 2013; BRITO, 2018). A restrição do uso de atrazina nesses países é um chamado de alerta para os demais.

De acordo com os dados do último boletim de comercialização de ingredientes ativos gerado pelo *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA*, a atrazina ocupa a quarta posição entre os dez ingredientes ativos mais comercializados no Brasil, com aproximadamente 42 mil toneladas vendidas (BRASIL, 2022). No Brasil, a regulamentação para a quantidade de agrotóxicos encontrados em águas é realizada pelo *Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA*. Segundo a sua resolução N°357/2005, a quantidade de atrazina permitida em águas doces das classes 1 a 3 (destinadas ao abastecimento e consumo

humano, irrigação na agricultura, atividades de recreação, proteção das comunidades aquáticas, dessedentação de animais, aquicultura e atividade de pesca) não deve ser superior a $2 \mu\text{g L}^{-1}$, para que assim atenda ao padrão de qualidade. Em estudos que quantificaram a presença desse ingrediente ativo em águas no Brasil, as concentrações encontradas em águas de regiões subterrâneas variaram entre 0,001 e $18,96 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto na água tratada e disponibilizada para o consumo as concentrações estiveram entre 0,0043 e $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$ (DIAS et al., 2018). A preocupação quanto à contaminação de águas por esse ingrediente ativo é devido a sua toxicidade a humanos e outros animais. Quando presente no organismo animal, a atrazina pode atuar como um disruptor endócrino, com capacidade de alterar o desenvolvimento sexual e reprodutivo e de apresentar efeito carcinogênico em humanos (CARMO et al., 2013; COUTINHO et al., 2005; GOLLA et al., 2011).

2.2.3. Suscetibilidade, Tolerância e Resistência

A aplicação de determinado herbicida em uma área agrícola pode ser letal para algumas espécies de plantas e para outras não. Às plantas que morrem após a aplicação da dose recomendada do herbicida (dose de bula), é atribuída a propriedade de suscetível, enquanto às que sobrevivem podem ser atribuídas as propriedades de tolerância ou resistência (CHRISTOFFOLETI; CARVALHO, 2009; CHRISTOFFOLETI et al., 2016). A suscetibilidade de plantas a herbicidas é uma característica altamente dependente da espécie e da condição ambiental em que a mesma se encontra (DALTON; BOUTIN, 2010). Segundo a *Weed Science Society of America - WSSA*, a tolerância é uma característica natural (inerente) de determinada espécie de planta em sobreviver, mesmo que com algumas injúrias, à aplicação de uma dose de herbicida que seria letal para outras espécies; enquanto a resistência é descrita como a capacidade herdável de alguns biótipos, dentro de uma determinada população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição à dose de um herbicida que normalmente seria letal a população suscetível (WSSA, 1998). Para a tolerância, não existem processos de seleção em decorrência da aplicação de herbicidas, sendo uma capacidade natural da planta em sobreviver desde a primeira aplicação (CHRISTOFFOLETI et al., 2016). Já a resistência é conferida por mecanismos vindos de alterações bioquímicas, fisiológicas, morfológicas ou fenológicas de biótipos de plantas a partir da seleção imposta pela

aplicação de apenas uma molécula herbicida repetidamente (CHRISTOFFOLETTI, VICTORIA FILHO; SILVA, 1994).

2.2.3.1. Tolerância e resistência à atrazina

Os mecanismos de tolerância e resistência à atrazina podem ocorrer tanto por fatores relacionados ao local de ação quanto por vias metabólicas. Quando relacionado ao local de ação, a resistência ocorre por alterações pontuais no gene que codifica o sítio de ligação da proteína D1, dificultando a ligação da molécula herbicida à proteína (DEVINE; PRESTON, 2000). Por vias metabólicas, as moléculas de atrazina são detoxificadas, processo que pode ocorrer por três vias: hidroxilação mediada por benzoxazinonas, conjugação catalisada por enzimas glutationa-S-transferase (GST) e desalquilação, que provavelmente seja mediada pelo citocromo P450 (MARCACCI et al., 2006). A falta desses metabolismos confere suscetibilidade e a presença de apenas um deles já é o suficiente para conferir tolerância (MARCACCI et al., 2006). Em espécies tolerantes como o milho, sorgo e cana-de-açúcar, esse processo ocorre devido à rápida detoxificação da molécula herbicida catalisada pelas GST's e pela hidroxilação (CHERIFI et al., 2001; EVANS JUNIOR et al., 2017). Esse mecanismo de detoxificação é bastante conhecido em gramíneas, resultado da abundância e maior atividade das enzimas GST's nas espécies desta família (READE; MILNER; COBB, 2004; YU; POWLES, 2014). As GST's são encontradas em plantas e animais (MASHIYAMA et al., 2014). As classes *phi* (GSTF) e *tau* (GSTU) são exclusivas das plantas e desempenham papel importante na tolerância às condições de estresse e no metabolismo secundário, catalisando a detoxificação de xenobióticos tais como os herbicidas (DIXON; COLE; EDWARDS, 1997; THOM et al., 2002).

O processo de detoxificação da atrazina pode ocorrer tanto nas raízes quanto nas folhas das plantas, e a atividade específica das GST's para a atrazina é maior em parte aérea (DIXON; COLE; EDWARDS, 1997). As folhas das plantas de milho apresentam uma capacidade de metabolização de atrazina via GST's até seis vezes maior que a das raízes (CHERIFI et al., 2001). Plantas de capim-vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) expostas à atrazina via solução de cultivo hidropônico translocaram as moléculas herbicidas das raízes para as folhas para a conjugação, região na qual foi encontrada uma quantidade de conjugados cinco vezes maior em relação à encontrada nas raízes (MARCACCI et al., 2006). Portanto, se uma grande quantidade de atrazina

for absorvida pelas raízes de espécies tolerantes ou resistentes, ela, provavelmente, ainda chegará à parte aérea para ser metabolizada.

Assim como em plantas de cultivo comercial, a tolerância ou resistência à atrazina também pode ocorrer em plantas daninhas. Em biótipos de *Amaranthus tuberculatus*, a rápida formação de conjugados atrazina-GSH em pós-emergência figurou como um mecanismo de resistência ao herbicida (EVANS JUNIOR et al., 2017; MA; EVANS; RIECHERS, 2016). Em biótipos de *Amaranthus palmeri* com resistência confirmada à atrazina, o metabolismo via GST foi até 24 vezes mais rápido que nos biótipos suscetíveis (NAKKA et al., 2017). Uma espécie de planta resistente à atrazina tem até 40% mais capacidade de conjugação do que uma espécie suscetível (ANDERSON; GRONWALD, 1991). Plantas de maior estágio fenológico também têm o controle dificultado pela aplicação de inibidores do FSII como a atrazina. Em parte, o controle se torna dificultado pelo grande número de sítios de ação, pela diluição das moléculas de atrazina na biomassa ou pela presença de barreiras morfológicas e anatômicas que diminuem a absorção do herbicida (MARCACCI et al., 2006; SOUSA et al., 2022). No entanto, isso não quer dizer que todas as moléculas de atrazina sejam detoxificadas pelas plantas.

Apesar da tolerância à atrazina, plantas de milho e cana-de-açúcar apresentam efeitos transitórios de interrupção da atividade do FSII em curtos períodos de tempo após a aplicação desse herbicida, que promovem a redução da eficiência quântica máxima (F_v/F_m) e da taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) (GIROTTO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015b). Além da metabolização e detoxificação, outros mecanismos de defesa das plantas também podem ser promovidos para evitar uma possível fitointoxicação. Em plantas de milho, a aplicação de atrazina também leva ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) (LI et al., 2012; SILVA, 2019). Outro mecanismo de defesa das plantas de milho é o aumento da concentração endógena de ácido abscísico para promover o fechamento estomático e inibir a translocação da atrazina das raízes para a parte aérea (LI et al., 2012).

Levando em conta todos esses aspectos, pode-se afirmar que a aplicação de atrazina, mesmo que em plantas tolerantes, representa uma forma de estresse abiótico devido à necessidade de metabolização do ingrediente ativo nos tecidos vegetais, da recuperação de lesões fisiológicas e da ativação de um conjunto de mecanismos com ação antioxidante e detoxificante (LI et al., 2012; MACIEL et al., 2019;

SOUZA; BARBOSA, 2015). Para as plantas, enfrentar um estresse abiótico significa enfrentar uma interferência em seu desenvolvimento pleno, que pode lhe impedir de expressar o seu máximo potencial genético e afetar o seu crescimento e a sua reprodução (TAIZ et al., 2017).

2.2.4. Nabo Forrageiro (*Raphanus sativus* L.)

Pertencente à família Brassicaceae, a espécie *Raphanus sativus* L. é conhecida popularmente por nabo, nabo selvagem ou nabo forrageiro. É uma planta de ciclo anual, com hábito de crescimento ereto, herbáceo, estatura que varia entre 60 e 110 cm, com raiz principal pivotante e engrossada (LORENZI et al., 2014). As folhas inferiores têm o limbo profundamente recortado em até nove segmentos enquanto as superiores apresentam limbo simples, inflorescência no formato de cacho composto com grande número de flores que podem variar entre as cores rosa e azulada, e frutos do tipo síliqua cilíndrica com pouco ou nenhum estreitamento entre as sementes (MOREIRA, BRAGANÇA, 2011).

É uma espécie cultivada como forrageira que se perpetua pelo solo, sua propagação ocorre por sementes e se desenvolve melhor nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (MOREIRA, BRAGANÇA, 2011; LORENZI, 2014). Em alguns biótipos dessa espécie, já foi confirmada a resistência aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase ALS (HEAP, 2024a). Em pré-emergência e pós-emergência inicial, as plantas de *R. sativus* apresentam-se suscetíveis à atrazina. Em pós-emergência tardia, apresentam média suscetibilidade e, quando adultas, a atrazina não é mais recomendada para o seu controle (LORENZI, 2014).

2.2.5. Picão (*Bidens pilosa* L.)

Conhecido por picão ou picão-preto, *Bidens pilosa* L. é uma espécie de planta da família Asteraceae de ocorrência anual, porte herbáceo e ereto, estatura que vai de 30 a 120 cm, caule com leve pilosidade, folhas com bordas serrilhadas e flores com pétalas brancas. Sua reprodução é realizada por sementes, frutos do tipo aquênio, com a presença de aristas pontiagudas que têm por característica prender-se a roupas, sacarias ou pelagem dos animais, facilitando a sua dispersão. É uma espécie que

apresenta grande variabilidade genética, o que garante grande plasticidade a cada indivíduo com relação à época de florescimento e frutificação (BRIGHENTI, 2010; GAZZIERO et al., 2015).

O gênero *Bidens* tem como principais representantes as espécies *B. pilosa* e *B. subalternans*, que estão presentes em grande parte das lavouras brasileiras anuais ou perenes, e diferenciam-se principalmente pelo número de aristas presentes em seus aquênios, com número de dois a três para *B. pilosa* contra três a quatro de *B. subalternans* (BRIGHENTI, 2010). No Brasil existem relatos de biótipos de plantas de *B. pilosa* com resistência confirmada aos herbicidas inibidores da ALS e inibidores do FSII (HEAP, 2024b). Recentemente, foi relatada a resistência de *B. subalternans* aos inibidores da EPSPS (HEAP, 2024c). Em estágio inicial de desenvolvimento são altamente suscetíveis à atrazina e pouco suscetíveis em pós-emergência tardia. Para plantas em fase adulta a atrazina não é recomendada para o controle (LORENZI, 2014).

2.3. NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia compreende o ramo da ciência que está relacionada à manipulação do material em nanoescala. A indústria da nanotecnologia cresceu de maneira rápida nas últimas décadas, devido à liberação de novas características e propriedades físicas, químicas ou biológicas que não são apresentadas pelos materiais em maior escala de tamanho (REDDY et al., 2016; WALKER et al., 2018). Na agricultura, a nanotecnologia apresenta grande potencial para melhorar a produtividade das culturas e a qualidade dos solos (USMAN et al., 2020). Nanomateriais têm sido desenvolvidos visando a aplicação via nanofertilizantes, nanosensores, nanopesticidas (herbicidas, fungicidas e inseticidas), priming de sementes e remediação ambiental, contribuindo para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável que busca suprir as necessidades de um ambiente propício para o cultivo a partir da germinação das sementes (FRACETO et al., 2016; USMAN et al., 2020; PEREIRA et al., 2021; VIJAYAKUMAR et al., 2022).

A produção de nanoformulações contendo ingrediente ativo pesticida consiste na utilização de produtos já existentes no mercado, abrigando-o em nanocápsulas, que na maioria das vezes são constituídas por uma matriz polimérica (KAH et al., 2013). A possibilidade de produção de nanopesticidas com propriedades superiores aos convencionais cria expectativas para o setor agrícola por se tratar de uma

solução tecnológica economicamente viável, com aumento da eficiência, redução de perdas na aplicação, dos impactos ambientais e do consumo de água e energia devido a menor frequência de aplicação (WALKER et al., 2018; KAH; TUFENKJI; WHITE, 2019; USMAN et al., 2020; AVELLAN, et al., 2021). Nesse sentido, da mesma maneira que estes sistemas carreadores podem se tornar uma solução, existem riscos de tornarem-se novos contaminantes ao se acumularem no meio ambiente, com a fitointoxicação dependente da concentração (TRIPATHI et al., 2016; BAJPAI et al., 2018). Dependendo das características de tamanho, composição, tipo, forma e concentração, as nanopartículas podem levar a alterações nas células vegetais, como o acúmulo de elementos tóxicos, indução de estresse oxidativo, alteração na expressão genética e redução do crescimento das plantas (ASLANI et al., 2014; KAH, 2015; IAVICOLI et al., 2017; USMAN et al., 2020). Além disso, elas podem interferir no desenvolvimento de microrganismos de vida livre do solo e prejudicar as relações simbióticas desses com as plantas (NAVARRO et al., 2008).

2.3.1. Nanopartículas Poliméricas

O termo nanopartícula polimérica é geral e abrange tanto nanocápsulas quanto nanoesferas (RAO; GECKELER, 2011). Nanocápsulas poliméricas atuam como um reservatório de moléculas bioativas em seu interior líquido (aquoso ou oleoso), envoltas por um material sólido (o polímero), enquanto as nanoesferas são partículas sólidas e de interior sólido e denso, podendo as moléculas bioativas serem ou ficarem aderidas ao seu interior ou à sua superfície externa (GRILLO et al., 2012; PEREIRA et al., 2014). A nanoencapsulação de ingredientes ativos tem por finalidade melhorar a solubilidade, promover a proteção contra a degradação e a liberação sustentada e gradual das moléculas, aumentando a eficiência e diminuindo os efeitos deletérios aos organismos não alvo da aplicação (BOMBO et al., 2019; GRILLO et al., 2012; KAH, 2015; PASCOLI et al., 2018).

Inicialmente, acreditava-se que para todas as nanopartículas o processo de absorção pelas raízes após a sua exposição às plantas ocorria pela penetração através da parede e membrana celular até chegar ao xilema, seguido da translocação via simplástica para o restante da planta (TRIPATHI et al., 2017). Porém, foi descoberto que o potencial elétrico (potencial zeta) e o tamanho das nanopartículas interferem diretamente nestes processos. As nanopartículas de carga positiva tendem a

se acumular ao redor de raízes e protoplastos (com menor absorção e translocação), as de carga negativa se acumulam nas raízes, protoplastos e no xilema (são mais bem absorvidas e translocadas), enquanto nanopartículas com carga neutra penetram as raízes e protoplastos mas são pouco vistas no xilema, circulando mais facilmente entre células (PARKINSON et al., 2022).

Quando aplicadas via foliar, a absorção das nanopartículas pode ocorrer através da penetração na cutícula da folha ou via aberturas naturais, como estômatos e hidatódios ou demais estruturas como tricomas e pontos necróticos (BOMBO et al., 2019; AVELLAN et al., 2021; ZHANG et al., 2021). Nessa via as cargas também terão influência, mas agora, na adesão das nanopartículas às folhas. Devido ao aspecto de cargas negativas da superfície das folhas, a adesão é maior por nanopartículas com carga positiva, seguidas pelas de carga neutra (intermediária) e menor por nanopartículas de carga negativa (JETTER et al., 2006; YU et al., 2017). Contudo, as interações hidrofóbicas e hidrofílicas também interferem na adesão e absorção (AVELLAN et al., 2021; ZHANG et al., 2021). Independente da via de aplicação o xilema se torna a via de maior importância na distribuição e translocação de nanopartículas, processo que pode ser afetado também pela forma, tamanho e composição do nanomaterial (ASLANI et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Não somente as características dos nanomateriais interferem na absorção, mas as características de cada espécie de planta também podem gerar efeitos nesse processo. Por exemplo, em plantas monocotiledôneas (como o milho) foi observada que a rota de maior entrada dos nanomateriais é pelos estômatos, enquanto em plantas dicotiledôneas as vias de absorção ocorrem via estômatos e penetração cuticular (HU et al., 2020).

Os polímeros são materiais emergentes e promissores para o desenvolvimento de sistemas nanocarreadores de agroquímicos (SHAKIBA et al., 2020). Nessa perspectiva, a utilização de nanocápsulas poliméricas como sistemas carreadores de ingrediente ativo pode aumentar a sua funcionalidade e utilidade ao promover a entrega do ingrediente ativo com maior eficiência ao alvo da aplicação, diminuir a quantidade de produto aplicada ao ambiente e reduzir os riscos ambientais do ingrediente ativo convencional (BOMBO et al., 2019; KAH et al., 2018; PÉREZ-DE-LUQUE, 2017; WALKER et al., 2018).

A utilização do polímero poli(ϵ -caprolactona) – PCL para formulação de nanocápsulas foi a precursora para o desenvolvimento de nanossistemas carreadores do i.a. atrazina (GRILLO et al., 2012). O PCL é um poliéster alifático sintético que, apesar

de apresentar características semelhantes aos polímeros a base de petróleo, é biodegradável por microrganismos do solo (CAMPOS et al., 2010). Com esse polímero, são formadas nanocápsulas com tamanho entre 200 e 300 nm, índice de polidispersão menor que 0,2 (que indica homogeneidade do sistema) e potencial zeta em torno de -30 mV (GRILLO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015a; SOUSA et al., 2018; TAKESHITA et al., 2021). Este polímero, quando aplicado não associado a ingrediente ativo em folhas de plantas modelo como mostarda (*Brassica juncea* L. Czern) e milho (*Zea mays* L.), mostrou não causar efeitos negativos ao desenvolvimento das plantas (OLIVEIRA et al., 2015a; 2015b; BOMBO et al., 2019). Contudo, em plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill), o residual do polímero no solo 17 dias após aplicação causou leve redução da atividade do FSII, da condutância estomática e da massa seca de raízes (PREISLER et al., 2020). E a redução da germinação e aumento de plântulas anormais de *B. juncea* (PREISLER et al., 2022) e o desenvolvimento anormal de nematoides da espécie *Caenorhabditis elegans* (JACQUES et al., 2017) também são atribuídos à exposição ao polímero PCL.

Novos nanossistemas foram desenvolvidos em seguida, utilizando a zeína como matriz polimérica para síntese de nanocápsulas carreadoras de biopesticidas (RISTROPH et al., 2017; PASCOLI et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; MONTEIRO et al., 2021; SARAIVA et al., 2021). A zeína é uma proteína produzida pelas plantas de milho (aproximadamente 50% do conteúdo total de proteínas), apresenta caráter hidrofóbico (baixa solubilidade em água), alta capacidade de revestimento, é resistente ao calor e forma uma excelente barreira contra o oxigênio, evitando a degradação/oxidação de composto sensíveis (ANDERSON; LAMSA, 2011; BERARDI et al., 2018), e está em sintonia com os objetivos da nanotecnologia por ser um material *eco friendly*, natural, biodegradável e biocompatível (PASCOLI et al., 2019). As características de nanopartículas sintetizadas com zeína são o tamanho entre 100 e 300 nanômetros, índice de polidispersão entre 0,2 e 0,4 e potencial zeta variando de -0,11 a 0,12 mV (OLIVEIRA et al., 2018; PASCOLI et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; MONTEIRO et al., 2021; SARAIVA et al., 2021; CARVALHO et al., 2023). As nanopartículas de zeína sem ingrediente ativo não foram tóxicas a plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) nem a nematoides da espécie modelo *C. elegans* (OLIVEIRA et al., 2018; PASCOLI et al., 2019; MONTEIRO et al., 2021).

Tanto o nanossistema carreador de nanocápsulas de PCL quanto o nanossistema de nanocápsulas de zeína apresentam potencial zeta negativo. Como citado anteriormente, a carga elétrica da face externa das nanopartículas tem influência

direta na interação destas com as plantas. Todavia, uma maneira simples e viável para aproveitar um sistema carreador já estabelecido (que apresenta compatibilidade entre ingrediente ativo e polímero) é alterando a característica de potencial zeta. Para tanto, é realizado o revestimento das nanopartículas por produtos surfactantes ou polímeros naturais, como a quitosana. O sistema carreador de pesticida baseado em nanopartículas de PCL revestidas com quitosana foi obtido recentemente pelo grupo de estudos do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da Universidade Estadual Paulista.

A quitosana é um derivado da quitina extraída da casca de crustáceos, um biopolímero com amplo espectro de aplicações e uma excelente matriz polimérica para síntese de micro e nanopartículas (KUMARASWAMY et al., 2018; NEGM et al., 2020). O revestimento as nanocápsulas com a quitosana possui a capacidade de induzir a formação de cargas positivas na face externa (PRADO-AUDELO et al., 2020). O preparo de nanopartículas revestidas de quitosana é simples, consiste apenas da adição de uma suspensão deste biopolímero a uma formulação de nanopartículas preparadas previamente, onde o recobrimento se dará pela atração iônica entre as moléculas de quitosana e do polímero da nanopartícula (FRANK et al., 2019). No entanto, o sucesso do revestimento das nanopartículas poliméricas por quitosana fica condicionada à concentração adequada de biopolímero utilizada, que pode alterar o tamanho e morfologia das nanopartículas (PRADO-AUDELO et al., 2020). Se adicionada em baixa concentração, a quitosana disponível pode ser insuficiente para recobrir completamente as nanopartículas, e assim incapaz de alterar o potencial zeta para positivo, já em alta concentração, pode levar à formação de viscosidade, precipitação e aumento excessivo do tamanho das nanopartículas (MAYER et al., 2015; LIU et al., 2013). Apesar de ser um material natural, há relatos na literatura de fitotoxicidade de nanopartículas de quitosana/tripolifosfato no crescimento e até na inibição da germinação de sementes de *Zea mays*, *Brassica rapa* e *Pisum sativum* (NAKASATO et al., 2017).

2.3.2. Atrazina Nanoencapsulada

Devido aos crescentes casos de plantas daninhas resistentes à aplicação de herbicidas, são necessárias medidas de prevenção e manejo de ingredientes ativos com diferentes mecanismos de ação, de modo a conservar os herbicidas usuais nos sistemas de produção e garantir a sua viabilidade (CARVALHO et al., 2019). Especificamente no Brasil, devido ao uso em larga escala, a associação de

atrazina a sistemas de liberação controlada torna-se interessante tanto para o ponto de vista ambiental quanto para o econômico (ÁVILA et al., 2009). Para a atrazina, o êxito no processo de nanoencapsulação para abrigar o ingrediente ativo em nanocápsulas se deu primeiramente com a utilização da matriz polimérica poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (GRILLO et al., 2012). Nesse sistema a atrazina é liberada pelo relaxamento das cadeias poliméricas que compõe as nanocápsulas (GRILLO et al., 2012), o que pode levar a alterações na dinâmica de liberação do ingrediente ativo de acordo com a afinidade das nanopartículas com a superfície de contato com as folhas ou solo. Apesar de não alterar o mecanismo de ação da atrazina, o processo de nanoencapsulação parece alterar o seu modo de ação, a sua absorção e sua eficiência herbicida, deixando-a com maior e mais rápida ação na interrupção da atividade do FSII quando comparada a ação do herbicida convencional, e menor toxicidade à maior parte de organismos não alvo (GRILLO et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015a; SOUSA et al., 2018; BOMBO et al., 2019; PREISLER et al., 2020; SOUSA et al., 2020; TAKESHITA et al., 2021).

Nos últimos anos houve grande avanço científico para o entendimento dos fatores que levam ao aumento da ação herbicida pela molécula de atrazina nanoencapsulada. O aumento da ação herbicida tem sido atribuído em parte à absorção mais rápida e em maior quantidade de nanoatrazina pelas células da epiderme e por aberturas naturais das folhas, como os estômatos e hidatódios, e a baixa interação com os componentes das paredes celulares devido ao potencial zeta negativo das nanocápsulas (BOMBO et al., 2019; TAKESHITA et al., 2021). Também, foi relatado por Preisler et al. (2022) que as nanopartículas de PCL contendo atrazina marcadas com sonda foram rapidamente absorvidas pelas raízes e encontradas nos vasos condutores e nas folhas de *B. juncea*.

Na modalidade de aplicação pós-emergente do herbicida, a nanoformulação de atrazina em nanocápsulas de PCL possibilitou reduções de até 90% da quantidade de ingrediente ativo aplicado, sem comprometer a ação de inibição da atividade do FSII de plantas *B. juncea* (OLIVEIRA et al., 2015a). Em *Amaranthus viridis* (caruru) e *Bidens pilosa* (picão), a nanoformulação de atrazina proporcionou ganhos em eficiência na redução da atividade do FSII entre 10 e 14%, respectivamente, em relação à formulação convencional em mesma dose (SOUSA et al., 2018). Para ambas as espécies, a nanoformulação também possibilitou a redução de 90% da dose utilizada, de 2000 g i.a. ha⁻¹ para apenas 200 g i.a. ha⁻¹ sem comprometer a eficiência do

ingrediente ativo em reduzir a atividade do FSII. Em pós-emergência de *D. insularis* (capim-amargoso) em dois estádios de desenvolvimento (duas e quatro folhas verdadeiras expandidas), após a aplicação da nanoatrazina foram encontrados ganhos em torno de 50% em redução da atividade do FSII em relação a formulação convencional em mesma dose (SOUSA et al., 2020). Para o controle de plantas, a eficiência do herbicida nanoencapsulado variou conforme o estágio de desenvolvimento das plantas. Em plantas com duas folhas o controle proporcionado por nanoatrazina foi 52% maior que o controle proporcionado pela formulação convencional, enquanto com quatro folhas o ganho foi de 27%. Quando aplicada em plantas de *R. raphanistrum* (nabiça) com um par de folhas expandidas, a redução da atividade do FSII proporcionada por nanoatrazina esteve em torno de 20% maior que a proporcionada pela formulação convencional (TAKESHITA et al., 2021). Para essa espécie os ganhos no controle de plantas e na redução de massa fresca de parte aérea de plantas gerados pela aplicação de nanoatrazina foram encontrados com a dose de 500 g i.a. ha⁻¹. Essa dose é 75% menor do que a habitualmente utilizada no campo, e não comprometeu a eficácia do ingrediente ativo no controle de plantas. No entanto, existem espécies as quais não respondem bem à atrazina e a sua variante nanoencapsulada, como no caso de *Alternanthera tenella* Colla (apaga-fogo). Nessa espécie, o melhor efeito da formulação de nanoatrazina em relação a formulação convencional esteve apenas na maior redução da atividade do FSII até 48 horas após aplicação, sem melhorar o controle ou redução de massas de plantas (SOUSA et al., 2022).

Com o compilado dos resultados de eficiência herbicida e de controle de plantas daninhas proporcionados pela nanoatrazina disponíveis na literatura, foi possível observar que apesar do aumento na eficiência, essa formulação ainda é dependente da espécie alvo da aplicação, do estágio de desenvolvimento das plantas na época de aplicação, bem como da dose aplicada (SOUSA et al., 2022). Assim, os ganhos em eficiência na redução de atividade do FSII pela adoção do ingrediente ativo nanoencapsulado possivelmente estão condicionados ao grau de suscetibilidade à atrazina de cada espécie.

Para a modalidade de aplicação pré-emergente, a redução de 90% da dose também foi eficiente no controle de plantas daninhas de *B. pilosa*, tendo controle semelhante entre as doses 2000 g i.a. ha⁻¹ de atrazina convencional e 200 g i.a. ha⁻¹ de nanoatrazina (PREISLER et al., 2020). Com essa redução de dose, também foram

menores os efeitos de fitotoxicidade às plantas de soja (*G. max*) semeadas em sucessão, 17 dias após a aplicação.

As plantas de milho mantiveram-se tolerantes à atrazina nanoencapsula por PCL nas modalidades de aplicação pré e pós-emergente, e em doses de até 2000 g i.a. ha⁻¹ em casa de vegetação (OLIVEIRA et al., 2015b). Essas plantas apresentaram apenas efeitos transitórios de redução da atividade do FSII e trocas gasosas com até dois dias após a aplicação, o que não comprometeu o desenvolvimento e acúmulo de massa avaliado aos oito dias após o tratamento. Contudo, quando aplicada a campo, a dose de 2000 g i.a. ha⁻¹ da nanoformulação de atrazina prejudicou fortemente o desenvolvimento das plantas de milho em médio e longo prazo, afetando seu crescimento de maneira a impedir a sua reprodução (SOUSA, 2020). Acredita-se que devido ao potencial de maior capacidade de absorção pelas folhas e facilidade de chegada ao local de ação, há a possibilidade de que a nanoatrazina tenha gerado estresse oxidativo severo nas plantas de milho, comprometendo o desenvolvimento.

Dessa forma, há necessidade do desenvolvimento de estudos que avaliem a atividade enzimática e de outros mecanismos não enzimáticos de defesa das plantas de milho e em plantas daninhas em resposta a aplicação de nanoatrazina, a fim de elucidar se ocorre a redução da tolerância e, por consequência, maior geração de estresse oxidativo. Também, é necessário investigar se o efeito negativo gerado às plantas de milho tem origem em outros compostos tóxicos gerados pela matriz polimérica utilizada para síntese das nanocápsulas, ou ainda, se a maior atividade herbicida tem origem na combinação destes dois fatores.

Diversos desafios surgem durante a projeção de um nanopesticida para que seja seguro e eficiente (AVELLAN et al., 2021). Com base nos avanços do conhecimento sobre a dinâmica da interação das nanopartículas com as plantas e dos efeitos deletérios encontrados nas plantas de milho, foram desenvolvidos novos sistemas carreadores para a atrazina, sendo duas novas nanoformulações, a primeira com base na matriz polimérica de zeína, e a segunda a partir das nanopartículas de PCL com a adição do recobrimento com quitosana (características destes sistemas citadas no item 2.3.1). Dessa maneira, torna-se necessário avaliar além da eficiência herbicida das nanoformulações contendo atrazina para o controle de plantas daninhas, e investigar os mecanismos de seletividade e os possíveis efeitos deletérios às plantas de milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, F.P.; OLIVEIRA, J.L.; MOSCHINI-CARLOS, V.; FRACETO, L.F. An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. **Science of the Total Environment**, v.700, p.1-9, 2020.
- ALVES, B.M.; CARGNELUTTI FILHO, A.; BURIN, C.; TOEBE, M.; SILVA, L.P. Divergência genética de milho transgênico em relação à produtividade de grãos e à qualidade nutricional. **Ciência Rural**, v.45, n.5, p.884-891, 2015.
- ANDERSON, M.P; GRONWALD, J.W. Atrazine resistance in a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. **Plant Physiology**, v.96, p.104-109, 1991.
- ANDERSON, T.J.; LAMSA, B.P. Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: a review. **Cereal Chemistry**, v.88, n.2, p.159–173, 2011.
- ARTUZO, F.D.; FOGUESATTO, C.R.; MACHADO, J.A.D.; OLIVEIRA, L.; SOUZA, A.R.L. O potencial produtivo brasileiro: uma análise histórica da produção de milho. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**. v.12, n.2, p.515-540, 2019.
- ASLANI, F.; BAGHERI, S.; JULKAPLI, N.M.; JURAIMI, A.S.; HASHEMI, F.S.G.; BAGHDADI, A. Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth: An Overview. **The Scientific World Journal**, v.2014, p.1-28, 2014.
- AVELLAN, A.; YUN, J.; MORAIS, B.P.; CLEMENT, E.T.; RODRIGUES, S.M.; LOWRY, G.V. Critical review: Role of inorganic nanoparticle properties on their foliar uptake and in planta translocation. **Environmental Science & Technology**, v.55, n.20, p.13417-13431, 2021.
- ÁVILA, L.G.; LEITE, S.B.; DICK, D.P. Formulações de atrazina em xerogéis: síntese e caracterização. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1727-1733, 2009.
- BARROS, J.F.C; CALADO, J.G. **A cultura do milho**. Évora: Universidade de Évora, Escola de Ciência e Tecnologias, Departamento de Fitotecnia. 2014. 52p.
- BERARDI, A.; BISHARAT, L.; ALKHATIB, H.S.; CESPI, M. Zein as a pharmaceutical excipient in oral solid dosage forms: state of the art and future perspectives. **AAPS PharmSciTech**, n.19, p.2009–2022, 2018.
- BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. **O milho e o clima**. Porto Alegre: Emater/RS-Ascar, 2014, 84p.
- BOMBO, A.B.; PEREIRA, A.E.S.; LUSA, M.G.; MEDEIROS OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R.; JESUS, M.B.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F.; MAYER, J.L.S. A mechanistic view of interactions of a nanoherbicide with target organism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.67, n.16, p.4453-4462, 2019

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de ingrediente ativo**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 13 abr. 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**: Boletim de dados e gráficos. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em 10 ago. 2022.

BRIGHENTI, A.M. **Manual de identificação e manejo de plantas daninhas em cultivos de cana-de-açúcar**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2010, 212p.

BRITO, J. Agrotóxicos proibidos na Europa são campeões de vendas no Brasil. **Repórter Brasil**, 2018. Disponível em: <<https://reporterbrasil.org.br/2018/12/agrotoxicos-proibidos-europa-sao-campeoes-de-vendas-no-brasil/>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

CAMPOS, A.; MARCONATO, J.C.; FRANCHETTI, S.M.M. Biodegradação de Filmes de PP/PCL em Solo e Solo com Chorume. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, vol.20, n.4, p.295-300, 2010.

CARVALHO, F.T.; MORETTI, T.B.; SOUZA, P.A. Eficácia e seletividade de associações de herbicidas utilizados em pós-emergência na cultura do milho. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.9, n.2, p.35-41, 2010.

CARVALHO, S.J.P.; ROSSI, C.V.S.; MELO, M.S.C.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; KAGI, F.Y. Modifications on Labels and Leaflets of Herbicides for Preventing and Managing Resistance. **Planta Daninha**, v.37, 9 p., 2019.

CATANEO, A.C.; DÉSTRO, G.F.G.; FERREIRA, L.C.; CHAMMA, K.L.; SOUSA, D.C.F. Atividade de glutathione s-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.307-312, 2003.

CHERIFI, M.; RAVETON, M.; PICCIOCCHI, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Atrazine metabolism in corn seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.39, p.665-672, 2001.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; CARVALHO, S.J.P. Adaptadas, espécies infestantes resistem a herbicidas. **Visão Agrícola**. n.9, p.123-125, 2009.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In CHRISTOFFOLETI, P. J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3 ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2008. p.9-34.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R.M.; BORGATO, E.A.; NETTO, A.G.; MELO, M.S.C. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: termos e definições importantes. In: CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M. (Eds.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 4 ed. Piracicaba: Esalq, 2016. p.11-32.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTORIA FILHO, R.; SILVA, C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v.12, n.1, p.13-20, 1994.

CIAMPITTI, I.A.; ELMORE, R.W.; LAUER, J. Corn growth and development. v.5, p.75, 2011. <[https://www.npct.com.br/npctweb/npct.nsf/article/BRS-3137/\\$File/MF3305BP-CornGrowth-portuguese_FINAL.pdf](https://www.npct.com.br/npctweb/npct.nsf/article/BRS-3137/$File/MF3305BP-CornGrowth-portuguese_FINAL.pdf)>. Acesso em 11 mai. 2020.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Série Histórica das Safras: Grãos – Por produtos**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>>. Acesso em: 07 abr. 2020.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357/2005, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 mar. 2005. p.58-63.

CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JUNIOR., R.S.I; CAVALIERI, S.D.; ARANTES, J.G.Z.; ALONSO, D.G.; ROSO, A.C.; COSTA, J.M.V. Interação entre sistemas de manejo e de controle de plantas daninhas em pós-emergência afetando o desenvolvimento e a produtividade do milho. **Planta daninha**, v.25, n.3, p.513-520, 2007.

CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; OLIVEIRA NETO, A.M. (E.) **Buva: Fundamentos e recomendações de manejo**. 1. ed. Curitiba: Omnipax, 2013, 104p.

COSTA, R.V.; SIMON, J.; SILVA, D.D.; COTA, L.V.; ALMEIDA, R.E.M.; CAMPOS, L.J.M. Cultivares de milho afetadas pela época de semeadura na safrinha em Tocantins. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.16, n.3, p.469-480, 2017.

COUTINHO, C.F.B.; TANIMOTO, S.T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G.S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.15, p.65-72, 2005.

CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; SIMAO, E.P. Safrinha deve superar a safra de verão. **Campo & Negócios**, v.11, n.127, p.24-29, 2013.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; BORGHI, E.; SIMÃO, E.P. **Quatrocentas e setenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2015/16**. Documentos 184. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015, 28p.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; GONTIJO NETO, M.M.; VIANA, J.H.M.; OLIVEIRA, M.F.; SANTANA, D.P. **Manejo da cultura do Milho**. Circular Técnica 87. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007, 12p.

DALTON, R.L.; BOUTIN, C. Comparison of the effects of glyphosate and atrazine herbicides on nontarget plants grown singly and in microcosms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.29, n.10, p.2304–2315, 2010.

DAYAN, F.E.; BARKER, A.; BOUGH, R.; ORTIZ, M.; TAKANO, H.; DUKE, S.O. Herbicide Mechanisms of Action and Resistance. In: MOO-YOUNG, M. (E.). *Comprehensive Biotechnology*, 3ª edição, v.4, **Publisher Pergamon Elsevier**, p.23-35, 2019.

DEL BUONO, D.; IOLI, G. Glutathione S-transferases of italian ryegrass (*Lolium multiflorum*): activity toward some chemicals, safener modulation and persistence of atrazine and fluorodifen in the shoots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.4, p.1324–1329, 2011.

DEVINE, M.D.; PRESTON, C. The molecular basis of herbicide resistance. In: COBB, A.; KIRKWOOD, R. (Eds.). **Herbicides and Their Mechanisms of Action**. Sheffield, U.K: Sheffield Academic Press. 2000. p.72–104.

DIAS, A.C.L.; SANTOS, J.M.T.; SANTOS, A.S.P.; BOTTREL, S.E.C.; PERERIA, R.O. Ocorrência de Atrazina em águas no Brasil e remoção no tratamento da água: revisão sistemática. **Revista Internacional de Ciências**, v.8, n.2, p.234-253, 2018.

DIXON, D.; COLE, D.J.; EDWARDS, R. Characterisation of multiple glutathione transferases containing the GST I subunit with activities toward herbicide substrates in maize (*Zea mays*). **Pesticide Science**, v.50, p.72-82, 1997.

ERENSTEIN, O.; JALETA, M.; SONDER, K.; MOTTALEB, K.; PRASANNA, B.M. Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. **Food Security**, v.14, p.1295–1319, 2022.

EVANS JUNIOR, A.F.; O'BRIEN, S.R.; MA, R.; HAGER, A.G.; RIGGINS, C.W.; LAMBERT, K.N.; RIECHERS, D.E. Biochemical characterization of metabolism-based atrazine resistance in *Amaranthus tuberculatus* and identification of an expressed GST associated with resistance. **Plant Biotechnology Journal**, v.15, n.10, p.1238-1249, 2017.

FERREIRA, E.A.; PROCÓPIO, S.O.; SILVA, E.A.M.; SILVA, A.A.; RUFINO, R.J.N. Estudos anatômicos de folhas de plantas daninhas. I - *Nicandra physaloides*, *Solanum viarum*, *Solanum americanum* e *Raphanus raphanistrum*. **Planta Daninha**, v. 20, n.2, p.159-167, 2002.

FERREIRA, E.A.; PROCÓPIO, S.O.; SILVA, E.A.M.; SILVA, A.A.; RUFINO, R.J.N. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas. II - *Bidens pilosa*, *Emilia sonchifolia*, *Ageratum conyzoides* e *Sonchus asper*. **Planta Daninha**, v.20, n.3, p.327-335, 2002.

FRACETO L.F.; GRILLO, R.; MEDEIROS, G.A.; SCOGNAMIGLIO, V.; REA, G.; BARTOLUCCI, C. Nanotechnology in agriculture: Which innovation potential does it have? **Frontiers in Environmental Science**, v.4, 20p, 2016.

GADIOLI, J.L; DOURADO-NETO, D.; GARCÍA Y GARCÍA, A.; BASANTA, M.V. Temperatura do ar, rendimento de grãos de milho e caracterização fenológica associada à soma calórica. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.377-383, 2000.

GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v.61, p.819-828, 2014.

GAZZIERO, D.L.P.; LOLLATO, R.P.; BRIGHENTI, A.M.; PITELLI, R.A.; VOLL, E. Documentos 274. **Manual de identificação de plantas daninhas da cultura da soja**. 2.ed. Londrina: Embrapa Soja, 2015. 126p.

GIROTTI, M.; ARALDI, R.; VELINI, E.D.; JASPER, S.P.; GOMES, G.L.G.C.; CARBONARI, C.A Eficiência fotossintética da cana-de-açúcar após a aplicação dos herbicidas S-metolachlor e atrazine em pós-emergência. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.9, n.3, p.109-116, 2010.

GOLLA, V.; NELMS, J.; TAYLOR, R.; MISHRA, S. Pesticide Concentrations in Drinking Water from Farm Homes: Variation between Community Water Supply and Well-Water. **Journal of Environmental Science and Engineering**, v.5, p.955-961, 2011.

GRIGOLLI, J.F.J. Manejo de Plantas Daninhas no Milho Safrinha. In: _____. **Tecnologia e Produção: Milho Safrinha 2015**. Curitiba: Midiograf. 2016. p.75-86.

GRILLO, R.; DOS SANTOS, N.Z.P.; MARUYAMA, C.R.; ROSA, A.H.; DE LIMA R.; FRACETO, L.F. Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v.231, p.1-9, 2012.

HANSEN, A.M.; TREVIÑO-QUINTANILLA, L.G. MÁRQUEZ-PACHECO, H. VILLADA-CANELA, M. GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, L.C.; GUILLÉN-GARCÉS, R.S.; HERNÁNDEZ-ANTONIO, A. Atrazina: un herbicida polémico. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v.29, (Número especial sobre plaguicidas), p.65-84, 2013.

HEAP, I. **The International Herbicide-Resistant Weed Database** (2024a). Herbicide Resistant Radish Globally (*Raphanus sativus*). Disponível em: <<https://www.weedscience.org/Pages/Species.aspx>>. Acesso em: 22 mar. 2024.

HEAP, I. **The International Herbicide-Resistant Weed Database** (2024b). Herbicide Resistant Hairy Beggarticks Globally (*Bidens pilosa*). Disponível em: <<https://www.weedscience.org/Pages/Species.aspx>>. Acesso em: 22 mar. 2024.

HEAP, I. **The International Herbicide-Resistant Weed Database** (2024c). Most Recent Cases of Herbicide Resistant Weeds Entered into the Database. Disponível em: <<https://www.weedscience.org/Pages/RecentCases.aspx>>. Acesso em: 22 mar. 2024.

HU, P.; AN, J.; FAULKNER, M.M.; WU, H.; LI, Z.; TIAN, X.; GIRALDO, J. P. Nanoparticle Charge and size control foliar delivery efficiency to plant cells and organelles. **ACS Nano**, v.14, n.7, p.7970-7986, 2020.

Iavicoli, I.; LESO, V.; BEEZHOLD, D.H.; SHVEDOVA, A.A. Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.329, p.96-111, 2017.

- JACQUES, M.T.; OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.; FRACETO, L.F.; ÁVILA, D.S. Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.139, p.245-253, 2017.
- KAH, M. Nanopesticides and Nanofertilizers: Emerging Contaminants or Opportunities for Risk Mitigation? **Frontiers in Chemistry**, v.3, n.64, p.1-6, 2015.
- KAH, M.; BEULKE, S.; TIEDE, K.; HOFMANN, T. Nanopesticides: state of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.43, p.1823-1867, 2013.
- KAH, M.; KOOKANA, R.S.; GOGOS, A.; BUCHELI, T.D. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature Nanotechnology**, v.13, n.8, p.677:684, 2018.
- KAH, M.; TUFENKJI, N.; WHITE, J.C. Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. **Nature Nanotechnology**, v.14, p.532–540, 2019.
- KARAM, D. Mais eficiência. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, n.126, p.14-18, 2009.
- KARAM, D.; GAMA, J.C.M. Radiografia dos herbicidas. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, v.10, n.114, p.24-27, 2008.
- KARAM, D.; OLIVEIRA, M.F. **Seletividade de herbicidas na cultura do milho**. Circular Técnica 98. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007, 8p.
- KOZLOWSKI, L.A. Período crítico de interferência das plantas daninhas na cultura do milho baseado na fenologia da cultura. **Planta daninha**, v.20, n.3, p.365-372, 2002.
- KOZLOWSKI, L.A.; KOEHLER, H.S.; PITELLI, R.A. Épocas e extensões do período de convivência das plantas daninhas interferindo na produtividade da cultura do milho (*Zea mays*). **Planta daninha**, v.27, n.3, p.481-490, 2009.
- KUMARASWAMY, R.V.; KUMARI, S.; CHOUDHARY, R.C.; PAL, A.; RALIYA, R.; BISWAS, P.; SAHARAN, V. Engineered chitosan-based nanomaterials: Bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, p.494-506, 2018.
- LI, X.; WU, T.; HUANG, H.; ZHANG, S. Atrazine accumulation and toxic responses in maize *Zea mays*. **Journal of Environmental Sciences**, v.24, n.2, p.203–208, 2012.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.
- LIU, W.; LIU, J.; LIU, W.; LI, T.; LIU, C. Improved physical and in vitro digestion stability of a polyelectrolyte delivery system based on layer-by-layer self-assembly alginate–chitosan-coated nanoliposomes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.17, p.4133–4144, 2013.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D.; GARCÍA Y GARCÍA, A.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Seletividade de herbicidas para a cultura de milho (*Zea mays*) aplicados em diferentes estádios fenológicos da cultura. **Planta Daninha**, v.21, n.3, p.413-419, 2003.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 7 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2014. 383p.

MA, R.; EVANS, A.F.; RIECHERS, D.E. Differential responses to preemergence and postemergence atrazine in two atrazine-resistant waterhemp populations. **Pest interactions in agronomic systems**, v.108, n.3, p.1196-1202, 2016.

MACHADO, A.F.L.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F.A.; FIALHO, C.M.T.; TUFFI SANTOS, L.D.; MACHADO, M.S. Análise de crescimento de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v.24, n.4, p.641-647, 2006.

MACHADO, A.F.L.; MEIRA, R.M.S.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F.A.; TUFFI SANTOS, L.D.; FIALHO, C.M.T.; MACHADO, M.S. Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v.26, n.1, p.1-8, 2008.

MACIEL, C.D.G.; HELVIG, E.O.; SILVA, A.A.P.; MATIAS, J.P.; SANTOS NETO, J.C.; KARAM, D. Deposição da aplicação de herbicidas e fertilizante foliar no manejo de plantas daninhas na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.18, n.3, p.364-378, 2019.

MARCACCI, S.; RAVETON, M.; RAVANEL, P.; SCHWITZGUÉBEL, J. Conjugation of atrazine in vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. **Environmental and Experimental Botany**, v.56, p.205–215, 2006.

MASHIYAMA, S.T.; MALABANAN, M.M.; AKIVA, E.; BHOSLE, R.; BRANCH, M.C.; HILLERICH, B.; JAGESSAR, K.; KIM, J.; PATSKOVSKY, Y.; SEIDEL, R.D.; STEAD, M.; TORO, R.; VETTING, M.W.; ALMO, S.C.; ARMSTRONG, R.N.; BABBITT, P.C. Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. **PLoS Biology**, n.12, v.4, 19p, 2014.

MAYER, F.Q.; ADORNE, M.D.; BENDER, E.A.; CARVALHO, T.G.; DILDA, A.C.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S.; GIUGLIANI, R.; MATTE, U.; POHLMANN, A.R. Laronidase-functionalized multiple-wall lipid-core nanocapsules: Promising formulation for a more effective treatment of mucopolysaccharidosis type I. **Pharmaceutical Research**, v.32, p.941–954, 2015.

MONTEIRO, R.A.; CAMARA, M.C.; OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R.; CARVALHO, L.B.; PROENÇA, P.L.F.; GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R.; NASCIMENTO, J.; GONÇALVES, K.C.; POLANCZYK, R.A.; FRACETO, L.F. Zein based-nanoparticles loaded botanical pesticides in pest control: An enzyme stimuli-responsive approach aiming sustainable agriculture. **Journal of Hazardous Materials**, v.417, n.e.126004, 2021.

MOREIRA, H.J.C.; BRAGANÇA, H.B.N. **Manual de identificação de plantas infestantes: hortifrúti**. 1. ed. São Paulo: FMC Agricultural Products, 2011. 1017p.

MUNDSTOCK, C.M.; SILVA, P.R.F. **Manejo da cultura do milho para altos rendimentos de grãos**. Porto Alegre: Evangraf, 2005. 51p.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v.22, n.5, p.867-880, 1981.

NAKASATO, D.Y.; PEREIRA, A.E.; OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F. Evaluation of the effects of polymeric chitosan/tripolyphosphate and solid lipid nanoparticles on germination of *Zea mays*, *Brassica rapa* and *Pisum sativum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.142, p.369-374, 2017.

NAKKA, S. GODAR, A.S.; THOMPSON, C.R.; PETERSONA, D.A.; JUGULAMA, M. Rapid detoxification via glutathione S-transferase (GST) conjugation confers a high level of atrazine resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Pest Management Science**, v.73, p.2236–2243, 2017.

NAVARRO, E.; BAUN, A.; BEHRA, R.; HARTMANN, N.B.; FILSER, J.; MIAO, A.; QUIGG, A.; SANTOSCHI, P.H.; SIGG, L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. **Ecotoxicology**, v.17, p.372–386, 2008.

NEGM, N.A.; HEFNI, H.H.H.; ABD-ELAAL, A.A.A.; BADR, E.A.; KANA, M.T.H.A. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.152, p.681-702, 2020.

OLIGINI, K.F.; SALOMÃO, E.C.; BATISTA, V.V.; LINK, L.; ADAMI, P.F.; SARTOR, L.R. Produtividade de milho consorciado com espécies forrageiras no sudoeste do Paraná. **Agrarian**, v.12, n.46, p.434-442, 2019.

OLIVEIRA, H.C.; STOLF-MOREIRA, R.; MARTINEZ, C.B.R.; GRILLO, R.; DE JESUS, M.B.; FRACETO, L.F. (2015a). Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. **PLoS ONE**, v.10, n.7, 2015.

OLIVEIRA, H.C.; STOLF-MOREIRA, R.; MARTINEZ, C.B.R.; SOUSA, G.F.M.; GRILLO, R.; DE JESUS, M.B.; FRACETO, L.F. (2015b). Evaluation of the side effects of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules containing atrazine towards maize plants. **Frontiers in Chemistry**, v.3, n.61, 2015.

OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R.; CAMARA, M.C.; DELLA VECHIA, J.F.; MATOS, S.T.S.; ANDRADE, D.J.; GONÇALVES, K.C.; NASCIMENTO, J.; POLANCZYK, R.A.; ARAÚJO, D.R. FRACETO, L.F. Hydrogels containing botanical repellents encapsulated in zein nanoparticles for crop protection. **ACS Applied Nano Materials**, v.3, n.1, p.207-217, 2020.

OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (E.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. 1. ed. Curitiba: Omnipax, 2011, 348p.

PAES, M.C.D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. In: CRUZ, J.C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M.A.R.; MAGALHÃES, P.C. (Eds.). **A cultura do milho**. 1 ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2008. p.47-87.

PARKINSON, S.J.; TUNGSIRISURP, S.; SIKDER, A.; LYNCH, I.; O'REILLY, R.K.; NAPIER, R.M. 2022. "Polymer nanoparticles pass the plant interface". Preprint, submetido a **bioRxiv** em 24 de março de 2022.

PASCOLI, M.; LOPES-OLIVEIRA, P.J.; FRACETO, L.F.; SEABRA, A.B; OLIVEIRA, H.C. State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with agricultural applications: a minireview. **Energy, Ecology and Environment**, v.3, n.3, p.137-148, 2018.

PASCOLI, M.; JACQUES, M.T.; AGARRAYUA, D.A.; AVILA, D.S.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for applications in sustainable agriculture: An ecotoxicological perspective. **Science of the Total Environment**, v.677, p.57-67, 2019.

PEREIRA A.E.S.; OLIVEIRA H.C.; FRACETO L.F.; SANTAELLA C. Nanotechnology Potential in Seed Priming for Sustainable Agriculture. **Nanomaterials**, v.11, n.2, n.e.267, 2021.

PEREIRA, A.E.S.; GRILLO, R.; MELLO, N.F.S.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v.268, p.207–215, 2014.

PÉREZ-DE-LUQUE, A. Interaction of Nanomaterials with Plants: What Do We Need for Real Applications in Agriculture? **Frontiers in Environment Science**, v.5, n.12, p.1-7, 2017.

PRADO-AUDELO, M.L.D.; CABALLERO-FLORÁNA, I.H.; SHARIFI-RAD, J.; MENDOZA-MUÑOZ, N.; GONZÁLEZ-TORRES, M.; URBÁN-MORLÁN, Z.; FLORÁN, B.; CORTES, H.; LEYVA-GÓMEZA, G. Chitosan-decorated nanoparticles for drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.59, n.e.101896, 2020.

PREISLER, A.C.; PEREIRA, A.E.S.; CAMPOS, E.V.; DALAZEN, G.; FRACETO, L.F.; OLIVEIRA, H.C. Atrazine nanoencapsulation improves pre-emergence herbicidal activity against *Bidens pilosa* without enhancing long-term residual effect on *Glycine max*. **Pest Management Science**, v.76, n.1, p.141-149, 2020.

PREISLER, A.C.; CARVALHO, L.B.; SARAIVA-SANTOS, T.; VERRI JUNIOR, W.A.; MAYER, J.L.S.; FRACETO, L.F.; DALAZEN, G.; OLIVEIRA, H.C. Interaction of nanoatrazine and target organism: Evaluation of fate and photosystem II inhibition in hydroponically grown mustard (*Brassica juncea*) plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.70, n.25, p.7644-7652, 2022.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v.36, n.7, p.887-913, 2011.

READE, J.P.H.; MILNER, L.J.; COBB, A.H. A role for glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses. **Weed Science**, v.52, n.3, p.468-474, 2004.

REDDY, P.V.L.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J.A.; PERALTA-VIDEA, J.R.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. Lessons learned: Are engineered nanomaterials toxic to terrestrial plants? **Science of the Total Environment**, v.568, p.470–479, 2016.

RISTROPH, K.D.; ASTETE, C.E.; BODOKI, E.; SABLIOV, C.M. Zein nanoparticles uptake by hydroponically grown soybean plants. **Environmental Science & Technology**, v.51, n.24, p.14065-14071, 2017.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. Como a planta de milho se desenvolve. **Informações agrônômicas**, v.103, p.1-19, 2003.

RODRIGUES, L.S.; TEIXEIRA, O.S.; ALVES FILHO, D.C.; BRONDANI, I.L.; MACHADO, D.S.; PEREIRA, L.B.; ADAMS, S.M.; WEISE, M.S. Milho tolerante ao glifosato: interação entre herbicidas pós-emergentes e época de controle das plantas daninhas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.18, n.2, p.168-177, 2019.

SARAIVA, N.R.; RONCATO, J.F.F.; PASCOLI, M.; SOUSA, J.M.F.M.; WINDBERG JUNIOR, L.F.; ROSSATTO, F.C.P.; SOARES, J.J.; DENARDIND, E.L.G.; PUNTELA, R.L.; ZIMMERC, K.R.; FRACETO, L.F.; ÁVILA, D.S. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v.24, n.e.100554, 2021.

SCAVO, A.; MAUROMICALE, G. Integrated weed management in herbaceous field crops. **Agronomy**, v.10, n.4, 466, 2020.

SEAB/DERAL. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento/Departamento de Economia Rural. **Estimativa de Safra: Resumo Estadual**. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/deral/safras>>. Acesso em: 07 abr. 2020.

SHAKIBA, S.; ASTETE, C.E.; PAUDEL, S.; SABLIOV, C.M.; RODRIGUES, D.F.; LOUIE, S.M. Emerging investigator series: Polymeric nanocarriers for agricultural applications: Synthesis, characterization, and environmental and biological interactions. **Environmental Science: Nano**, v.7, n.1, p.37–67, 2020.

SHIMABUKURO, R.H.; SWANSON, H.R.; WALSH, W.C. Glutathione conjugation atrazine detoxication mechanism in corn. **Plant Physiology** v.46, p.103-107, 1970.

SILVA, H.J.T.; SANTOS, P.F.A.; NOGUEIRA JUNIOR, E.C.; VIAN, C.E.F. Aspectos técnicos e econômicos da produção de etanol de milho no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v.29, n.4, p.142-159, 2020.

SILVA, I.P.F.E.; JUNIOR, J.F.S.; PUTTI, F.F.; LATORRE, D.O.; SCHIMIDT, A.P.; LUDWIG, R. Herbicidas inibidores do fotossistema II – Parte I. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v.7, n.1, p.1-11, 2013.

SILVA, L.S.; NAKAYAMA, F.T.; SANTOS, G.X.L.; CORDEIRO JUNIOR, P.S.; DONÁ, S.; FINOTO, E.L.; BRANDÃO, R.P.; RODRIGUES, L.; VITORINO, R. Produtividade de cultivares de milho em Adamantina, região da Nova Alta Paulista. **Nucleus**, Edição especial, p.137-142, 2019.

SILVA, M.M. **Sensibilidade de genótipos de milho geneticamente modificados a herbicidas**. 2019. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

SINGH, S.; KUMAR, V.; CHAUHAN, A.; DATTA, S.; WANI, A.B.; SINGH, N.; SINGH, J. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, v.16, p.211–237, 2018.

SOUSA, B.T. **Eficiência de atrazina nanoencapsula comparada à convencional aplicadas em campo**. 2020. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

SOUSA, B.T.; PEREIRA, A.E.S.; FRACETO, L.F.; OLIVEIRA, H.C.; DALAZEN, G. Effectiveness of nanoatrazine in post-emergent control of the tolerant weed *Digitaria insularis*. **Journal of Plant Protection Research**, v.60, n.2, p.185-192, 2020.

SOUSA, B.T.; PEREIRA, A.E.S.; FRACETO, L.F.; OLIVEIRA, H.C.; DALAZEN, G. Post-emergence herbicidal activity of nanoatrazine against *Alternanthera tenella* Colla plants compared to other weed species. **Heliyon**, v.8, n.7, e09902, 2022.

SOUSA, G.F.M.; GOMES, D.G.; CAMPOS, E.V.R.; OLIVEIRA, J.L.; FRACETO, L.F.; STOLF-MOREIRA, R.; OLIVEIRA, H.C. Post-emergence herbicidal activity of nanoatrazine against susceptible weeds. **Frontiers in Environmental Science**, v.6, p.1-12, 2018.

SOUZA, G.M.; BARBOSA, A.M. Fatores de estresse no milho são diversos e exigem monitoramento constante. **Visão Agrícola**, v.13, n.1, p.30-34, 2015.

TAKESHITA, V.; SOUSA, B.T.; PREISLER, A.C; CARVALHO, L.B.; PEREIRA, A.E.S.; TORNISIELO, V.L.; DALAZEN, G.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F. Foliar absorption and field herbicidal studies of atrazine-loaded polymeric nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v.418, n.e.126350, 2021.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I.M.; MURPHY, A. (Org). **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 2017. 888p.

TERRA, M.A.; MARTINS, D.; COSTA, N.V.; MARCHI, S.R. avaliação de pontas e taxas de aplicação na deposição de calda no milho e em plantas daninhas. **Bioscience Journal**, v.30, n.6, p.1661-1670, 2014.

THOM, R.; CUMMINS, I.; DIXON, D.P; EDWARDS, R.; COLE, D.J.; LAPTHORN, A.J. Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. **Biochemistry**, v.41, p.7008-7020, 2002.

TRIPATHI, D.K.; SHWETA, S.; SINGH, S.; PANDEY, R. SINGH, V.P.; SHARMA, N.C.; PRASAD, S.M; DUBEY, N.K.; CHAUHAN, D.K. An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.110, p.2-12, 2017.

USMAN, M.; FAROOQB, M.; WAKEEL, A.; NAWAZ, A.; CHEEMA, S.A.; REHMAN, H.; ASHRAF, I.; SANAUULLAH, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the Total Environment**, v.721, n.e. 137778, 2020.

VARGAS, L.; PEIXOTO, C.M.; ROMAN, E.S. **Manejo de plantas daninhas na cultura do milho**. Documentos online 61. Passo Fundo: Embrapa Trigo. 67p. 2006.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução**. Documentos online 58. Passo Fundo: Embrapa Trigo. 22p. 2006.

VIJAYAKUMAR, M.D.; SURENDHAR, G.J.; NATRAYAN, L.; PATIL, P.P.; RAM, P.M.B.; PARAMASIVAM, P. Evolution and Recent Scenario of Nanotechnology in Agriculture and Food Industries. **Journal of Nanomaterials**, v.2022, n.e. 1280411, 2022.

WAGNER, M.V.; JADOSKI, S.O.; LIMA, A.S.; MAGGI, M.F.; POTT, C.A.; SUCHORONCZEK, A. Avaliação do ciclo fenológico da cultura do milho em função da soma térmica em Guarapuava, Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v.4, n.1, p.135–149, 2011.

WALKER, G.W.; KOOKANA, R.S.; SMITH, N.E.; KAH, M.; DOOLETTE, C.L.; REEVES, P.T.; LOVELL, W.; ANDERSON, D.J.; TURNEY, T.W.; NAVARRO, D.A. Ecological Risk Assessment of Nano-enabled Pesticides: A Perspective on Problem Formulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, p.6480–6486, 2018.

WSSA. Weed Science Society of America. **Weed Technology**, v.12, n.4, p.789, 1998.

YU, M.; YAO, J.; LIANG, J.; ZENG, Z.; CUI, B.; ZHAO, X.; SUN, C.; WANG, Y.; LIU, G.; CUI, H. Development of functionalized abamectin poly(lactic acid) nanoparticles with regulatable adhesion to enhance foliar retention. **RSC Advances**, v.7, n.19, p. 11271–11280, 2017.

YU, Q.; POWLES, S. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. **Plant Physiology**, v.166, n.3, p.1106–1118, 2014.

ZHANG, Y.; FU, F.; LI, S.; YAN, J.; SUN, M.; GIRALDO, J.P.; MATYJASZEWSKI, K.; TILTON, R.D.; LOWRY, G.V. Star polymer size, charge content, and hydrophobicity affect their leaf uptake and translocation in plants. **Environmental Science & Technology**, v.55, n.15, p.10758-10768, 2021.

CAPÍTULO I

3. RESPOSTAS DE TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.) A TRÊS NANOFORMULAÇÕES DE ATRAZINA

3.1. RESUMO

As nanoformulações herbicidas contendo atrazina têm como prioridade aumentar a eficiência do ingrediente ativo. A atrazina é amplamente utilizada para controle de plantas daninhas no cultivo de milho, naturalmente tolerante a este herbicida. Objetivou-se avaliar a tolerância das plantas de milho à atrazina em aplicação pós-emergente em formulações convencional e nano. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas em casa de vegetação. A primeira etapa foi realizada em experimento organizado em esquema fatorial 6x2 (formulações x doses), utilizando as formulações atrazina convencional (ATZ), e contida nas nanoformulações de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), PCL+ATZ revestidas com quitosana (PCL/CS+ATZ), e zeína (ZN+ATZ), nas doses 1000 e 2000 g i.a. ha⁻¹, mais as três formulações de nanocápsulas sem ingrediente ativo. A segunda etapa consistiu num experimento organizado em esquema fatorial 3x3 (formulações x tempo de coleta), utilizando as formulações ATZ, PCL+ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ na dose 2000 g i.a. ha⁻¹, com coletas as 24, 48 e 72 horas após aplicação. Foram avaliadas variáveis fisiológicas e morfológicas de crescimento das plantas, quantificados marcadores de estresse oxidativo e a atividade de enzimas antioxidantes e detoxificante. Ambos experimentos contaram com um tratamento controle (plantas cultivadas sem aplicação). As nanoformulações de NCs sem ingrediente ativo foram atóxicas a fisiologia e biometria das plantas de milho. Apesar de as nanoformulações PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ inibirem a atividade do fotossistema II até 16,8% mais que ATZ, também desencadearam a maior atividade enzimática de catalases, peroxidases e superóxido dismutase. A maior atividade de detoxificação por glutathione S-transferase ocorreu em plantas aplicadas com ATZ. As nanoformulações de carga positiva (PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ) provavelmente apresentam maior interação com a superfície das folhas e maior atividade herbicida. A nanoencapsulação de atrazina não comprometeu a tolerância das plantas de milho a este ingrediente ativo nas condições avaliadas.

Palavras-chave: estresse abiótico em plantas; nanoherbicidas; nanotecnologia; triazinas; seletividade herbicida.

3.2. INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) apresenta importância socioeconômica para a agricultura brasileira (ALVES et al., 2015). Ela ocupa o segundo lugar do país na produção entre as culturas de grãos e a primeira entre os cereais, atingindo a marca de 131,9 milhões de toneladas de grãos colhidas na safra 2022/23 (CONAB, 2023). Essa cultura apresenta como diferenciais a possibilidade de cultivo em mais de uma safra em um mesmo ano agrícola, destinação a produção de silagem ou grãos, e a versatilidade de usos dos grãos, que atendem a alimentação humana, servem de matéria-prima para a indústria e são parte da composição de rações animais (ALVES et al., 2015; ARTUZO et al., 2019; OLIGINI et al., 2019). Além disso, há a possibilidade de conversão dos grãos em etanol (SILVA et al., 2020).

A presença de plantas daninhas na lavoura de milho pode levar à redução de até 90% da produtividade (CONSTANTIN et al., 2007; KOZLOWSKI; KOEHLER; PITELLI, 2009). Para evitar essa situação, a utilização de herbicidas químicos com o ingrediente ativo atrazina é uma das técnicas empregadas no manejo integrado de plantas daninhas (RODRIGUES et al., 2019). As plantas de milho apresentam naturalmente a tolerância ao ingrediente ativo atrazina devido ao metabolismo de detoxificação da molécula por meio da ação de enzimas glutathione-S-transferase (GST) e hidroxilação não enzimática (CHERIFI, et al., 2001; EVANS JUNIOR et al., 2017). Assim, o controle das plantas daninhas pode ser realizado sem que haja danos relevantes às plantas que estão sendo cultivadas.

A nanotecnologia apresenta grande potencial para contribuir com o aumento de produtividade das culturas, podendo ser empregada em diferentes fases de desenvolvimento das plantas e para várias finalidades (USMAN et al., 2020; VIJAYAKUMAR et al., 2022). A nanoencapsulação de atrazina por polímero poli(ϵ -caprolactona), PCL, foi responsável por aumentar a eficiência herbicida e promover o melhor controle de plantas daninhas em condições de casa de vegetação e campo (OLIVEIRA et al., 2015; SOUSA et al., 2018; SOUSA et al., 2020; TAKESHITA et al., 2021). A formulação de nanoatrazina baseadas em nanocápsulas da proteína zeína também promoveu ganhos em eficiência no controle de plantas daninhas, avaliado em cenário de aplicação em pré-emergente (CARVALHO et al., 2023).

Em casa de vegetação, a aplicação pós-emergente de até 2000 g i.a. ha⁻¹ de nanoatrazina contida em nanocápsulas de PCL levou a uma baixa fitotoxicidade

em plantas de milho e não comprometeu o seu desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2015). A aplicação desta mesma nanoformulação em mesma dose realizada no campo gerou resultados severos, comprometendo o desenvolvimento das plantas de milho (SOUSA, 2020). Quando semeadas em vasos após a aplicação pré-emergente de até 2000 g i.a. ha⁻¹ de atrazina em nanocápsulas de zeína, as plantas de milho não apresentaram inibições de germinação nem na atividade do FSII, tampouco alterações nos parâmetros de crescimento avaliados (CARVALHO et al., 2023).

Diversos desafios surgem durante a síntese e aplicação de uma nanoformulação carreadora de agroquímicos, para que ela seja segura e eficiente (AVELLAN et al., 2021). Os diferentes polímeros utilizados na nanoencapsulação dão origem a sistemas carreadores com características únicas de tamanho, forma, potencial elétrico e dispersão das nanopartículas, o que interfere diretamente na adesão as folhas, absorção e translocação (YU et al., 2017; ZHANG et al., 2021; PARKINSON et al., 2022).

De fato, ainda não são completamente conhecidas as mudanças no modo de ação da atrazina promovidos pela nanoencapsulação do ingrediente ativo, e que podem comprometer a tolerância das plantas de milho; ou se o efeito de fitotoxicidade encontrado em trabalhos anteriores possa estar relacionado a matriz polimérica utilizada. Nesse sentido, objetivou-se avaliar o impacto de três nanossistemas carreadores de atrazina na tolerância das plantas de milho ao ingrediente ativo, bem como suas variantes sem a introdução de ingrediente ativo, e compará-las aos efeitos da aplicação da formulação comercial de atrazina.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Material Vegetal e Condição de Cultivo

Foram conduzidos dois experimentos com plantas de milho em casa de vegetação no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), utilizando plantas de milho híbrido GNZ 7740 VIP3 (Genese®), que apresenta ciclo de desenvolvimento precoce. Em ambos experimentos foi utilizado solo como substrato, coletado na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. As características físico-químicas do solo são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Atributos químicos do solo utilizado como substrato no experimento com milho e formulações de atrazina.

pH (CaCl ₂)	M.O.	P	K	Na	Ca	Mg	SB	CTC	V
	g dm ⁻³	mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻³				%
5,36	7,02	5,76	0,12	0,0	2,76	0,85	3,73	8,17	45,68

M.O.: Matéria orgânica; P: Fósforo; K: Potássio; Na: Sódio; Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; SB: Soma de bases; CTC: Capacidade de troca catiônica (pH 7.0); V: Saturação por bases. **Fonte:** O próprio autor.

3.3.2. Formulações

Atrazina Convencional (ATZ): a formulação considerada convencional teve como fonte o ingrediente ativo atrazina, com moléculas livres na formulação, adquirido da Syngenta[®]. Foi utilizada a diluição com 1 g i.a. L⁻¹.

Atrazina em nanocápsulas de poli(épsilon-caprolactona) (PCL+ATZ): Essa nanoformulação é composta por nanocápsulas do polímero poli(épsilon-caprolactona) (PCL) que abriga moléculas de ingrediente ativo em seu núcleo, sendo preparada segundo o protocolo de Grillo et al. (2012). Esse processo consistiu na mistura de uma fase orgânica a uma fase aquosa. A fase orgânica foi composta por 100 mg de polímero (PCL), 30 mL de solvente orgânico (acetona), 200 mg de óleo (triglicérides de ácido cáprico e caprílico, na forma de Myritol 318), 40 mg de monoestearato de sorbitano (Span 60) e 10 mg de atrazina. A fase aquosa foi composta por 30 mL de uma solução contendo 60 mg de surfactante polissorbato 80 (Tween 80). Após a dissolução dos elementos 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, seguida da evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida por evaporador rotativo. Ao fim do processo foi obtida a nanoformulação com concentração de atrazina de 1 g L⁻¹, contendo nanocápsulas em formato esférico, com distribuição uniforme e sem agregados, com tamanho entre 240 ± 4 nanômetros, índice de polidispersão de 0,041 ± 0,05, potencial zeta de -30 ± -2 mV e eficiência de nanoencapsulação de aproximadamente 94%.

Atrazina em nanocápsulas de poli(épsilon-caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS+ATZ): a síntese dessa nanoformulação contou com duas etapas. A primeira etapa foi a síntese de nanocápsulas de PCL contendo atrazina

segundo protocolo de Grillo et al. (2012), já descrito anteriormente. A segunda etapa foi o processo de recobrimento das nanocápsulas de PCL com quitosana. Para essa etapa foi preparada uma solução de quitosana de baixo peso molecular de 0,5% (m/v) em solução de ácido acético 1% (v/v). Esse processo foi realizado *overnight* e a suspensão obtida foi posteriormente filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo. No processo de recobrimento, 5 mL da solução de quitosana foram inseridos lentamente a 5 mL de formulação contendo nanocápsulas de PCL sob agitação constante durante uma hora. A formulação obtida ao final da síntese apresentava a concentração de 1 g L⁻¹ de atrazina, as nanocápsulas apresentavam formato esférico, distribuição uniforme, sem agregados, tamanho entre 262 ± 3 nanômetros, índice de polidispersividade de próximo de 0,2, potencial zeta de 25 ± 2 mV e eficiência de nanoencapsulação de aproximadamente 94%.

Atrazina em nanocápsulas de zeína (ZN+ATZ): a nanoformulação foi preparada com base no método de precipitação por antissolvente descrito por Hu e McClements (2014). Primeiramente, 200 mg de zeína foram solubilizados em 10 mL de solução hidroetanólica 85% (v/v). Essa solução foi submetida à centrifugação a 1700 x g durante 30 min para separação de eventuais impurezas ou proteína não solúvel, seguida de um tratamento térmico, a 75 °C por 15 min, e filtrada em filtros de membrana com porosidade de 0,45 µm. Uma segunda solução foi preparada a partir de 30 mg do herbicida atrazina dispersos em 300 mg do tensoativo Polisorbato 80, e a essa dispersão foram adicionados os 10 mL de zeína solubilizada. A solução foi então mantida sob agitação para garantir a completa dissolução do herbicida. Separadamente, foi preparada uma solução aquosa de Poloxamer 188 (2% m/v) com pH ajustado para 4. Posteriormente, a solução de atrazina dissolvida no tensoativo e zeína foi injetada em 30 mL da solução aquosa sob constante agitação. A dispersão coloidal resultante foi mantida em agitação durante 20 min e o etanol foi evaporado em um evaporador rotativo, obtendo um volume final de 30 mL da formulação. A nanoformulação obtida apresentou nanocápsulas de zeína contendo atrazina com formato esférico, tamanho entre 130 a 170 nm, índice de polidispersão menor que 0,25, potencial zeta no entorno de 12 mV e eficiência de encapsulação maior que 90%, em uma concentração de 1 g i.a. L⁻¹.

Para as três nanoformulações contendo atrazina, também foram utilizadas suas variantes formuladas sem a adição do ingrediente ativo (segundo os mesmos protocolos de síntese já descritos), sendo então compostas por

nanocápsulas sem herbicida, identificadas por PCL, PCL/CS e ZN.

3.3.3. Experimento 1

Para este experimento foram utilizados vasos plásticos com capacidade de 3,5 L preenchidos com solo (item 3.3.1). Em cada vaso, foram semeadas três sementes de milho e, após a germinação e emergência das plântulas, foi realizado o raleio, mantendo-se duas plantas por vaso. A partir do estágio V₃ foram adicionados semanalmente 50 mL de solução nutritiva (Tabela 2). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e organizado em esquema fatorial 2 x 6 (doses x formulações) com quatro repetições de um vaso cada. As doses utilizadas foram 1000 e 2000 g i.a. ha⁻¹ das formulações ATZ, PCL+ATZ, PCL, PCL/CS+ATZ, PCL/CS, ZN+ATZ e ZN. Plantas de milho com a aplicação de água destilada foram cultivadas como tratamento controle (CTL), as quais forneceram dados para posterior cálculo de inibição da atividade do fotossistema II (FSII). As formulações foram pulverizadas nas plantas em estágio de desenvolvimento vegetativo V₄ com um pulverizador manual e com volume de calda de 9,4 mL por vaso.

Tabela 2. Concentração final de sais da solução nutritiva aplicada aos vasos cultivados com milho.

Sal	Concentração
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	4 mM
K ₂ SO ₄	8 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	8 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	8 mM
H ₃ BO ₃	370 µM
MnCl ₂ .4H ₂ O	72 µM
ZnCl ₂	6 µM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,24 µM
CuCl ₂ .2H ₂ O	2,65 µM

Fonte: O próprio autor.

A partir do momento da aplicação, foram realizadas as medidas fisiológicas de atividade do FSII das plantas de milho às 24, 48, 72 e 96 horas após aplicação (HAA), e sete, 14, 21 dias após a aplicação (DAA). Também foram realizadas as avaliações de condutância estomática às 48 e 72 HAA. As avaliações

realizadas até o sétimo DAA foram na região mediana da quarta folha totalmente expandida de cada planta, evitando a nervura central. A partir dos 14 DAA as avaliações foram realizadas na região mediana da última folha totalmente expandida de cada planta, evitando-se a nervura central. Aos 30 DAA, foram realizadas a desmontagem do experimento e as avaliações morfológicas das plantas.

3.3.4. Experimento 2

Em vasos plásticos de 1 L preenchidos com solo (item 3.3.1) foram cultivadas duas plantas de milho até atingirem o estágio V₄. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, organizado em esquema fatorial 3 x 4 (tempos de coleta x formulações). Os tempos de coleta foram as 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA) das formulações ATZ, PCL+ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹. Também foram cultivadas plantas com a aplicação de água como o tratamento controle (CTL). A atividade herbicida nas plantas foi avaliada por meio das medidas fisiológicas de atividade do FSII e índice SPAD e coleta de material vegetal para análises bioquímicas de marcadores de estresse oxidativo e atividade enzimática antioxidante e detoxificante.

3.3.5. Avaliações

3.3.5.1. Avaliações fisiológicas

Quanto à atividade do FSII, foram avaliadas a eficiências quânticas máxima (F_v/F_m), efetiva (Y_{II}) e a taxa relativa do transporte de elétrons ($rETR$), utilizando-se fluorômetro portátil (OS1p – Opti-Sciences). O fluorômetro é um equipamento que permite a medida dos danos causados ao FSII das plantas mesmo antes da visualização dos sintomas de fitotoxicidade (GIROTTI et al., 2010).

A eficiência quântica máxima do FSII foi determinada pela razão F_v/F_m . Para a obtenção desses dados, inicialmente as plantas avaliadas necessitaram de aclimação ao escuro, a qual foi feita por 20 minutos cobrindo-se os vasos com tecido não tecido (TNT) preto. Nas folhas a serem avaliadas foram colocados os cliques

FL-DC, aos quais foi conectado o sensor do fluorômetro, que realiza as medidas de intensidade da fluorescência emitida pela clorofila *a*. Esses cliques delimitam a área de avaliação da fluorescência emitida pelas plantas e isolam essa área de avaliação do contato com a luminosidade do ambiente. A partir da aclimação ao escuro, foi possível realizar a medida de intensidade inicial de fluorescência da clorofila *a* (F_0) em resposta à uma luz modulada com baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFA), emitida pelo equipamento por 1,0 segundo. Após a medida de F_0 , o equipamento emitiu um pulso de luz saturante ($8250 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 0,8 segundos, e durante esse período foi obtida a fluorescência máxima emitida pela clorofila *a* (F_m). A fluorescência variável (F_v) foi obtida pela diferença entre F_m e F_0 , possibilitando a obtenção da razão F_v/F_m (BAKER, 2008). Todos os cálculos foram realizados pelo próprio equipamento.

Após as medidas da eficiência máxima do FSII foram realizadas as medidas da eficiência efetiva do FSII (Y_{II}). Essas medidas foram realizadas com plantas aclimatadas a luminosidade natural do ambiente, tendo a DFFA medida por luxímetro digital modelo LX1010B (Politerm). O mesmo fluorômetro foi utilizado, porém foi alterado o clipe onde o sensor é acoplado. Para isso, foi utilizado o modelo aberto que delimita a área de leitura, porém permite o contato da folha com a luminosidade natural do ambiente. Inicialmente, com as plantas aclimatadas à luminosidade natural foi realizada a medida de fluorescência basal emitida pela clorofila *a* (F'), em seguida, após a emissão do pulso de luz saturante ($8250 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi obtida a fluorescência máxima (F_m'). A partir desses dados foi calculada a fluorescência variável (ΔF), e os valores de Y_{II} dados pela razão $\Delta F/F_m'$ calculada pelo próprio equipamento. Com os valores de Y_{II} e da DFFA foi calculada a taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) pela seguinte equação fornecida por Baker (2008):

$$rETR = Y_{II} \times DFFA \times 0,5 \times 0,84$$

onde, as constantes 0,5 e 0,84 correspondem a divisão da energia captada pelas plantas entre os dois fotossistemas, e ao valor aproximado de máximo aproveitamento da luz captada pelas plantas, respectivamente.

A partir da razão F_v/F_m de plantas que não receberam pulverização dos herbicidas (testemunhas), foi possível calcular a taxa de inibição do FSII das plantas de cada tratamento pela seguinte fórmula:

$$\text{Inibição do FSII (\%)} = \frac{F_v/F_m \text{ Controle} - F_v/F_m \text{ Tratamento}}{F_v/F_m \text{ Controle}} \times 100$$

A condutância estomática foi avaliada utilizando-se um porômetro portátil (Leaf Porometer SC-1 – Decagon Devices). A avaliação consistiu em acoplar à face abaxial das folhas das plantas, evitando-se a nervura central, o sensor do equipamento em forma de clipe que contém a câmara que realiza a medida da condutância estomática. A primeira avaliação foi realizada no período da tarde, entre as 14 e 16 h, e a segunda avaliação realizada no período da manhã, entre as 9:30 e 11:30 h. Os valores das medidas foram anotados após o período de 30 segundos programados pelo equipamento, necessários até atingir a estabilização dos gases dentro da câmara.

O índice SPAD é uma avaliação com base na relação entre os índices de nitrogênio e os teores de clorofila presentes nas folhas. Os dados foram obtidos com a utilização do medidor eletrônico de teor de clorofila (atLEAF CHL PLUS, FT Green LLC), que contém uma câmara de leitura. Para as avaliações, a câmara de leitura do equipamento foi posicionada na parte mediana da face adaxial das folhas (evitando-se a nervura central), anotando-se o índice indicado pelo equipamento após cada medida.

3.3.5.2. Avaliações biométricas

Altura de plantas: Antes de as plantas serem coletadas, foi utilizada uma régua milimetrada, que foi colocada em contato com o solo e avaliado o ponto de máxima estatura da planta;

Diâmetro de colmo: Também avaliado antes das plantas serem coletadas, posicionando um paquímetro na região mediana do colmo entre o primeiro nó e a bainha da primeira folha totalmente expandida;

Contagem do número de folhas completamente expandidas: Foram consideradas e contadas como completamente expandidas as folhas cuja bainha não tocava o colmo;

Após essas medidas, as plantas foram retiradas inteiras dos vasos e lavadas em água corrente para eliminar o solo presente no sistema radicular. Após a lavagem, as plantas foram colocadas em baldes com água até serem realizadas as seguintes avaliações:

Comprimento de raízes: Utilizando uma trena milimetrada, foi medido

o comprimento da maior raiz encontrada;

Massa fresca de parte aérea e raízes: As plantas foram divididas em parte aérea e raízes, fazendo o corte na zona de transição presente na base do caule, e pesadas separadamente em balança semi-analítica.

Massa seca de parte aérea e raízes: Após sete dias acondicionadas em sacos de papel em estufa de secagem a temperatura de 70 °C, os materiais vegetais foram pesados na mesma balança utilizada na avaliação anterior.

3.3.5.3. Avaliações bioquímicas

Para essas avaliações, a quarta folha expandida das duas plantas de milho foi coletada (aproximadamente 1,5 g), armazenada em envelope de alumínio, congelada em nitrogênio líquido e por fim guardada em biofreezer a -80 °C. O material vegetal coletado foi triturado na presença de nitrogênio líquido (aproximadamente 10 mL), dentro de tubos do tipo falcon de 50 mL com duas esferas metálicas. Os tubos foram agitados em agitador de tubos até a completa trituração do material vegetal coletado. O material triturado foi coletado em microtubos de 2,0 mL com a tampa perfurada, com a alíquota destinada a cada uma das análises bioquímicas. Os microtubos com as alíquotas foram armazenados em biofreezer a -80 °C até o momento de realização das análises.

O estresse oxidativo nas plantas de milho após a aplicação das formulações contendo atrazina foi avaliado por meio da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (método TBARS), que indicam a ocorrência de peroxidação lipídica (CAMEJO; WALLIN; ENOJÄRVI, 1998), quantificação de peróxido de hidrogênio (ALEXIEVA et al., 2001) e quantificação de dienos conjugados (BOVERIS et al., 1980). Para a quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e peróxido de hidrogênio foram utilizados sobrenadantes de uma mesma extração. Aos microtubos de coleta com 100 mg de material foram adicionados 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA 0,2%) em metanol, e levemente agitados para homogeneização. Esses microtubos foram armazenados em caixa térmica com gelo antes e após a centrifugação a 4 °C e 15.645 xg por cinco minutos em centrífuga refrigerada MIKRO 220 R (Hettich Zentrifugen)

Para o método TBARS foi montada uma placa de micropoços

transparentes contendo 140 μL de PBS (KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,4 mM, NaCl 137 mM e K_2HPO_4 174,18), 50 μL de ácido tricloroacético (TCA) 50 % (em água destilada), 10 μL de BHT (diluído em etanol 95%), 75 μL de ácido tiobartitúrico (TBA) 1,3% (em NaOH 0,3%) e 40 μL de sobrenadante de cada amostra. A placa foi levada a estufa a 60 °C por uma hora. Após esse período, a leitura da absorbância foi realizada em SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 535 e 600 nm. Já para a reação de peróxido de hidrogênio, em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 400 μL de KI, 100 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 100 μL de sobrenadante. Esses todos foram agitados manualmente para homogeneização e conservados em caixa térmico com gelo por uma hora. Ao fim do período de incubação, 200 μL foram coletados de cada microtubo e adicionados a uma placa de micropoços transparentes. Foi realizada, imediatamente após o término de pipetagem das amostras na placa, a leitura da absorbância foi realizada em SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices) nos comprimentos de onde de 390 nm. A partir de curvas de calibração foram determinadas as quantidades de péroxido de hidrogênio e MDA nas amostras.

Para a quantificação do conteúdo de dienos conjugados, 1,5 mL de etanol 96% foram adicionados aos micrubos de 2 mL contendo uma alíquota de 100 mg de material vegetal triturado. Os microtubos foram levemente agitados e conservados em caixa térmica com gelo. Em seguida, foram levados para centrifugação a 4 °C por 20 min e 15.645 xg. No fim desse processo, alíquotas de 50 μL do sobrenadante foram coletadas e diluídas em 1450 μL de etanol 96%. Essas tiveram suas absorbâncias lidas em espectrofotômetro (Genesis 10S UV-Vis – Thermo Scientific) nos comprimentos de onde de 234 nm e 500 nm.

A atividade das enzimas com ação antioxidante foi avaliada a partir de extratos enzimáticos obtidos de 100 mg do material vegetal triturado. Aos microtubos de coleta foram adicionados 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo EDTA (1 mM) e polivinil-poli-pirrolidona (PVPP) 2% (p/v). Os tubos foram mantidos em caixa térmica com gelo durante todo o processo de pipetar o tampão extrator. Os microtubos foram agitados manualmente para homogeneizar o conteúdo, e em seguida centrifugados a 15.645 xg, a 4 °C por 20 minutos em centrífuga refrigerada MIKRO 220 R (Hettich Zentrifugen). Após a centrifugação, foram coletadas quatro alíquotas de aproximadamente 300 μL de sobrenadante de cada amostra. As alíquotas foram levadas ao freezer -20 °C, onde permaneceram até

o momento de uso na análise.

Para a enzima ascorbato peroxidase (APX), a atividade foi determinada de acordo com a metodologia de Nakano e Asada (1981). Alíquotas de 50 μL dos extratos enzimáticos foram adicionadas em meios de reação com volume de 2,9 mL, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo EDTA (0,1 mM) e ácido ascórbico (0,5 mM). As reações foram montadas diretamente em cubetas de quartzo, e após a adição de 100 μL de H_2O_2 (30 mM) as reações foram homogeneizadas por agitação manual e levadas ao espectrofotômetro (Genesis 10S UV-Vis – Thermo Scientific). As absorbâncias das amostras foram avaliadas em comprimento de onda de 290 nm a cada 15 segundos, durante os dois minutos. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para cada amostra avaliada, foi utilizada uma amostra branco para zerar o equipamento, composta apenas pelo tampão de reação e a alíquota de extrato.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada segundo Aebi (1974) e Peixoto et al. (1999). Para isso, alíquotas de 50 μL dos extratos enzimáticos foram adicionadas a meios reação, com volume de 1950 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo EDTA (0,1 mM) e H_2O_2 (12,5 mM). As reações foram montadas diretamente dentro de cubetas de quartzo. Por meio do espectrofotômetro (Genesis 10S UV-Vis – Thermo Scientific) em um comprimento de onda de 240 nm foi avaliado o decréscimo da absorbância a cada 30 segundos, durante os três primeiros minutos de reação após a adição das alíquotas de extrato. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (ANDERSON et al., 1995). Para cada amostra foi utilizado um branco para zerar o equipamento, composto do tampão fosfato de potássio sem H_2O_2 e da alíquota de extrato.

Para a atividade da peroxidase (POD), foi utilizada a metodologia de Peixoto et al. (1999). Adicionando-se alíquotas de 100 μL dos extratos enzimáticos em meios de reação com volume de 1,9 mL de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH6,8), contendo pyrogallol (20 mM) e H_2O_2 (20 mM). As reações foram montadas em tubos de ensaio de 10 mL. Um minuto após a adição da alíquota de extrato, a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de H_2SO_4 . Após a interrupção, os tubos foram armazenados em caixa térmica com gelo para resfriamento. A absorbância das amostras foi avaliada em espectrofotômetro (Genesis 10S UV-Vis – Thermo Scientific) em comprimento de onda de 420 nm para quantificar a produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 2,47$

mM⁻¹ cm⁻¹). Para cada tratamento foi montada uma reação contendo 1,9 mL de tampão fosfato de potássio e 100 µL de água deionizada (em substituição ao extrato), que foi utilizada como branco para zerar o equipamento.

Por meio da metodologia de Giannopolitis e Ries (1977) foi determinada a atividade da superóxido dismutase (SOD). Em tubos de ensaio de 10 mL, foram adicionados 1960 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8) contendo EDTA (0,1 mM), metionina (13 mM), riboflavina (2 µM) e NBT (Azul de nitrotetrazólio cloreto) 75 µM, e 40 µL de extrato. A reação foi iniciada ao incubar os tubos de ensaio contendo as reações em uma câmara de iluminação, constituída por uma caixa de isopor contendo três lâmpadas fluorescentes de 75 watts cada. Essa câmara conta com uma ventoinha do tipo cooler com a finalidade de não permitir o aumento da temperatura das reações. As amostras permaneceram nessa condição por 8 minutos, tempo necessário para expressarem coloração azul, resultado da fotorredução de NBT. Após esse período, a iluminação foi desligada e as amostras armazenadas no escuro até o momento da leitura. As absorbâncias foram avaliadas em espectrofotômetro (Genesis 10S UV-Vis – Thermo Scientific) em comprimento de onda de 560 nm. A atividade de SOD foi avaliada em unidades, onde uma unidade de SOD corresponde a atividade enzimática necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT, quando comparada à uma amostra controle (com a alíquota de extrato substituída por água deionizada). Para cada tratamento foi montada uma amostra branco, para zerar o equipamento. A amostra branco foi composta pelos mesmos reagentes e alíquota de extrato, contudo, foram mantidas no escuro até o momento de leitura.

Para análise de atividade da enzima glutathione S-transferase (GST), a extração foi realizada segundo o protocolo de Knörzer et al. (1996 apud CATANEO et al., 2003). Para isso, 0,3 g de amostra triturada foi homogeneizando ao tampão TRIS-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 7,0). Após duas centrifugações, a primeira à 4 °C por 6 min a 12.000 xg e a segunda à 4 °C por 16min e 26.900 xg, o sobrenadante foi coletado em microtubos de 1,5 mL e armazenados em freezer -20 °C para posterior análise da atividade enzimática.

A atividade enzimática de GST foi avaliada segundo Wu, Omokawa e Hatzios (1996), após montada a reação em tubos de ensaio de 10 mL, contendo 2000 µL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 6,9), 900 µL de glutathione reduzida (GSH) 3,3 mmol L⁻¹, 60 µL de extrato e 100 µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB).

A reação é iniciada após a adição do CDNB, levando a formação de conjugados de GSH-CDNB que promoverão alterações nas absorbâncias das amostras. As avaliações de absorbância foram realizadas durante cinco minutos serão lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340nm

3.3.6. Análise Estatística

Os dados de inibição do FSII foram transformados por $\arcsen\sqrt{x}$ antes de serem submetidos a análise estatística. Foram realizados os testes de normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias para todos os parâmetros avaliados e, quando estes pressupostos foram aceitos, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) por teste F $p \leq 0,05$ e posterior teste de comparação de médias (Teste de Tukey $p \leq 0,05$). Com os dados fisiológicos e bioquímicos obtidos com o desenvolvimento dos dois experimentos foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP) e uma análise de Mapa de Calor para obtenção de uma compreensão mais completa do comportamento das plantas após a aplicação das formulações.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Experimento 1

3.4.1.1. Avaliações fisiológicas

Para a variável inibição do FSII, não foi observada a interação entre os fatores formulação e volume de aplicação. O efeito da formulação foi significativo desde a primeira avaliação, com 24 horas após aplicação (HAA), até os sete dias após aplicação (DAA). Já o fator volume de aplicação foi significativo apenas nas duas primeiras avaliações (24 e 48 HAA) (Tabela 4).

Para a variável taxa relativa do transporte de elétrons (rETR), a interação entre os fatores estudados foi encontrada as 48, 72 e 96 HAA. Em todas as avaliações, o fator formulação apresentou diferença significativa, enquanto para volume de aplicação a significância ocorreu apenas as 48 HAA e 7 DAA. Já as variáveis condutância estomática e índice SPAD tiveram a interação entre os fatores

significativa em todos os períodos de suas respectivas avaliações (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância para as variáveis fisiológicas de inibição da eficiência máxima do fotossistema II (In.FSII), taxa relativa de transporte de elétrons (rETR) e condutância estomática em plantas de milho (*Zea mays*) após a aplicação das formulações de atrazina convencional, atrazina nanoencapsulada e nanocápsulas poliméricas sem ingrediente ativo em duas doses.

		Formulação (F)	Dose (D)	F x D	C.V. (%)
	Fc				
In.FSII	24 HAA	43,385 **	7,138 *	1,674 ^{ns}	4,72
	48 HAA	18,975 **	5,440 *	1,952 ^{ns}	9,08
	72 HAA	25,049 **	3,924 ^{ns}	1,753 ^{ns}	7,62
	96 HAA	12,362 **	2,100 ^{ns}	0,788 ^{ns}	8,76
	7 DAA	5,887 **	2,260 ^{ns}	2,000 ^{ns}	8,51
	14 DAA	1,912 ^{ns}	1,958 ^{ns}	1,691 ^{ns}	2,90
	21 DAA	2,463 ^{ns}	0,076 ^{ns}	0,515 ^{ns}	6,80
rETR	24 HAA	54,234 **	0,003 ^{ns}	2,037 ^{ns}	14,58
	48 HAA	15,460 **	5,751 *	2,550 *	16,46
	72 HAA	19,467 **	0,071 ^{ns}	4,945 **	13,67
	96 HAA	38,810 **	0,305 ^{ns}	4,504 **	9,84
	7 DAA	10,141 **	4,512 *	2,031 ^{ns}	14,92
	14 DAA	5,218 **	0,135 ^{ns}	1,310 ^{ns}	7,45
Condutância estomática	48 HAA	2,924 *	8,282 **	2,360 *	20,74
	72 HAA	8,181 **	0,347 ^{ns}	6,281 **	15,84

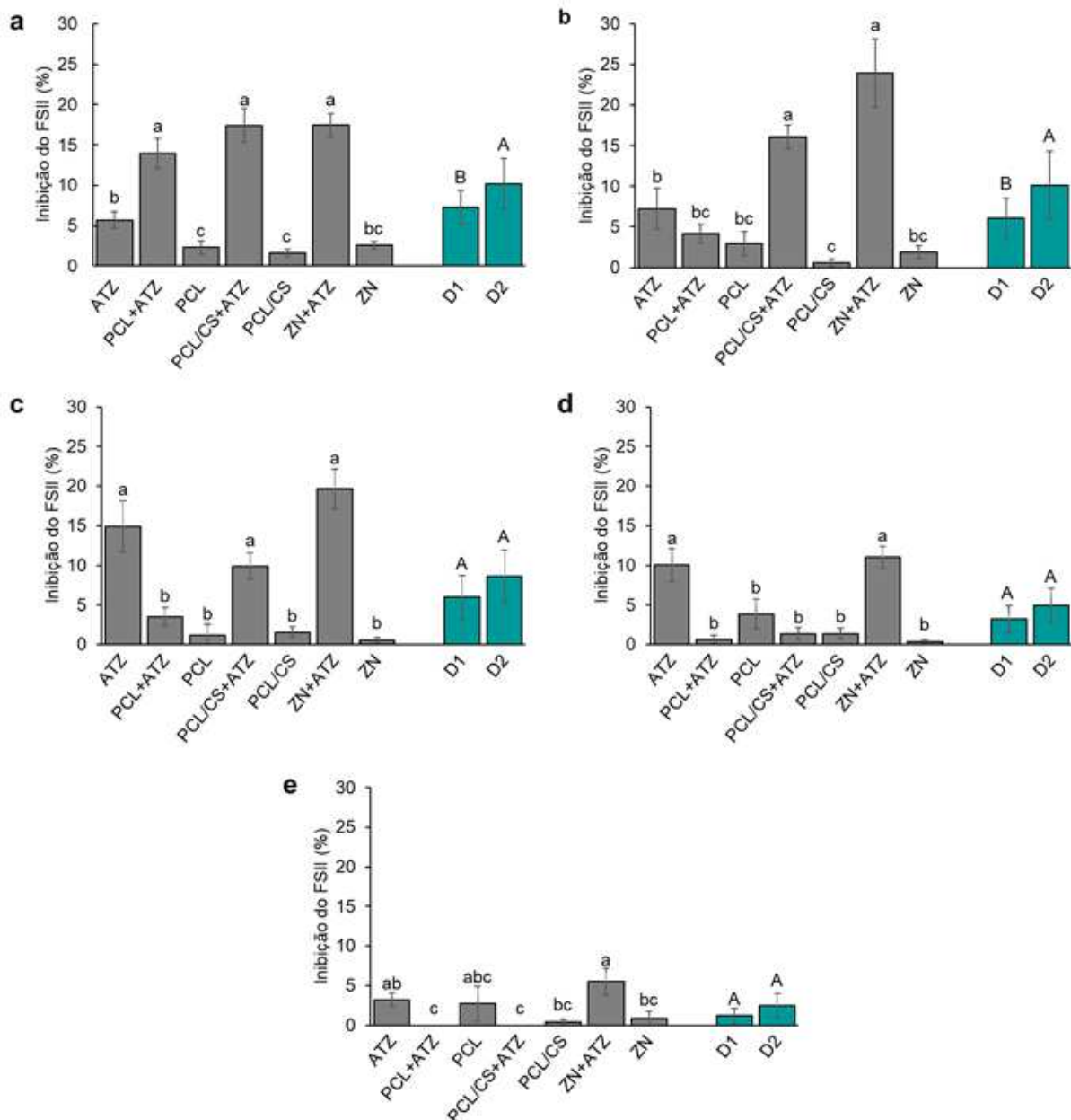
C.V.: Coeficiente de Variação; Fc: Valor de F calculado; HAA: Horas após aplicação; DAA: Dias após aplicação; **significativo a $p \leq 0,01$; *significativo a $p \leq 0,05$; ^{ns} não significativo a $p \leq 0,05$. **Fonte:** O próprio autor.

Na primeira avaliação, com 24 HAA (Figura 1a), é possível observar que as três nanoformulações de atrazina (PCL+ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ) proporcionaram maiores inibições do FSII, superiores à formulação convencional (ATZ) em 8,2%, 11,7% e 11,7%, respectivamente. De modo geral, a dose 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2) proporcionou uma inibição do FSII 3% maior que a dose 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) nessa avaliação. As formulações com nanocápsulas sem ingrediente ativo (PCL, PCL/CS e ZN) promoveram baixa inibição de FSII nas plantas de milho, no entorno de 2% (Figura 1a). Com 48 HAA, a dose D2 permaneceu promovendo maior inibição do FSII das plantas de milho (Figura 1b). Nessa avaliação, as maiores inibições de atividade do FSII foram encontradas apenas para as nanoformulações de

PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ, 9% e 16,8% maiores que ATZ, respectivamente. A nanoformulação de PCL+ATZ teve sua ação herbicida reduzida, promovendo inibições semelhantes às aquelas sem ingrediente ativo.

Às 72 HAA o efeito da dose foi perdido (Figura 1c). As formulações de ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ inibiram a atividade do FSII das plantas de milho de maneira semelhante. As nanoformulações PCL+ATZ, PCL, PCL/CS e ZN permaneceram promovendo baixa inibição do FSII das plantas de milho, entre 1% e 3,5%. Com 96 HAA, houve redução dos níveis de inibição do FSII para todas as formulações testadas, e apenas ATZ e ZN+ATZ promoveram inibições do FSII significativamente diferente das demais (Figura 1d). Aos sete DAA (Figura 1e), as formulações ATZ, PCL e ZN+ATZ continuaram a promover uma pequena inibição a atividade do FSII das plantas, 3,2%, 2,7 e 5,5%, respectivamente, enquanto as demais formulações zeraram ou promoveram inibições bem próximas de zero.

Figura 1. Inibição da eficiência máxima do fotossistema II (FSII) em plantas de milho (*Zea mays*) nos períodos de **(a)** 24 h, **(b)** 48 h, **(c)** 72 h, **(d)** 96 h e **(e)** sete dias após aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ), nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ); e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) e zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volume de formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.

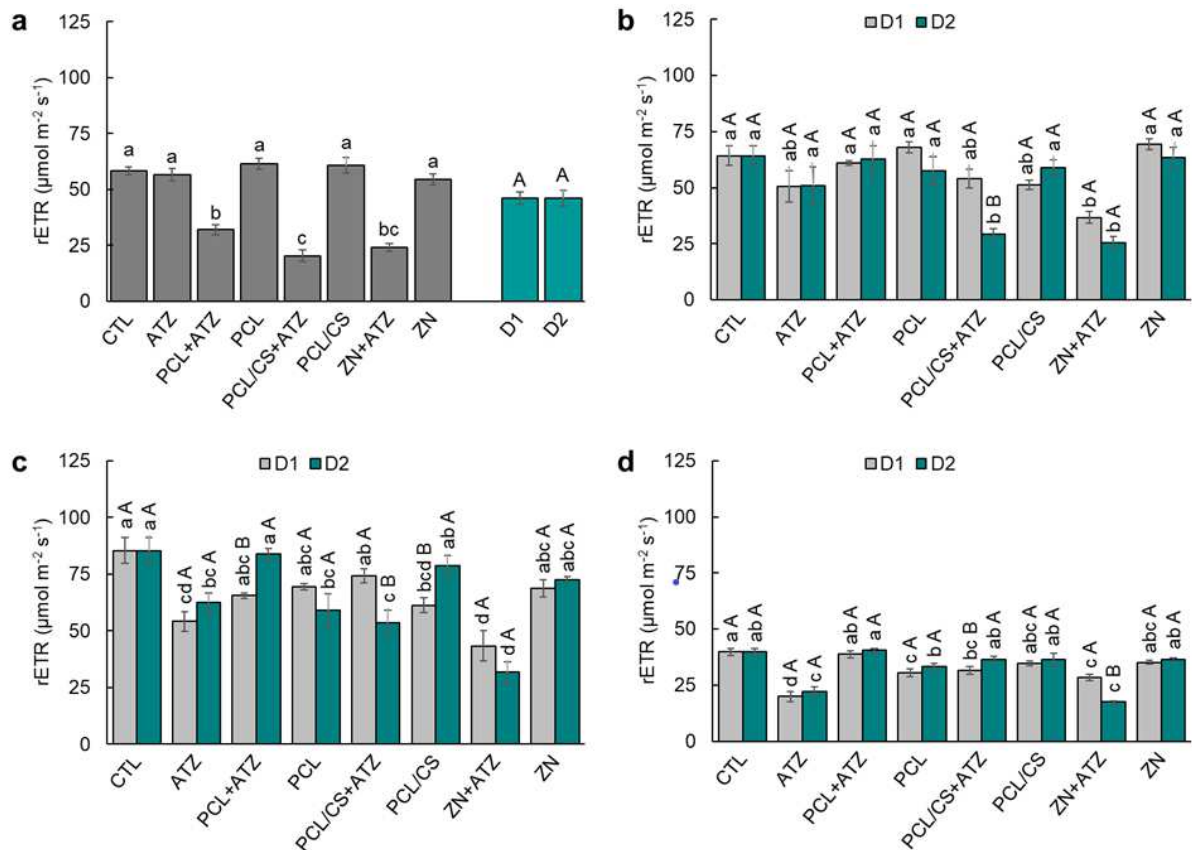


Fonte: O próprio autor.

A rETR das plantas de milho também foi comprometida após a aplicação das formulações contendo atrazina (Figura 2). Na avaliação com 24 HAA, as formulações PCL+ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ proporcionaram os menores valores de rETR, com reduções de 45,1%, 65,3% e 58,8% em relação ao tratamento controle, respectivamente (Figura 2a). Não houve diferença na rETR em relação às doses. As 48 HAA, a rETR foi reduzida em maiores porcentagens pela formulação PCL/CS+ATZ na dose D2 e por ZN+ATZ em ambas doses (Figura 2b). As reduções foram na ordem de 54,3%, 42,8% e 60,2%, respectivamente.

Com 72 HAA, todas as formulações em ambas doses levaram a alguma redução da rETR das plantas de milho em relação ao tratamento controle (Figura 2c). Nesta avaliação, a formulação convencional de atrazina (ATZ) alcançou a redução de rETR em nível semelhante às nanoformulações. Destacaram-se como maiores inibições da rETR as formulações ATZ na dose D1 (36,6%), PCL/CS+ATZ na dose D2 (37,4%) e ZN+ATZ em ambas doses (49,3% e 63,9%, respectivamente). As 96 HAA (Figura 2d), as formulações ATZ, PCL e ZN+ATZ proporcionaram as menores rETR em ambas doses. As reduções de rETR foram respectivamente para as doses D1 e D2, 50% e 44,4% em ATZ, 23% e 16,6% em PCL e 28,7% e 56,2% em ZN+ATZ.

Figura 2. Taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) em plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ), e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) ou zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2); nos tempos de **(a)** 24, **(b)** 48, **(c)** 72 e **(d)** 96 horas após aplicação. Em **(a)**, letras minúsculas diferentes indicam diferença entre formulações, e letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre volumes de formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$. Em **(b)**, **(c)** e **(d)**, letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações dentro do mesmo volume de formulação, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volumes dentro da mesma formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.



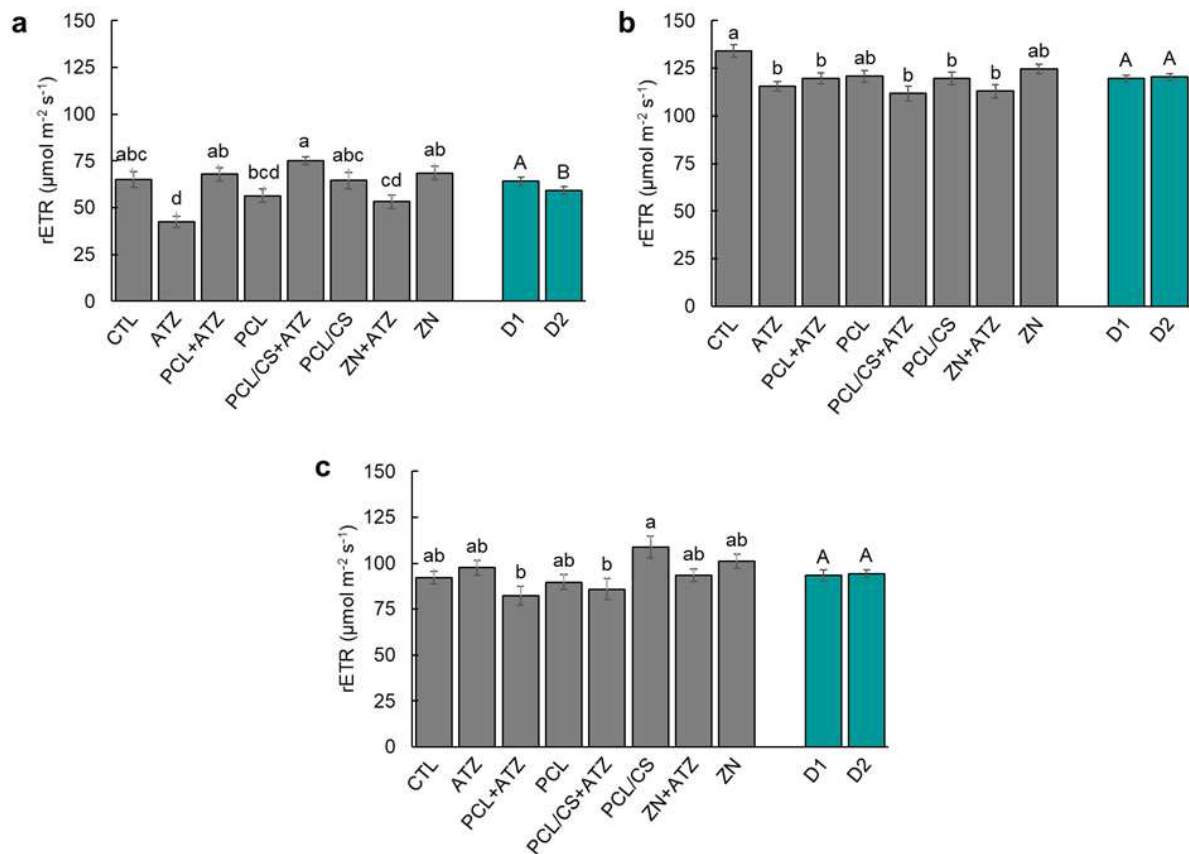
Fonte: O próprio autor.

Em avaliações tardias, como aos sete DAA, a formulação PCL/CS+ATZ proporcionou a maior rETR das plantas de milho, independente da dose, sendo 15,2% maior que o tratamento controle (Figura 3a). As formulações ATZ

e ZN+ATZ levaram as maiores reduções da rETR, 34,7% e 18,3%, respectivamente. Nessa avaliação, as plantas que receberam a dose D1 apresentaram rETR 7,6% maior que as que receberam aplicação da dose D2.

Com 14 DAA, apenas as plantas que receberam aplicação das formulações PCL e ZN mantiveram taxas de rETR semelhantes ao tratamento controle, com pequenas reduções nas demais formulações (Figura 3b). Na última avaliação, aos 21 DAA, a rETR foi reduzida em maior nível pelas nanoformulações PCL+ATZ e PCL/CS+ATZ (10,8% e 6,9%, respectivamente). As três nanoformulações de nanopartículas poliméricas sem ingrediente ativo (PCL, PCL/CS e ZN) chegaram a reduzir a rETR em nível semelhante as nanoformulações contendo atrazina até os 7 DAA. Contudo, a partir dos 14 DAA esse efeito negativo sobre a rETR foi reduzido, e não mais observado na avaliação de 21 DAA (Figura 3c).

Figura 3. Taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) em plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ), e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) ou zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2); nos tempos de **(a)** sete, **(b)** 14 e **(c)** 21 dias após aplicação. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volumes de formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.

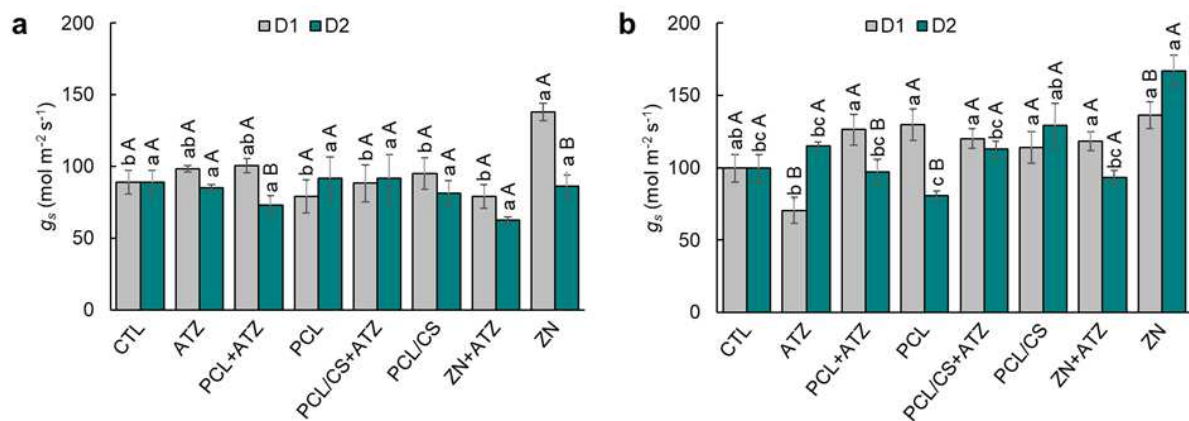


Fonte: O próprio autor.

Considerando a condutância estomática (g_s) das plantas de milho avaliada às 48 HAA foi observado que a aplicação da dose D1 de ZN aumentou em torno de 55% a g_s das plantas de milho (Figura 4a). Nenhuma formulação levou à redução dos valores de g_s neste período de avaliação. Contudo, nas formulações PCL+ATZ e ZN, a g_s foi menor para a dose D2 em comparação à dose D1. Com 72 HAA (Figura 4b), dentro da dose D1, ATZ levou à redução de 29% da g_s nas plantas.

Em relação a dose D2, ZN promoveu aumento de 67% da g_s das plantas de milho. Nessa avaliação, as formulações de ATZ e ZN apresentaram menor g_s na dose D1, enquanto para PCL+ATZ e PCL a redução ocorreu na dose D2.

Figura 4. Condutância estomática (g_s) em plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ), e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) ou zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2); nos tempos de (a) 48 e (b) 72 horas após aplicação. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações dentro do mesmo volume pelo teste Tukey $p \leq 0,05$, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volumes dentro da mesma formulação pelo teste F $p \leq 0,05$.



Fonte: O próprio autor.

3.4.1.2. Variáveis morfológicas

Apenas a variável crescimento de raízes (CR) não apresentou interação entre os fatores estudados, sendo significativa apenas para o fator formulação. O fator dose foi significativo apenas para as variáveis massas secas de parte aérea e raízes (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância para as variáveis biométricas número de folhas expandidas (NF), diâmetro do caule (DC), altura de plantas (AP), comprimento de raízes (CR), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa fresca de raízes (MFR), massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) em plantas de milho (*Zea mays*) após a aplicação das formulações de atrazina convencional, atrazina nanoencapsulada e nanocápsulas poliméricas sem ingrediente ativo em duas doses.

	NF	DC	AP	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR
Fc								
Formulação (F)	1,41 ^{ns}	4,04 ^{**}	1,58 ^{ns}	3,41 ^{**}	0,94 ^{ns}	10,11 ^{**}	1,73 ^{ns}	13,80 ^{**}
Dose (D)	0,09 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,11 ^{ns}	1,87 ^{ns}	0,38 ^{ns}	4,77 [*]	5,08 [*]
F x D	4,42 ^{**}	3,47 ^{**}	5,75 ^{**}	0,45 ^{ns}	5,64 ^{**}	5,16 ^{**}	3,90 ^{**}	9,21 ^{**}
CV (%)	5,34	6,87	5,37	8,54	18,18	13,31	13,54	10,27

C.V.: Coeficiente de Variação; **significativo a $p \leq 0,01$; *significativo a $p \leq 0,05$; ^{ns} não significativo a $p \leq 0,05$. **Fonte:** o próprio autor.

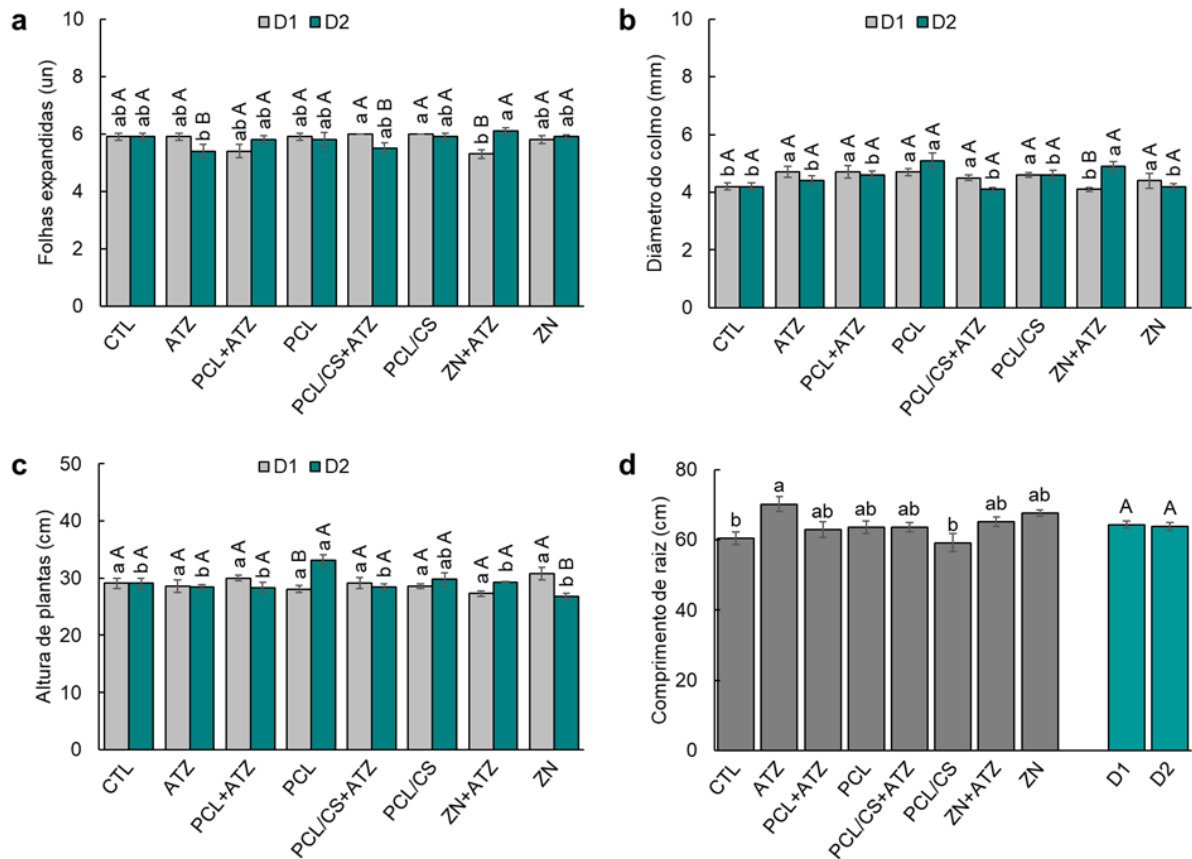
Na Figura 5 estão apresentados os desdobramentos das análises estatísticas para as variáveis biométricas relacionadas ao crescimento das plantas de milho. O número de folhas expandidas foi reduzido (em relação ao CTL) pelas formulações ATZ na dose D2 e ZN+ATZ na dose D1 (Figura 5a). Já as formulações de PCL/CS+ATZ e PCL/CS na dose D2 e ZN+ATZ na dose D1 promoveram maiores médias de folhas expandidas em relação ao controle. As formulações ATZ e PCL/CS+ATZ apresentaram menor número de folhas expandidas na dose D2, enquanto em ZN+ATZ esse efeito foi encontrado na dose D1.

Para a variável diâmetro de caule das plantas de milho (Figura 5b), houve aumento entre 5% e 7% em relação ao tratamento controle para as plantas que receberam aplicação das formulações na dose D1, exceto em ZN+ATZ. Na dose D2, apenas PCL e ZN+ATZ promoveram aumento no diâmetro dos caules, de 21% e 17% respectivamente. A formulação de ZN+ATZ foi a única a apresentar diferença de diâmetro de caule entre as doses, sendo que a dose D2 proporcionou caules com diâmetro médio 20% menores que na dose D1.

A altura das plantas de milho (Figura 5c) não foi afetada por nenhuma das formulações na dose D2, enquanto na dose D1 foi aumentada por PCL em 14% e PCL/CS em 3% em relação ao tratamento controle. A diferença de altura de plantas dentro de formulações ocorreu para PCL, que teve plantas com altura 18% maior na dose D2, e ZN que apresentou plantas 15% maiores na dose D1. O crescimento das

raízes das plantas de milho (Figura 5d), independente da dose aplicada, foi promovido por todas as formulações (entre 4% e 16%), exceto por PCL/CS, que não diferiu do controle.

Figura 5. (a) Número de folhas expandidas, (b) Diâmetro do colmo, (c) Altura de plantas e (d) Comprimento de raiz de plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ), em nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS+ATZ), nanocápsulas por zeína (ZN+ATZ) e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) e zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2). Em (a), (b), e (c) letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações dentro do mesmo volume, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volumes dentro da mesma formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$. Em (d), letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os volumes de formulação pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.

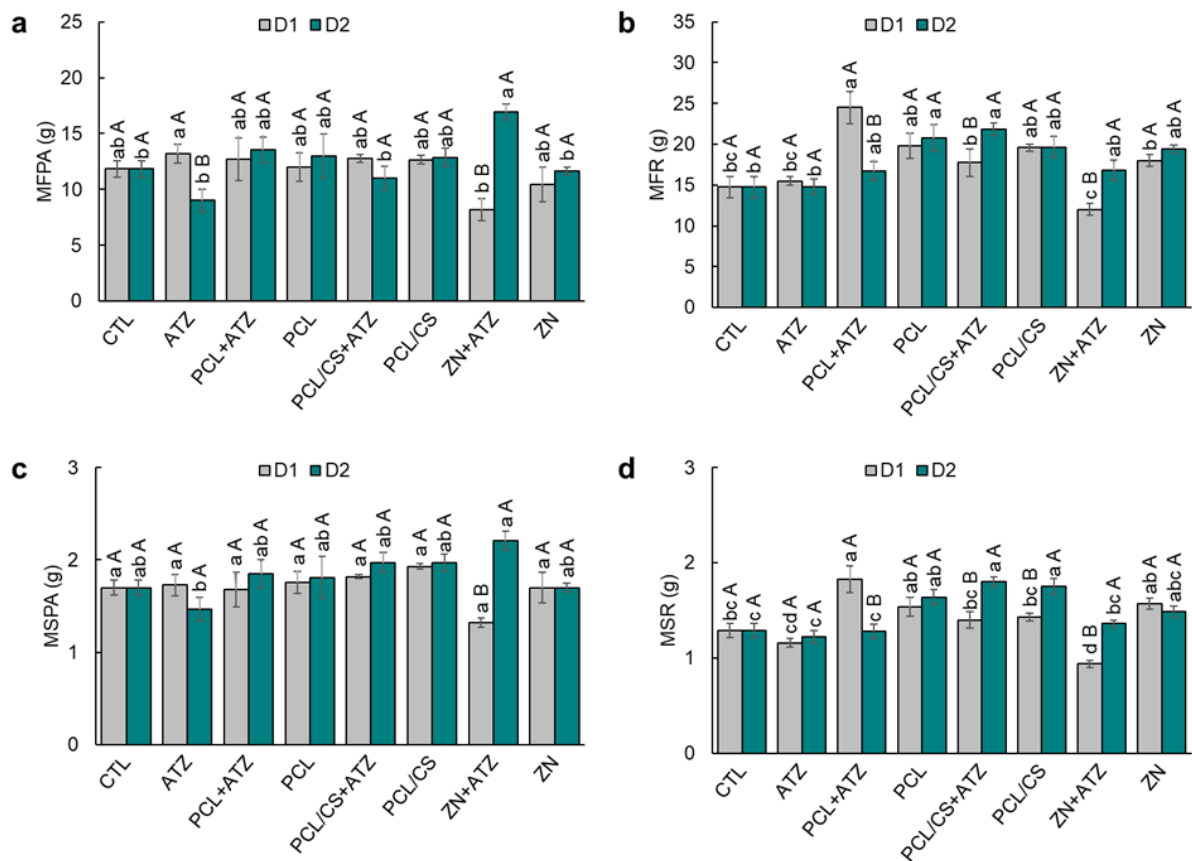


Fonte: O próprio autor.

A massa fresca da parte aérea das plantas de milho (Figura 6a) foi aumentada pela formulação ATZ em 11,7% e reduzida por ZN+ATZ em 30,8% na dose D1 em relação as plantas do tratamento controle. Já na dose D2, foi aumentada apenas pela formulação ZN+ATZ, em 43%. Diferenças nas massas frescas da parte aérea entre volumes de formulação ocorreram para ATZ (com média 46% maior na dose D1) e para ZN+ATZ (com média 106% maior na dose D2). A massa fresca de raízes (Figura 6b) foi aumentada pela aplicação da formulação PCL+ATZ na dose D1, 66% maior em relação ao controle, e por PCL e PCL/CS+ATZ na dose D2 em 41% e 48%, respectivamente. Dentro das formulações, PCL+ATZ na dose D2 proporcionou acúmulo de massa de raízes 46% menor que na dose D1, enquanto em PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ o menor acúmulo de massa de raízes ocorreu na dose D1, na ordem de 23% e 40% menor que na dose D2.

A massa seca da parte aérea das plantas de milho (Figura 6c) não foi alterada pela dose D1 de nenhuma das formulações, enquanto na dose D2 foi reduzida por ATZ em 14% e aumentada por ZN+ATZ em 30%, em relação ao tratamento controle. Apenas a formulação de ZN+ATZ diferiu quanto as doses, com menor massa seca de plantas na dose D1 (67% menor em relação a dose D2). Para massa seca de raízes (Figura 6d), dentro da dose D1, as massas foram reduzidas por ATZ e ZN+ATZ em 10% e 27%, respectivamente, em relação ao tratamento controle, e aumentada por PCL+ATZ, PCL e ZN em 41%, 19% e 21%, respectivamente. Dentro da dose D2 as formulações promoveram ganhos de massas entre 5% e 40%, exceto nas formulações ATZ e PCL+ATZ que não diferiram do tratamento controle. A formulação de PCL+ATZ apresentou 43% de redução de massa das raízes na dose D2 em relação a D1. Já para as formulações PCL/CS+ATZ, PCL/CS e ZN+ATZ, as menores médias de massas foram encontradas na dose D1, sendo 29%, 22% e 31% menores que na dose D2.

Figura 6. (a) Massa fresca de parte aérea (MFPA), (b) Massa fresca de raízes (MFR), (c) Massa seca de parte aérea (MSPA) e (d) Massa seca de raízes (MSR) de plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ), em nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS+ATZ), nanocápsulas por zeína (ZN+ATZ) e nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana (PCL/CS) e zeína (ZN) sem ingrediente ativo; nas doses 1000 g i.a. ha⁻¹ (D1) e 2000 g i.a. ha⁻¹ (D2). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre formulações dentro do mesmo volume pelo teste Tukey $p \leq 0,05$, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre volumes dentro da mesma formulação pelo teste F $p \leq 0,05$.



Fonte: O próprio autor.

Neste primeiro experimento, pode ser observado que os polímeros PCL, PCL com quitosana e zeína, utilizados para a produção das nanocápsulas contendo atrazina não foram capazes de promover inibições da atividade de FSII ou de rETR significantes a ponto de comprometer o desenvolvimento das plantas de milho. A partir dessas observações, as investigações de respostas bioquímicas das

plantas de milho ao estresse oxidativo foram direcionadas apenas às formulações de nanocápsulas associadas ao ingrediente ativo atrazina.

3.4.2. Experimento 2

3.4.2.1. Avaliações bioquímicas

Para os resultados de índice SPAD, com 24 HAA não houve diferença entre os índices de plantas CTL e dos demais tratamentos (Figura 7a). No tempo de 48 HAA, o índice das folhas com aplicação de PCL/CS+ATZ diferiu do CTL, ATZ e ZN+ATZ, com redução em 10%, 12,6% e 9,1%, respectivamente. Nesta avaliação, o índice SPAD das folhas das plantas aplicadas com PCL+ATZ não diferiu das plantas CTL e das plantas aplicadas com PCL/CS+ATZ ou ZN+ATZ, entretanto, diferiu de ATZ, ficando 7,7% menor. No tempo de 72 HAA, não houve diferença entre tratamentos para o índice SPAD. Em plantas aplicadas com ATZ ou ZN+ATZ não houve alteração do índice SPAD das folhas com o passar do tempo. Todavia, para a aplicação de PCL+ATZ ocorreram ganhos de 2,0% do tempo 24 HAA para 48 HAA e mais 5,7% até chegar as 72 HAA. A aplicação de PCL/CS+ATZ levou a uma depressão de 8,2% no índice SPAD as 48 HAA.

De maneira geral, a quantidade de dienos conjugados nas folhas das plantas de milho com 24 HAA não diferiu entre os tratamentos, com a exceção de ATZ e PCL+ATZ (Figura 7b). Nessa condição, a quantidade de dienos conjugados foi 44,2% menor em folhas aplicadas com PCL+ATZ. Com 48 HAA, a maior quantidade de dienos conjugados foi encontrada nas folhas das plantas aplicadas com ZN+ATZ, que diferiu dos demais tratamentos. Assim, em plantas aplicadas com ZN+ATZ a quantidade de dienos conjugados nas folhas foi 53,6%, 72,9%, 57,3% e 50,4% maior que o CTL e as plantas aplicadas com ATZ, PCL+ATZ e PCL/CS+ATZ, respectivamente. No último tempo de avaliação, as 72 HAA, a quantidade de dienos conjugados nas folhas das plantas aplicadas com ZN+ATZ diferiu dos tratamentos CTL, PCL+ATZ e PCL/CS+ATZ, sendo 62,3%, 71,3% e 51,3% maior, respectivamente. A aplicação de ATZ gerou, nas folhas, quantidades de dienos conjugados intermediárias entre ZN+ATZ e os demais tratamentos. Dentre os tempos de avaliação, apenas em folhas de plantas aplicadas com ZN+ATZ pode ser

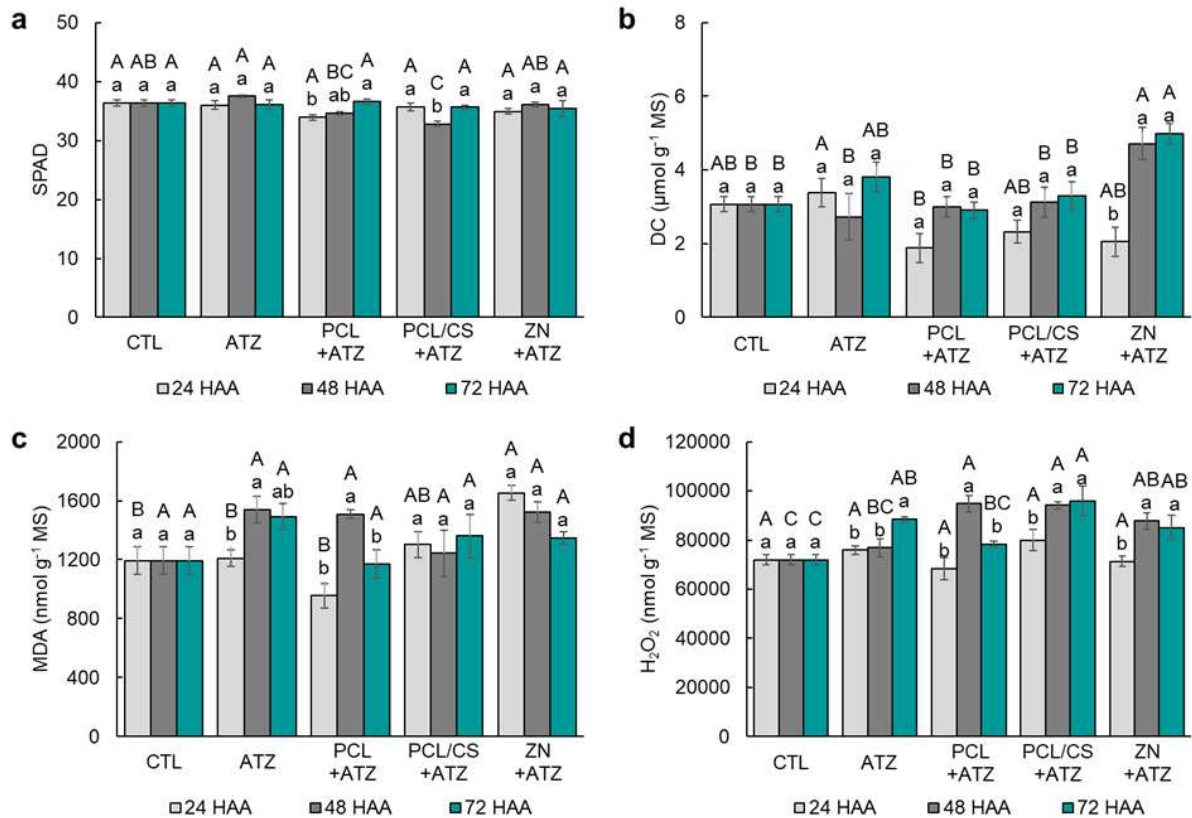
observada diferença na quantidade de dienos conjugados, sendo registrado um aumento de 130% de 48 para 72 HAA.

Para a quantidade de malondialdeído (MDA), foi observada diferença entre as plantas aplicadas com ZN+ATZ, ATZ, PCL+ATZ e o CTL as 24 HAA (Figura 7c). Nessa avaliação, a quantidade de MDA nas folhas das plantas aplicadas com ZN+ATZ foi 38,4% maior que o CTL, e 36,6% e 73% acima daquelas aplicadas com ATZ e PCL+ATZ, respectivamente. Nessa avaliação, apenas o tratamento ZN+ATZ diferiu do CTL. Nos tempos de 48 e 72 HAA, não houve diferença entre os tratamentos para a quantidade de MDA encontrada nas folhas das plantas de milho. Quanto aos tempos de aplicação, em folhas que receberam aplicação de ATZ, ocorreu um pico na quantidade de MDA as 48 HAA, com aumento de 27,2% em relação a 24 HAA e redução de 2,9% para as 72 HAA. Assim também ocorreu nas plantas aplicadas com PCL+ATZ, um pico na quantidade de MDA das folhas as 48 HAA, 57,9% de aumento em relação a 24 HAA e 22,5% de redução para as 72 HAA. Para as plantas aplicadas com PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ não ocorreu diferença na quantidade de MDA entre os tempos.

A quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas das plantas de milho não diferiu entre os tratamentos às 24 HAA (Figura 7d). Porém, com 48 HAA, em folhas aplicadas com PCL+ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ a quantidade de H_2O_2 diferiu do CTL, sendo 31,8%, 31% e 22% maiores, respectivamente. Ainda, a quantidade de H_2O_2 encontrada nas folhas aplicadas com PCL+ATZ e PCL/CS+ATZ diferiram daquelas aplicadas com ATZ, sendo, respectivamente, 23,3% e 22,6% maiores. Nesse tempo, a quantidade de H_2O_2 em folhas aplicadas com ZN+ATZ foi intermediária entre as formulações ATZ e as baseadas em PCL. A quantidade de H_2O_2 encontrada nas folhas das plantas aplicadas com ATZ não diferiu das plantas CTL. Com 72 HAA, as quantidades de H_2O_2 em folhas das plantas aplicadas com ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ diferiram do CTL, ficando 23%, 33,1% e 18,4% acima, respectivamente. A quantidade de H_2O_2 nas folhas das plantas que receberam aplicação de PCL+ATZ foi semelhante ao CTL, ATZ e ZN+ATZ, e diferiu de PCL/CS+ATZ, sendo 18,2% menor. Quanto ao tempo de aplicação, a aplicação de ATZ elevou em 15,1% a quantidade de H_2O_2 ao chegar as 72 HAA. A aplicação de PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ levaram ao aumento da quantidade de H_2O_2 as 48 HAA, em 17,8% e 23,1%, respectivamente. Com a aplicação de PCL+ATZ, ocorreu um pico de quantidade de H_2O_2 as 48 HAA, com aumento de 38,8% em relação as 24 HAA, e

queda de 17,4% as 72 HAA.

Figura 7. (a) Índice SPAD, (b) quantidade de dienos conjugados (DC), (c) quantidade de malondialdeído (MDA) e (d) quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha^{-1} ; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.



Fonte: O próprio autor.

A atividade detoxificante da enzima glutationa S-transferase (GST) em folhas de plantas de milho com 24 HAA, de maneira geral, foi semelhante entre todos os tratamentos (Figura 8a). Contudo, nas folhas das plantas aplicadas com ZN+ATZ, a atividade de GST foi diferente das demais formulações, ficando 29,8%, 32,2% e 23,1% abaixo de ATZ, PCL+ATZ e PCL/CS+ATZ, respectivamente. Às 48

HAA, a atividade de GST em folhas aplicadas com ATZ diferiu daquelas aplicadas com PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ e do CTL, sendo, em mesma ordem, 38,6%, 22,9% e 36,2% maior. Nesse tempo, a atividade de GST nas folhas aplicadas com PCL+ATZ apresentou semelhanças tanto às demais formulações quanto ao tratamento CTL. Com 72 HAA, de maneira geral, a atividade de GST foi semelhante entre todos os tratamentos, com uma exceção, nas folhas das plantas aplicadas com ZN+ATZ diferiram do CTL, com atividade reduzida em 37,8%. Quanto ao comportamento após a aplicação das formulações, não houve diferença na atividade de GST entre os períodos de avaliação para as formulações PCL+ATZ e PCL/CS+ATZ (mantiveram-se estáveis). Já para a aplicação de ATZ, houve redução de 48 HAA para 72 HAA, com uma diferença de 36,8%. Em folhas de plantas aplicadas com ZN+ATZ ocorreu um pico de atividade de GST com 48 HAA, representado por um aumento de 35,5% em relação a 24 HAA, e queda significativa de 43,9% as 72 HAA.

Para a atividade da enzima Ascorbato Peroxidase (APX), não houve interação entre os fatores estudados (Figura 8b). Assim, independentemente do tempo de avaliação, a atividade de APX em folhas aplicadas com ZN+ATZ diferiu da atividade dos tratamentos CTL, ATZ e PCL/CS+ATZ por ser 36%, 28,6% e 26,1%, respectivamente, maior. A aplicação de PCL+ATZ resultou em atividade de APX semelhante nas folhas dos tratamentos PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ, todavia, diferiu do CTL, com uma atividade 20,1% maior. A atividade de APX nas folhas das plantas aplicadas com ATZ e PCL/CS+ATZ não diferiu das plantas CTL. Quanto aos tempos de avaliação, independente do tratamento, a menor atividade de APX em folhas de milho ocorreu as 48 HAA, representado por uma redução de 11,6% em relação a 24 HAA e 14,8% em relação as 72 HAA.

Para a atividade da enzima Catalase (CAT) com 24 HAA, de maneira geral, houve semelhança entre todos os tratamentos (Figura 8c). Contudo, uma exceção foi a diferença de atividade entre as plantas que receberam aplicação de ZN+ATZ das aplicadas com ATZ. Nessa situação, nas folhas aplicadas com ZN+ATZ apresentaram atividade 95,2% maior. Com 48 HAA, não houve diferença entre tratamentos para a atividade de CAT. Já as 72 HAA, a atividade da enzima CAT foi semelhante entre as folhas das plantas que receberam aplicação de PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ. Em folhas aplicadas com PCL/CS+ATZ, a atividade de CAT foi maior que dos demais tratamentos, e apresentou diferença de 174,3%, 90,7% e 76,9% sobre o CTL, ATZ e PCL+ATZ. A atividade de CAT foi semelhante entre as folhas aplicadas

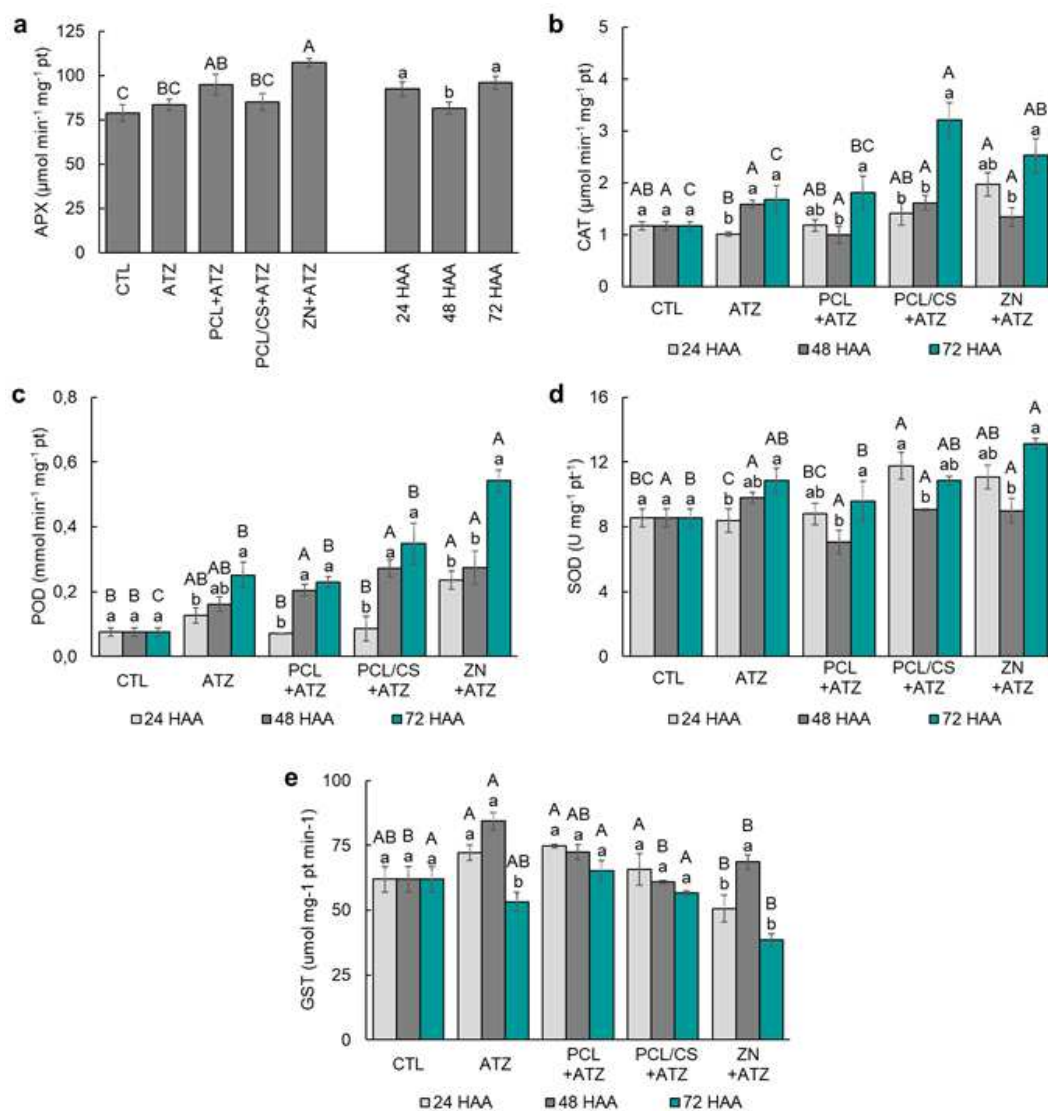
com ZN+ATZ, PCL+ATZ e PCL/CS+ATZ, todavia, ZN+ATZ diferiu do CTL e ATZ, com atividade 116,4% e 50,4% maior. Nesse tempo de avaliação, as atividades de CAT em folhas aplicadas com ATZ e PCL+ATZ não diferiram do CTL. Com o passar do tempo (de 24 HAA até 72 HAA), ocorreram aumentos da atividade de CAT em todas as plantas aplicadas, sendo o aumento de 66,9% para ATZ, 53,9% para PCL+ATZ, 128% para PCL/CS+ATZ e 28,1% em ZN+ATZ.

A atividade das enzimas Peroxidases (POD) nas folhas das plantas de milho, com 24 HAA, foi semelhante entre os tratamentos CTL, ATZ, PCL+ATZ e PCL/CS+ATZ (Figura 8d). Apenas a atividade de CAT em folhas aplicadas com ZN+ATZ diferiu do CTL, sendo 209% maior. A atividade de CAT nas folhas que receberam aplicação de ZN+ATZ ainda diferiu daquelas aplicadas com PCL+ATZ e PCL/CS+ATZ, sendo maior em 232% e 175%, respectivamente. Com 48 HAA, a atividade de POD nas folhas das plantas aplicadas com PCL+ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ diferiram da atividade das plantas CTL, de modo que apresentaram 169%, 258% e 261%, em mesma ordem, mais atividade. Nas folhas das plantas com aplicação de ATZ, a atividade de POD não diferiu do CTL nem dos demais tratamentos. Por fim, as 72 HAA, a maior atividade de POD nas folhas de milho ocorreu naquelas aplicadas com a formulação ZN+ATZ, que diferiu de todos os tratamentos. Assim, a atividade de CAT nas folhas das plantas aplicadas com ZN+ATZ foi 614% maior que o CTL e 116% maior que ATZ 136% maior que PCL+ATZ e 55,8% maior que PCL/CS+ATZ. Nesse tempo a atividade de POD nas folhas que receberam aplicação de ATZ, PCL+ATZ e PCL/CS+ATZ também diferiram do CTL, e apresentaram atividade 231%, 202% e 358% maior, respectivamente. A atividade de POD aumentou com o passar do tempo após a aplicação de todas as formulações. Entre os períodos de 24 HAA e 72 HAA, a diferença foi de 99,4%, 224%, 307% e 131% em ATZ, PCL+ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ, respectivamente.

Para a atividade de Superóxido Dismutase (SOD), as 24 HAA, apenas as plantas que receberam aplicação de PCL/CS+ATZ diferiram do CTL (Figura 8e). A atividade de SOD nas folhas aplicadas com PCL/CS+ATZ também diferiu daquelas aplicadas com ATZ e PCL+ATZ, assim, apresentaram atividade 37,8%, 40,6% e 34% maior que o CTL, ATZ e PCL+ATZ, respectivamente. A aplicação da formulação ZN+ATZ levou a atividade de SOD diferente apenas da aplicação de ATZ, 32,4% maior. A atividade de SOD nas plantas aplicadas com ATZ e PCL+ATZ não diferiu do CTL. Com 48 HAA, não houve diferença de atividade de SOD entre os tratamentos.

Na última avaliação, com 72 HAA, apenas a atividade de SOD em folhas aplicadas com ZN+ATZ diferiu em relação as plantas do CTL, com aumento de 53,8% na atividade. Em folhas aplicadas com PCL+ATZ, a atividade de SOD não diferiu das plantas CTL, enquanto naquelas aplicadas com ATZ e PCL/CS+ATZ a atividade de SOD foi semelhante tanto ao tratamento de maior atividade (ZN+ATZ) quanto ao de menor (CTL). Com o passar do tempo após aplicação, nas folhas das plantas de milho aplicadas com ATZ houve aumento crescente na atividade de SOD em 17% de 24 para 48 HAA seguido de 10,7% para 72 HAA. Para as demais formulações, houve um recuo na atividade de SOD as 48 HAA, em relação a 24 HAA, com ligeiro aumento no tempo de 72 HAA. Para plantas aplicadas com PCL+ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ as quedas foram de 19,6%, 23,1% e 19%, seguidas dos aumentos de 35,5%, 19,8% e 46,3%, respectivamente.

Figura 8. Atividade da (a) glutationa S-transferase (GST), (b) ascorbato peroxidase (APX), (c) catalase (CAT), (d) peroxidases (POD), e (e) superóxido dismutase (SOD) em folhas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Em (a), letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos independente do tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos, independente do tratamento, pelo teste Tukey $p \leq 0,05$. Em (b), (c) e (d), letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.



Fonte: O próprio autor.

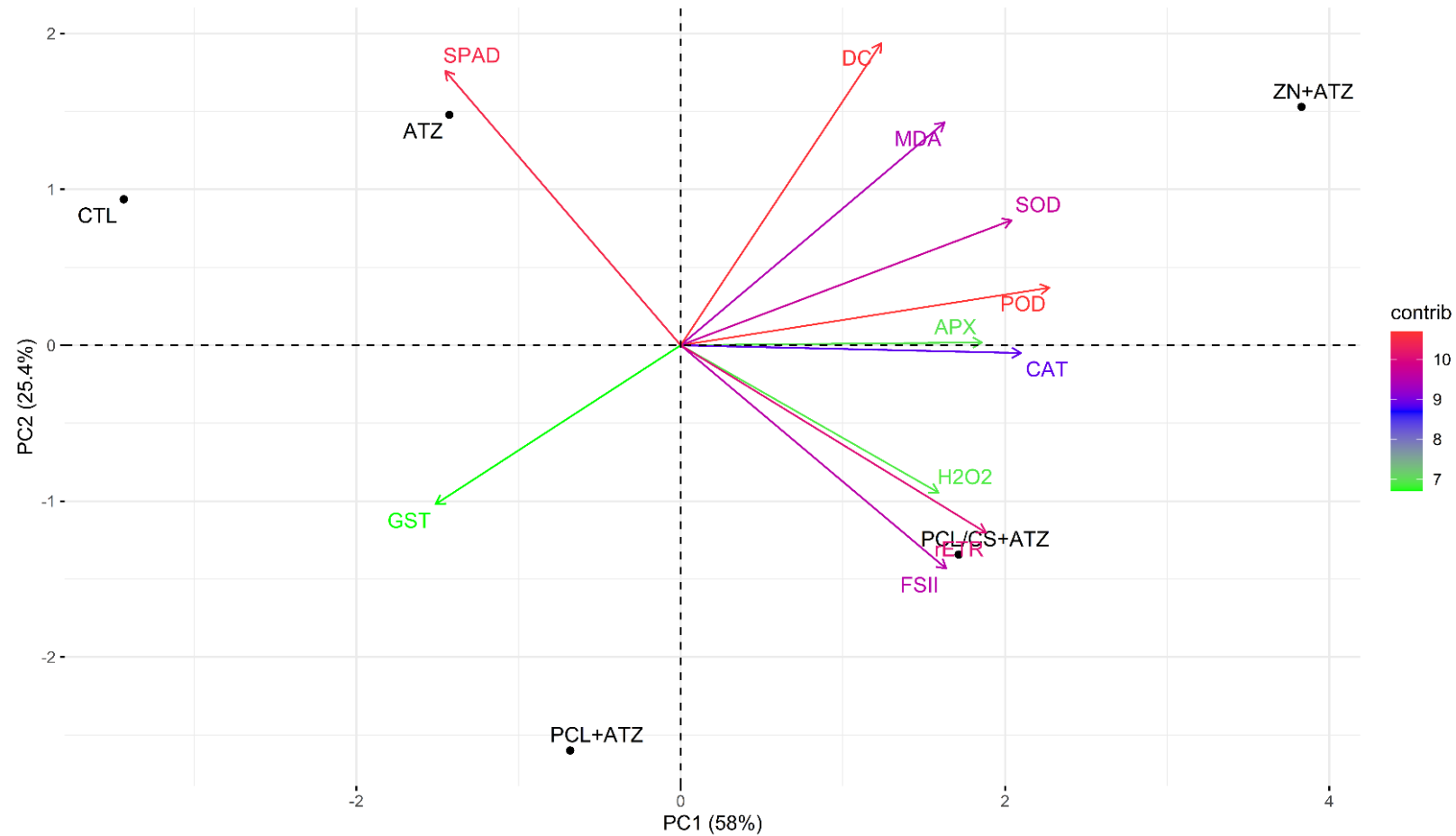
3.4.3. Análise de Componentes Principais e Mapa de Calor

Na Figura 9 está apresentada a análise de componentes principais para as variáveis avaliadas nas plantas de milho após a aplicação das formulações contendo atrazina, que compreende uma explicação de 83,4% dos resultados. Um dos destaques dessa análise foi a distribuição espacial das formulações, que ficaram alocadas em quadrantes diferentes, demonstrando o comportamento distinto da ação de cada uma delas. As variáveis atividade enzimática APX e GST, assim como a quantidade de H₂O₂ nas plantas foram as que menos contribuíram para a exploração dos resultados. Por outro lado, o índice SPAD, quantidade de dienos conjugados, atividade enzimática de POD e inibição de YII foram as variáveis de maior contribuição.

As variáveis atividade enzimática de APX, POD e SOD e as quantidades de MDA e dienos conjugados correlacionaram-se positivamente, com as maiores variações tendendo às plantas em que foi aplicada a formulação ZN+ATZ. Essas variáveis correlacionaram-se negativamente a atividade enzimática de GST, que também demonstrou ser menor nas plantas aplicadas com ZN+ATZ. No quadrante em que as plantas aplicadas com PCL/CS+ATZ ficaram alocadas, as variáveis de inibição do F_v/F_m e YII e a quantidade de H₂O₂ correlacionaram-se positivamente; e negativamente ao índice SPAD.

As plantas aplicadas com PCL+ATZ ficaram alocadas no quadrante que mostrou correlação positiva com a atividade enzimática de GST e negativa com a quantidade de dienos conjugados. Por fim, as plantas aplicadas com a formulação ATZ ocuparam o mesmo quadrante que as plantas CTL, e apresentaram correlação positiva ao índice SPAD e negativa as inibições de FSII, rETR e quantidade de H₂O₂.

Figura 9. Análise de componentes principais das variáveis fisiológicas e bioquímicas avaliadas em plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹.

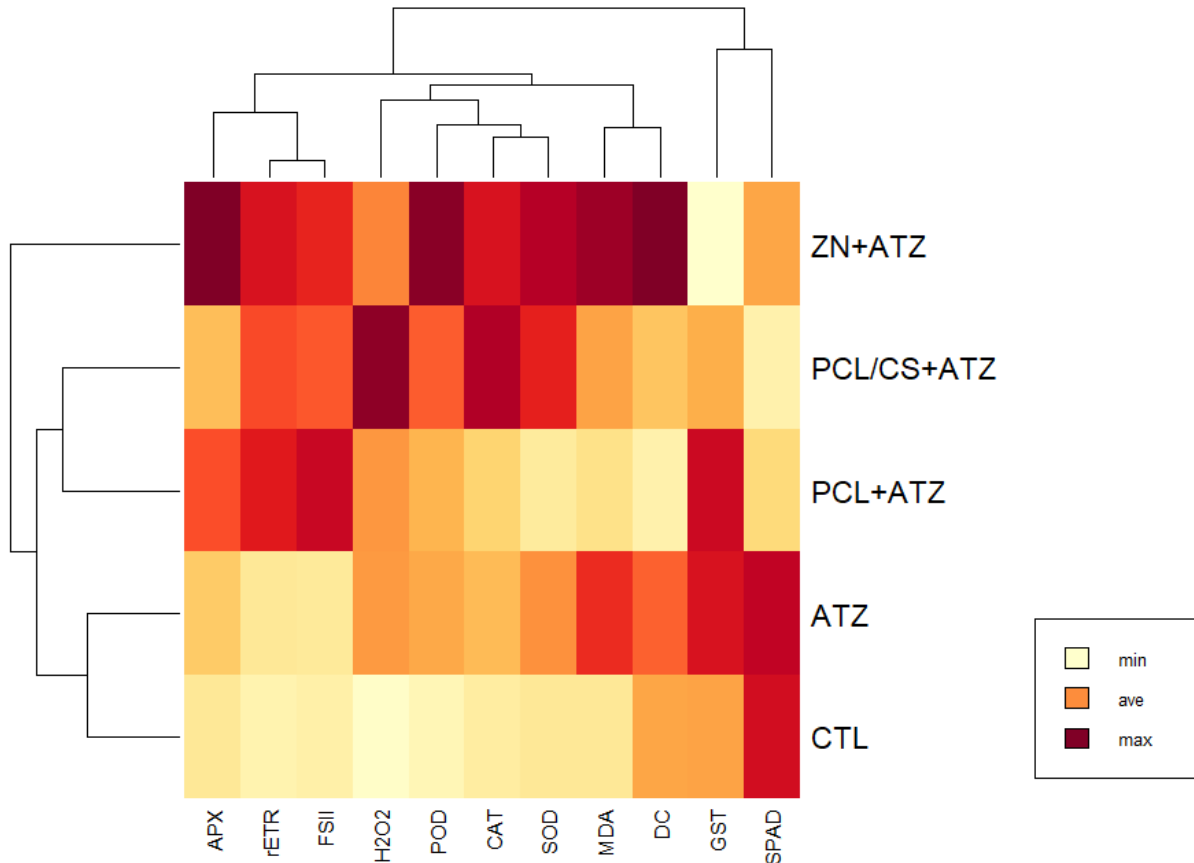


APX: Ascorbato peroxidase; CAT: catalase; DC: Dienos conjugados; FSII: inibição do fotossistema II; GST: Glutationa S-transferase; H2O2: peróxido de hidrogênio; MDA: Malondialdeído; POD: peroxidase; rETR: Inibição da rETR; SOD: Superóxido dismutase. SPAD: Índice SPAD. **Fonte:** O próprio autor.

No mapa de calor (Figura 10), é possível observar uma nítida diferença entre grupos quanto ao comportamento de cada tratamento. Nas plantas aplicadas com ZN+ATZ, são reforçados os resultados obtidos na análise de componentes principais. Para este tratamento, pode ser observada a correlação positiva com a atividade enzimática antioxidante e marcadores de estresse oxidativo, e correlação negativa com a atividade enzimática detoxificante de GST. Para o tratamento com PCL/CS+ATZ, apresentou correlação positiva com a maioria das variáveis avaliadas, exceto com índice SPAD. O tratamento PCL+ATZ apresentou correlação positiva principalmente com a inibição do FSII e rETR, e atividade das enzimas APX e GST, e correlação negativa com a atividade de SOD e a quantidade de dienos conjugados. Já o agrupamento do tratamento ATZ apresentou correlação positiva com índice SPAD, atividade de GST e quantidade de MDA. O grupo do tratamento CTL apresentou correlação positiva com o índice SPAD, e correlação negativa com as porcentagens de inibição do FSII. R ETR, atividade das enzimas antioxidantes e acúmulo de H_2O_2 e MDA.

Nos agrupamentos dos tratamentos com formulações de atrazina, pode ser observada uma correlação entre a atividade detoxificante de GST e a quantidade de dienos conjugados acumulados nas plantas. Quanto maior a atividade de GST, menor a quantidade de dienos conjugados acumulados nas plantas após a aplicação de atrazina (o inverso também é válido), de modo que nas plantas CTL, tanto atividade de GST quanto acúmulo de dienos são neutros.

Figura 10. Mapa de calor das variáveis fisiológicas e bioquímicas avaliadas em plantas de milho (*Zea mays*) sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹.



APX: Ascorbato peroxidase; CAT: catalase; DC: Dienos conjugados; FSII: inibição do fotossistema II; GST: Glutathiona S-transferase; H2O2: peróxido de hidrogênio; MDA: Malondialdeído; POD: peroxidase; rETR: Inibição da rETR; SOD: Superóxido dismutase; SPAD: Índice SPAD. **Fonte:** O próprio autor.

3.5. DISCUSSÃO

As três formulações de nanoatrazina proporcionaram as maiores porcentagens de inibição da atividade do FSII em plantas de milho. Todavia, o único efeito negativo encontrado nas variáveis morfológicas avaliadas foi proporcionado pela aplicação da nanoformulação ZN+ATZ na dose D1. Já a aplicação das nanoformulações sem ingrediente ativo levou ao estímulo ao crescimento das plantas, como o maior número de folhas expandidas, aumento de altura, diâmetro de caule e

acúmulo de biomassa. Resultados similares foram obtidos com a aplicação de nanocápsulas de PCL vazias (sem ingrediente ativo) em plantas de mostarda (*Brassica juncea*) e milho (OLIVEIRA et al., 2015a; OLIVEIRA et al., 2015b), onde não foram encontradas inibições de F_v/F_m , fotossíntese ou de massa seca de plantas.

A rápida recuperação da inibição do FSII resultante da aplicação de atrazina é uma característica encontrada nas plantas de milho. A redução de 25% da fotossíntese das plantas de milho pela aplicação de atrazina foi recuperada em apenas 21,4 horas (JACHETTA; RADOSEVICH, 1981). Como relatado em plantas de *Digitaria insularis* (espécie tolerante à atrazina assim como o milho), as nanocápsulas de PCL potencializaram a ação da atrazina, aumentando em cerca de 50% a inibição do FSII (SOUSA et al., 2020). A rápida penetração e, conseqüentemente, chegada da atrazina ao local de ação, e a maior entrada por aberturas como os estômatos e hidatódios potencializam a ação da atrazina na inibição do FSII (BOMBO et al., 2019; TAKESHITA et al., 2021). A liberação lenta e gradual do ingrediente ativo pelas nanocápsulas de zeína (KACSÓ et al., 2018), provavelmente tenham levado as porcentagens constantes de inibição do FSII e da rETR das plantas de milho.

Ao inibir o fluxo de elétrons que parte do FSII, os elétrons liberados pelos centros de reação passam a reagir com moléculas de O_2 , formando as espécies reativas de oxigênio (ERO's). As moléculas de oxigênio podem ser reduzidas ao potencial de oxigênio singleto (1O_2) ou radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e, se somado a dois átomos de H^+ , peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LIMA; ABDALLA, 2001). Ou ainda, a molécula de H_2O_2 pode ser convertida em radical hidroxila ($^{\cdot}OH$), de alta reatividade e potencial de dano oxidativo (MATTOS et al., 2003). A potencialização da inibição do FSII por nanoatrazina também resultou em maior quantidade de H_2O_2 gerada antecipadamente à ação da atrazina convencional. Plantas que receberam aplicação de PCL+ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ apresentaram, às 48 HAA, níveis de H_2O_2 encontrados em plantas tratadas com ATZ apenas às 72 HAA. A maior quantidade de dienos conjugados encontrados em plantas tratadas com ZN+ATZ possivelmente esteja ligada ao período prolongado de inibição do FSII nas plantas tratadas com essa formulação. Os dienos conjugados são radicais resultantes do ataque de ERO's ao grupo metileno dos ácidos graxos poli-insaturados de membranas no processo de peroxidação lipídica (LIMA, ABDALLA, 2001).

As quantidades de MDA encontradas nas folhas das plantas de milho após a aplicação de ATZ, PCL+ATZ e ZN+ATZ, maiores que as do CTL, também

sinalizam a ocorrência da peroxidação lipídica e consequente danos fisiológicos às plantas. O MDA é um composto formado como produto secundário da peroxidação lipídica, durante a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (LIMA, ABDALLA, 2001). Essa molécula apresenta tempo de meia vida de 60 minutos, podendo ser rapidamente metabolizado durante o processo de peroxidação lipídica (WEBER et al., 2004). A ocorrência de picos na quantificação de MDA nas folhas das plantas de milho provavelmente esteja relacionada ao processo de geração e degradação dessas moléculas, com particularidades do período de ocorrência do pico em relação à atividade herbicida de cada uma das formulações.

De modo geral, todas as formulações aplicadas promoveram alterações na atividade das enzimas com ação antioxidante em relação as plantas do CTL (sem aplicação). Em plantas de milho, a aplicação de atrazina tende a levar ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a APX, CAT, POD e SOD (LI et al., 2012; SILVA, 2019). A atividade de APX foi maior nas plantas que receberam aplicação de ZN+ATZ ou PCL/CS+ATZ, independentemente do tempo de avaliação após a aplicação. Ao passar do tempo de 24 até 72 HAA, a atividade de POD apresentou comportamento crescente para as quatro formulações aplicadas. De acordo com Barbosa et al. (2014), o aumento da atividade de POD tem relação direta com a severidade do estresse enfrentado pelas plantas. Em plantas de milho, o pico de atividade de POD já foi encontrado com até cinco dias após a aplicação de atrazina (AKBULUT; YIGIT, 2010). As enzimas APX e POD são peroxidases que podem atuar conjuntamente com a SOD, reduzindo as moléculas de H₂O₂ geradas após a dismutação; sendo que a APX utiliza o ascorbato como redutor, enquanto a POD utiliza compostos fenólicos (MITTLER, 2002; ASADA, 2006; LOCATO et al., 2010; BARBOSA et al., 2014).

Para a atividade de CAT, as quatro formulações promoveram aumentos de atividade entre as 24 e 72 HAA, entretanto, as maiores atividades foram encontradas nas plantas aplicadas com PCL/CS ou ZN+ATZ às 72 HAA. A inibição da atividade da enzima CAT em plantas da espécie *Pennisetum americanum* foi relatada como resultante do aumento da concentração de atrazina aplicada (ERINLE et al., 2017). Todavia, o aumento da atividade de CAT também está associado a condições severas de estresse oxidativo, com concentrações elevadas de H₂O₂ (DUBEY, 2011). As quatro formulações foram aplicadas em mesma dose (2000 g de atrazina ha⁻¹), assim como houve aumento da quantidade de H₂O₂ nas plantas dos quatro

tratamentos. Desta forma, o aumento da atividade de CAT pode estar relacionado tanto a redução da quantidade de atrazina não metabolizada presente nas plantas com o passar do tempo, quanto ao aumento da quantidade de H₂O₂ ocorrido.

Quanto à atividade de SOD, nas plantas aplicadas com ATZ, houve um crescente de atividade entre 24 e 72 HAA, enquanto em plantas que receberam a aplicação das formulações PCL+ATZ, PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ houve um declínio de atividade as 48 HAA. Contudo, as 72 HAA a atividade de SOD nestas plantas foi reestabelecida em nível semelhante ou até maior que o encontrado as 24 HAA. Na avaliação final, as 72 HAA, a maior atividade de SOD foi observada em plantas aplicadas com ZN+ATZ. Apesar de não quantificados no presente trabalho, as formulações de nanoatrazina parecem gerar uma maior quantidade de O₂^{•-} nas plantas. O aumento da quantidade de O₂^{•-} foi encontrado em plantas de alface (*Lactuca sativa*) em exposição prolongada à PCL+ATZ via solo (WU et al., 2021). A SOD é uma metalo-enzima que atua na primeira linha de defesa no combate ao estresse oxidativo em plantas, responsável por catalisar a dismutação de O₂^{•-} em H₂O₂ (MITTLER, 2002; BHATTACHARJEE, 2010; MOFEED; MOSLEH, 2013; BARBOSA et al., 2014).

Em plantas das espécies *Setaria itálica*, *Pennisetum americanum* e *Arabidopsis thaliana*, doses crescentes de atrazina inibiram a expressão dos genes da enzima SOD (RAMEL et al., 2009; ERINLE et al., 2018; SHER et al., 2021). Contudo, em plantas de arroz (*Oryza sativa*) a atividade de SOD foi aumentada com a exposição a atrazina (ZHANG et al., 2014). Em plantas de alface (*L. sativa*) que cresceram em solo contendo PCL+ATZ a atividade de APX, CAT, POD e SOD foi maior que naquelas que cresceram em solo contendo ATZ em mesma dose (WU et al., 2021). O aumento da atividade de SOD corrobora ao aumento da atividade das demais enzimas antioxidantes com ação de eliminação de H₂O₂. Assim como o maior reflexo sobre os marcadores de estresse oxidativo, possivelmente, a maior duração da inibição do FSII gerada pela aplicação de ZN+ATZ também tenha resultado em maior nível de estresse oxidativo nas plantas de milho.

A aplicação de atrazina nas plantas de milho, independentemente da formulação, parece causar um estresse oxidativo transitório (logo após a aplicação). Contudo, isso não interferiu de forma negativa no crescimento das plantas avaliado até os 30 dias após aplicação. A toxicidade causada por atrazina pode estar relacionada à eficiência e atividade do sistema de inativação e/ou eliminação de ¹O₂

(RAMEL et al., 2009). Foi sugerido que a peroxidação lipídica é um processo contínuo, com alta rotatividade e autocatálise (MUELLER, 2004). Deste modo, supõe-se que enquanto as plantas aplicadas com ATZ, PCL+ATZ e PCL/CS+ATZ apresentaram recuperação da atividade do FSII e o melhor aproveitamento da energia luminosa captada com as reações luminosas da fotossíntese, as plantas tratadas com ZN+ATZ ainda enfrentavam a condição de estresse oxidativo em resposta à inibição da atividade do FSII e, conseqüentemente, peroxidação lipídica.

A geração de estresse oxidativo e ativação de mecanismos de defesa antioxidante foram menos significativos nas plantas aplicadas com ATZ, no qual foi encontrada a maior atividade detoxificante via GST, registrada as 48 HAA. O inverso ocorreu após a aplicação de ZN+ATZ, com aumento, principalmente, dos mecanismos de defesa antioxidante e a redução da atividade da GST. As plantas apresentam capacidade de detoxificação de compostos orgânicos abióticos (xenobióticos), como os herbicidas, antes de sua ativação metabólica (COLE, 1994; RIECHERS, KREUZ e ZHANG, 2010). O ápice do sistema de detoxificação em plantas de milho ocorre nos estádios V₃ e V₄, com capacidade de rápida metabolização de atrazina, com a conversão de até 88% do ingrediente ativo aplicado via foliar em 12 horas após aplicação (BOYDSTON; SLIFE, 1986).

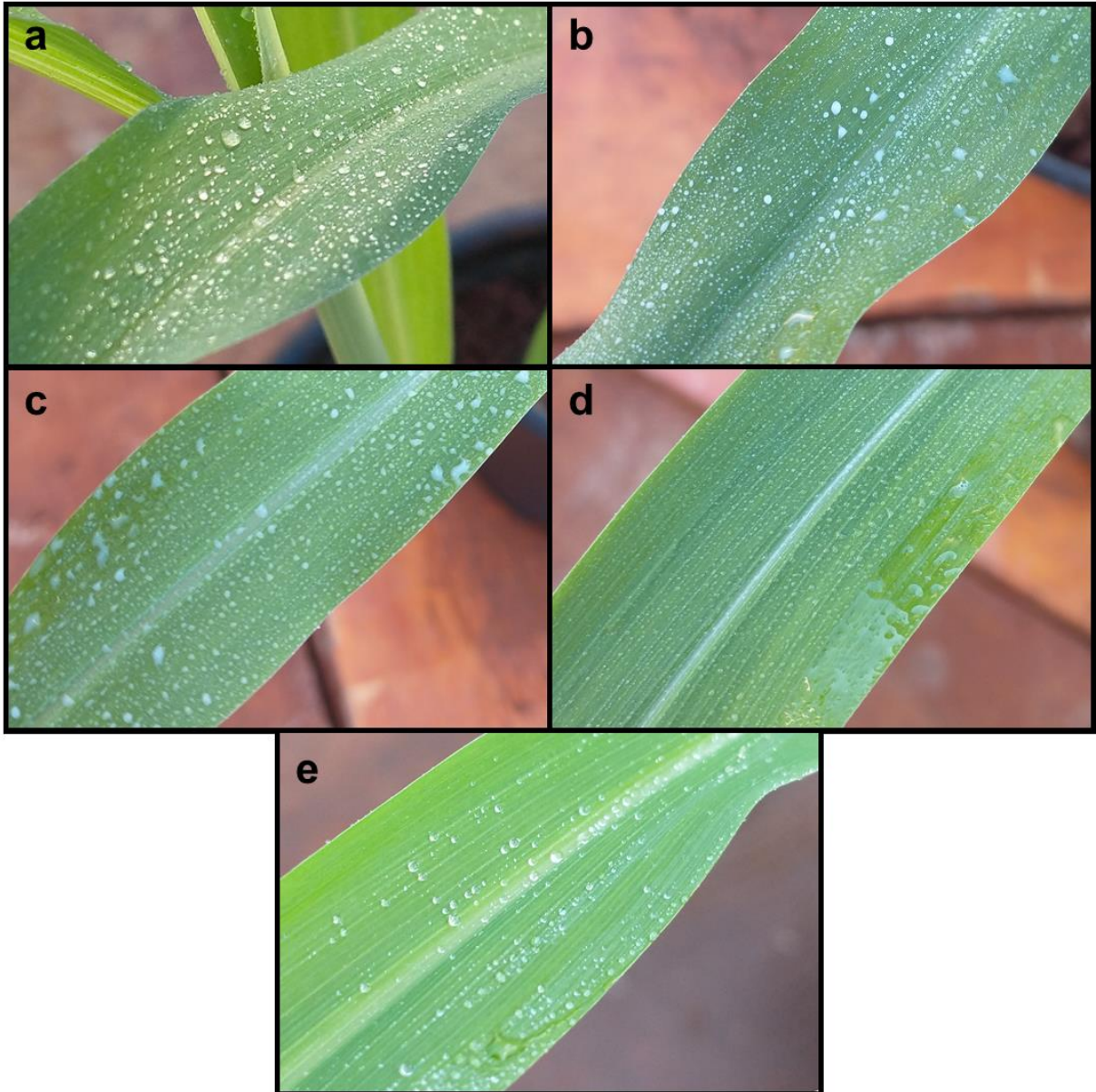
Nesse sentido, quando a formulação ATZ foi aplicada nas plantas de milho, ocorreu a ativação do mecanismo de detoxificação como meio de defesa, evitando a ativação metabólica da molécula de atrazina e a conseqüente inibição do FSII. Já com a aplicação de ZN+ATZ e das demais formulações de nanoatrazina, as plantas de milho pareceram não reconhecer a molécula herbicida, favorecendo a sua chegada ao local de ação, ativação metabólica e inibição do FSII, encontrando o sistema enzimático antioxidante como meio de defesa ao estresse abiótico causado. Assim, as alterações promovidas no modo de ação da atrazina após a sua aplicação nas plantas de milho, provavelmente, estão relacionadas à maneira em que ocorre a entrega do ingrediente ativo a plantas e a sua chegada ao local de ação.

As nanopartículas, de maneira geral, interagem com a superfície das folhas, de forma que as cargas elétricas, tamanho e matriz polimérica influenciam diretamente na dinâmica de absorção (ASLANI et al., 2014; YU et al., 2017; AVELLAN et al., 2021; ZHANG et al., 2021; KRÄHMER et al., 2021). Em plantas de milho (*Z. mays*), foi observado que nanopartículas de carga positiva têm maior facilidade de chegada até os cloroplastos em comparação às de carga negativa, assim como têm

entrada facilitada pelos estômatos (HU et al., 2020). A camada externa das folhas é formada por cera epicuticular, uma formação de hidrocarbonetos de cadeia longa com grupos funcionais como álcoois, aldeídos e ácidos graxos, que confere o aspecto de cargas elétricas superficiais negativas (JETTER et al., 2006)

A formulação PCL+ATZ é composta por nanocápsulas de carga elétrica (potencial zeta) negativa, no entorno de -30 mV, enquanto as formulações PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ são compostas por nanocápsulas de potencial zeta positivo, aproximadamente 25 mV e 12 mV, respectivamente. A característica de potencial zeta positivo da nanocápsulas da formulação PCL/CS+ATZ é adquirida após o revestimento. A quitosana é um biopolímero derivado da quitina, encontrado de forma abundante no planeta (ZARGAR, ASGHARI, DASHTI, 2015; NEGM et al., 2020). Sua natureza catiônica (com origem nos radicais amino presentes nas moléculas) é capaz de converter o potencial zeta das nanocápsulas de negativo para positivo (NEGM et al., 2020; PRADO-AUDELO et al., 2020). As interações hidrofóbicas e hidrofílicas também interferem na adesão e absorção (AVELLAN et al., 2019; ZHANG et al., 2021). As nanocápsulas de PCL+ATZ apresentam caráter anfifílico, com maior ângulo de contato e menor molhabilidade das folhas (TAKESHITA et al., 2021). Já a característica de potencial positivo das nanocápsulas de PCL/CS+ATZ e ZN+ATZ pode favorecer a adesão à superfície das folhas, que apresentam carga negativa (JETTER, KUNST, SAMUELS, 2006; YU et al., 2017). O comportamento da interação das formulações pela deposição das gotas nas folhas das plantas de milho após a aplicação de ATZ, PCL+ATZ, PCL/CS+ATZ, ZN+ATZ e água podem ser observadas na Figura 11.

Figura 11. Deposição das gotas da calda de aplicação de atrazina nas formulações **(a)** convencional (ATZ) e nanoencapsulada por **(b)** poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ), **(c)** poli(ϵ -caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou **(d)** zeína (ZN+ATZ) e **(e)** água sobre folhas de plantas de milho (*Zea mays*) no momento da aplicação.



Fonte: O próprio autor.

A aplicação de PCL/CS+ATZ retardou o efeito negativo de PCL+ATZ sobre o índice SPAD das folhas de milho. Enquanto em plantas aplicadas com PCL+ATZ houve redução do índice logo as 24 HAA, nas plantas aplicadas com PCL/CS+ATZ houve uma redução do índice SPAD apenas as 48 HAA. Todavia, o índice SPAD das plantas de ambos tratamentos foram reestabelecidos ao nível do

CTL ao chegar as 72 HAA. Como diferencial, a quitosana presente na formulação PCL/CS+ATZ pode ajudar na mitigação dos efeitos negativos dos estresses abióticos (HIDANGMAYUM et al., 2019). Nanocápsulas de PCL vazias (sem ingrediente ativo) foram tóxicas às sementes de mostarda (*B. juncea*), reduzindo a germinação e aumentando o número de plântulas anormais (PREISLER et al., 2022). Por outro lado, sinais de fitotoxicidade por nano-quitosana já foram relatados, como a inibição da germinação de sementes e o comprometimento do desenvolvimento inicial de plantas de milho (*Z. mays*), nabo (*Brassica rapa*), ervilha (*Pisum sativum*) e pimenta (*Capsicum annuum*) (NAKASATO et al., 2017; ASGARI-TARGHI, IRANBAKHS, ARDEBILI, 2018).

As nanocápsulas de zeína vazias não foram tóxicas para plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), sem redução de massas de parte aérea ou raízes (OLIVEIRA et al., 2018). Camundongos (*Mus musculus*) que receberam como tratamento nanocápsulas de zeína vazias não desenvolveram alterações histopatológicas nem sintomas de genotoxicidade (ARAÚJO et al., 2020). As nanocápsulas de zeína têm sido testadas em grande escala combinadas com medicamentos, principalmente pela sua baixa ou nula citotoxicidade (JASKI et al., 2022).

Anteriormente, foi relatado por SOUSA (2020) que a aplicação de 1000 e 2000 g i.a. ha⁻¹ de atrazina nanoencapsulada por PCL prejudicaram o crescimento e desenvolvimento das plantas de milho a campo. Nessa condição, foi exigido um maior volume de calda de aplicação para atingir a quantidade de ingrediente ativo demandado pela área de aplicação, o que pode ter sido prejudicial às plantas. A partir de uma observação durante a realização do segundo experimento, e posterior teste (dados não apresentados), foi constatado que a fitotoxicidade causada às plantas de milho muito provavelmente seja devido ao acúmulo da calda de aplicação do cartucho das plantas (ponto de crescimento), com manifestação de sintomas visuais aos 10 dias após aplicação.

No presente estudo, pode ser observado que os polímeros PCL, PCL com revestimento de quitosana e zeína (utilizados no processo de nanoencapsulação), não comprometeram o crescimento das plantas de milho em até 30 dias após a aplicação. Desse modo, a utilização desses polímeros não apresenta ser um fator limitante para a continuidade do desenvolvimento dos nanossistemas carreadores de atrazina. Quando combinados à atrazina, apesar da maior inibição do

FSII e rETR causadas, as plantas de milho suportaram o processo de recuperação e não interromperam o seu crescimento. De maneira geral, pode ser observado nas plantas que receberam a aplicação das formulações de nanoatrazina maiores sinais bioquímicos de estresse oxidativo resultantes da ação da atrazina, contudo, também foram desencadeadas respostas enérgicas de combate ao estresse abiótico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. In: Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**. COLOWICK, S.P; KAPLAN, N.O. (Eds). v.105. Florida: Acad. Press; 1984. p.114–121.

AKBULUT, G.B.; YIGIT, E. The changes in some biochemical parameters in *Zea mays* cv. “MarthaF1” treated with atrazine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.1429-1432, 2010.

ALEXIEVA, V; SERGIEV, I; MAPELLI, S; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v.24, n.12, p.1337-1344, 2001.

ALVES, B.M.; CARGNELUTTI FILHO, A.; BURIN, C.; TOEBE, M.; SILVA, L.P. Divergência genética de milho transgênico em relação à produtividade de grãos e à qualidade nutricional. **Ciência Rural**, v.45, n.5, p.884-891, 2015.

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, n.4, p.1247-1257, 1995.

ARAÚJO, J.T.C.; LIMA, L.A.; VALE, E.P.; MARTIN-PASTOR, M.; LIMA, R.A.; SILVA, P.G.B.; SOUSA, F.F.O. Toxicological and genotoxic evaluation of anacardic acid loaded-zein nanoparticles in mice. **Toxicology Reports**, v.7, p.1207-1215, 2020.

ARTUZO, F.D.; FOGUESATTO, C.R.; MACHADO, J.A.D.; OLIVEIRA, L.; SOUZA, A.R.L. O potencial produtivo brasileiro: uma análise histórica da produção de milho. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**. v.12, n.2, p.515-540, 2019.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v.141, p.391-396, 2006.

ASGARI-TARGHI, G.; IRANBAKHSH, A.; ARDEBILI, Z.O. Potential benefits and phytotoxicity of bulk and nano-chitosan on the growth, morphogenesis, physiology, and micropropagation of *Capsicum annuum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.127, p.393-402, 2018.

ASLANI, F.; BAGHERI, S.; JULKAPLI, N.M.; JURAIMI, A.S.; HASHEMI, F.S.G.; BAGHDADI, A. Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth: An Overview. **The Scientific World Journal**, v.2014, p.1-28, 2014.

AVELLAN, A.; YUN, J.; MORAIS, B.P.; CLEMENT, E.T.; RODRIGUES, S.M.; LOWRY, G.V. Critical review: Role of inorganic nanoparticle properties on their foliar uptake and in planta translocation. **Environmental Science & Technology**, v.55, n.20, p.13417-13431, 2021.

BAKER, N.R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.89-113, 2008.

BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINA, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p.453-460, 2014.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.1-30.

BOMBO, A.B.; PEREIRA, A.E.S.; LUSA, M.G.; MEDEIROS OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R.; JESUS, M.B.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F.; MAYER, J.L.S. A mechanistic view of interactions of a nanoherbicide with target organism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.67, n.16, p.4453-4462, 2019

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; CHANCE, B. Low-level chemi-luminescence of the lipoxygenase reaction. **Photobiochemistry and photobiophysics**, v.1, p. 175–182, 1980.

BOYDSTON, R.A.; SLIFE, F.W. Alteration of Atrazine Uptake and Metabolism by Tridiphane in Giant Foxtail (*Setaria faberi*) and Corn (*Zea mays*). **Weed Science**, v.34, n.6, p.850-858, 1986.

CAMEJO, G.; WALLIN, B; ENOJÄRVI, M. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: AMSTRONG, D. (Ed.). **Free Radical and Antioxidants Protocols**. Human Press, Molndal, 1998, p.377–387.

CATANEO, A.C.; DÉSTRO, G.F.G.; FERREIRA, L.C.; CHAMMA, K.L.; SOUSA, D.C.F. Atividade de glutathione s-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.307-312, 2003.

CHERIFI, M.; RAVETON, M.; PICCIOCCHI, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Atrazine metabolism in corn seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.39, p.665–672, 2001.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, v.10, n.12, 2023.

CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JUNIOR., R.S.I; CAVALIERI, S.D.; ARANTES, J.G.Z.; ALONSO, D.G.; ROSO, A.C.; COSTA, J.M.V. Interação entre sistemas de manejo e de controle de plantas daninhas em pós-emergência afetando o desenvolvimento e a produtividade do milho. **Planta daninha**, v.25, n.3, p.513-520, 2007.

COLE, D.J. Detoxification and Activation of Agrochemicals in Plants. **Pesticide Science**, v.42, n.3, p.209-222, 1994.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. p.178-203.

ERINLE, K.O.; JIANG, Z.; MA, B.; UR-REHMAN, K.; SHAHLA, A.; ZHANG, Y. Physiological and molecular responses of pearl millet seedling to atrazine stress. **International Journal of Phytoremediation**, v.20, n.4, p.343-351, 2018.

EVANS JUNIOR, A.F.; O'BRIEN, S.R.; MA, R.; HAGER, A.G.; RIGGINS, C.W.; LAMBERT, K.N.; RIECHERS, D.E. Biochemical characterization of metabolism-based atrazine resistance in *Amaranthus tuberculatus* and identification of an expressed GST associated with resistance. **Plant Biotechnology Journal**, v.15, n.10, p.1238-1249, 2017.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superóxido dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, n.2, p.309-314, 1977.

GRILLO, R.; DOS SANTOS, N.Z.P.; MARUYAMA, C.R.; ROSA, A.H.; DE LIMA R.; FRACETO, L.F. Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v.231, p.1-9, 2012.

HIDANGMAYUM, A.; DWIVEDI, P.; KATIYAR, D.; HEMANTARANJAN, A. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.25, n.2, p.313–326, 2019.

HU, P.; AN, J.; FAULKNER, M.M.; WU, H.; LI, Z.; TIAN, X.; GIRALDO, J. P. Nanoparticle Charge and size control foliar delivery efficiency to plant cells and organelles. **ACS Nano**, v.14, n.7, p.7970–7986, 2020.

JACHETTA, J.J.; RADOSEVICH, S.R. Enhanced Degradation of Atrazine by Corn (*Zea mays*). **Weed Science**, v.29, n.1, p.37-44, 1981.

JASKI, A.C.; SCHMITZ, F.; HORTE, R.P.; CADORIN, L.; SILVA, B.J.G.; ANDREAUS, J.; PAES, M.C.D.; RIEGEL-VIDOTTI, I.C.; ZIMMERMANN, L.M. Zein - a plant-based material of growing importance: New perspectives for innovative uses. **Industrial Crops & Products**, v.186, n.e.115250, 2022.

JETTER, R.; KUNST, L.; SAMUELS, A. L. Composition of Plant Cuticular Waxes. In: **Biology of the Plant Cuticle**. 1st ed. Annual Plant Reviews online v. 23; Blackwell Publishing Ltd, 2006; pp 145-175.

KACSO, T.; NEAGA, I.O.; ERINCZ, A.; ASTETE, C.E.; SABLIOV, C.M.; OPREAN, R.; BODOKI, E. Perspectives in the design of zein-based polymeric delivery systems with programmed wear down for sustainable agricultural applications. **Polymer Degradation and Stability**, v.155, p.130-135, 2018.

KNÖRZER, O.C.; DURNER, J.; BÖGER, P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.97, p.388-396, 1996.

KOZLOWSKI, L.A.; KOEHLER, H.S.; PITELLI, R.A. Épocas e extensões do período de convivência das plantas daninhas interferindo na produtividade da cultura do milho (*Zea mays*). **Planta daninha**, v.27, n.3, p.481-490, 2009.

KRÄHMER, H.; WALTER, H.; JESCHKE, P.; HAAF, K.; BAUR, P.; EVANS, R. What makes a molecule a pre- or a post-herbicide – how valuable are physicochemical parameters for their design? **Pest Management Science**, v.77, n.11, p.4863-4873, 2021.

LI, X.; WU, T.; HUANG, H.; ZHANG, S. Atrazine accumulation and toxic responses in maize *Zea mays*. **Journal of Environmental Sciences**, v.24, n.2, p.203–208, 2012.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.

LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.45-64.

MATTOS, I.L.; SHIRAISHI, K.A.; BRAZ, A.D.; FERNANDES, J.R. Peróxido de hidrogênio: Importância e determinação. **Química Nova**, v.26, n.3, p.373-380, 2003.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.9, p.405-410, 2002.

MOFEED, J.; MOSLEH, Y.Y. Toxic responses and antioxidative enzymes activity of *Scenedesmus obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine, alone and in mixture. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.95, p.234-240, 2013.

MUELLER, M.J. Archetype signals in plants: the phytoprostanes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.441–448, 2004.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v.22, n.5, p.867-880, 1981.

NAKASATO, D.Y.; PEREIRA, A.E.; OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F. Evaluation of the effects of polymeric chitosan/tripolyphosphate and solid lipid nanoparticles on germination of *Zea mays*, *Brassica rapa* and *Pisum sativum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.142, p.369-374, 2017.

NEGM, N.A.; HEFNI, H.H.H.; ABD-ELAAL, A.A.A.; BADR, E.A.; KANA, M.T.H.A. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.152, p.681-702, 2020.

OLIGINI, K.F.; SALOMÃO, E.C.; BATISTA, V.V.; LINK, L.; ADAMI, P.F.; SARTOR, L.R. Produtividade de milho consorciado com espécies forrageiras no sudoeste do Paraná. **Agrarian**, v.12, n.46, p.434-442, 2019.

OLIVEIRA, H.C.; STOLF-MOREIRA, R.; MARTINEZ, C.B.R.; GRILLO, R.; DE JESUS, M.B.; FRACETO, L.F. (2015a). Nanoencapsulation enhances the post-

emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. **PLoS ONE**, v.10, n.7, 2015.

OLIVEIRA, H.C.; STOLF-MOREIRA, R.; MARTINEZ, C.B.R; SOUSA, G.F.M.; GRILLO, R.; DE JESUS, M.B.; FRACETO, L.F. (2015b). Evaluation of the side effects of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules containing atrazine towards maize plants. **Frontiers in Chemistry**, v.3, n.61, 2015.

OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R.; PEREIRAA, A.E.S.; PASQUOTO, T.; LIMA, R.; GRILLO, R.; ANDRADE, D.J.; SANTOS, F.A.; FRACETO, L.F. Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, p.1330-1340, 2018.

PARKINSON, S.J.; TUNGSIRISURP, S.; SIKDER, A.; LYNCH, I.; O'REILLY, R.K.; NAPIER, R.M. 2022. "Polymer nanoparticles pass the plant interface". Preprint, submetido a **bioRxiv** em 24 de março de 2022.

PEIXOTO, H.P.P.; CAMBRAIA, J.; SAN'T ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, A.M. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-43, 1999.

PRADO-AUDELO, M.L.D.; CABALLERO-FLORÁNA, I.H.; SHARIFI-RAD, J.; MENDOZA-MUÑOZ, N.; GONZÁLEZ-TORRES, M.; URBÁN-MORLÁN, Z.; FLORÁN, B.; CORTES, H.; LEYVA-GÓMEZA, G. Chitosan-decorated nanoparticles for drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.59, n.e.101896, 2020.

PREISLER, A.C.; CARVALHO, L.B.; SARAIVA-SANTOS, T.; VERRI JUNIOR, W.A.; MAYER, J.L.S.; FRACETO, L.F.; DALAZEN, G.; OLIVEIRA, H.C. Interaction of nanoatrazine and target organism: Evaluation of fate and photosystem II inhibition in hydroponically grown mustard (*Brassica juncea*) plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.70, n.25, p.7644-7652, 2022.

RAMEL, F.; SULMON, C.; BOGARD, M.; COUÉE, I.; GOUESBET, G. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. **BMC Plant Biology**, v.9, n.28, 18p. 2009.

RIECHERS, D.E.; KREUZ, K.; ZHANG, Q. Detoxification without intoxication: herbicide safeners activate plant defense gene expression. **Plant Physiology**, v.153, n.1, p.3-13, 2010.

RODRIGUES, L.S.; TEIXEIRA, O.S.; ALVES FILHO, D.C.; BRONDANI, I.L.; MACHADO, D.S.; PEREIRA, L.B.; ADAMS, S.M.; WEISE, M.S. Milho tolerante ao glifosato: interação entre herbicidas pós-emergentes e época de controle das plantas daninhas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.18, n.2, p.168-177, 2019.

SHER, A.; MAQBOOL, M.M.; IQBAL, J.; NADEEM, M.; FAIZ, S.; NOOR, H.; HAMID, Y.; YUAN, X.; PINGYI, G. The Growth, physiological and biochemical response of foxtail millet to atrazine herbicide. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.28, p.6471-6479, 2021.

SILVA, H.J.T.; SANTOS, P.F.A.; NOGUEIRA JUNIOR, E.C.; VIAN, C.E.F. Aspectos técnicos e econômicos da produção de etanol de milho no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v.29, n.4, p.142-159, 2020.

SILVA, L.S.; NAKAYAMA, F.T.; SANTOS, G.X.L.; CORDEIRO JUNIOR, P.S.; DONÁ, S.; FINOTO, E.L.; BRANDÃO, R.P.; RODRIGUES, L.; VITORINO, R. Produtividade de cultivares de milho em Adamantina, região da Nova Alta Paulista. **Nucleus**, Edição especial, p.137-142, 2019.

SOUSA, B.T. **Eficiência de atrazina nanoencapsula comparada à convencional aplicadas em campo**. 2020. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

SOUSA, B.T.; PEREIRA, A.E.S.; FRACETO, L.F.; OLIVEIRA, H.C.; DALAZEN, G. Effectiveness of nanoatrazine in post-emergent control of the tolerant weed *Digitaria insularis*. **Journal of Plant Protection Research**, v.60, n.2, p.185-192, 2020.

SOUSA, G.F.M.; GOMES, D.G.; CAMPOS, E.V.R.; OLIVEIRA, J.L.; FRACETO, L.F.; STOLF-MOREIRA, R.; OLIVEIRA, H.C. Post-emergence herbicidal activity of nanoatrazine against susceptible weeds. **Frontiers in Environmental Science**, v.6, p.1-12, 2018.

TAKESHITA, V.; SOUSA, B.T.; PREISLER, A.C; CARVALHO, L.B.; PEREIRA, A.E.S.; TORNISIELO, V.L.; DALAZEN, G.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F. Foliar absorption and field herbicidal studies of atrazine-loaded polymeric nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v.418, n.e.126350, 2021.

USMAN, M.; FAROOQB, M.; WAKEEL, A.; NAWAZ, A.; CHEEMA, S.A.; REHMAN, H.; ASHRAF, I.; SANAUULLAH, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the Total Environment**, v.721, n.e. 137778, 2020.

VIJAYAKUMAR, M.D.; SURENDHAR, G.J.; NATRAYAN, L.; PATIL, P.P.; RAM, P.M.B.; PARAMASIVAM, P. Evolution and Recent Scenario of Nanotechnology in Agriculture and Food Industries. **Journal of Nanomaterials**, v.2022, n.e. 1280411, 2022.

WEBER, H.; CHETELAT, A.; REYMOND, P.; FARMER, E.E. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. **The Plant Journal**, v.37, p.877–888, 2004.

WU, J.; OMOKAWA, H.; HATZIOS, K.K. Glutathione S-Transferase Activity in Unsafened and Fenclorim-Safened Rice (*Oryza sativa*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.54, p.220–229, 1996.

WU, J; ZHAI, Y.; MONIKH, F.A.; ARENAS-LAGO, D.; GRILLO, R.; VIJVER, M.G.; PEIJNENBURG, J.G.M. The Differences between the Effects of a Nanoformulation and a Conventional Form of Atrazine to Lettuce: Physiological Responses, Defense Mechanisms, and Nutrient Displacement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.69, p.12527-12540, 2021.

YU, M.; YAO, J.; LIANG, J.; ZENG, Z.; CUI, B.; ZHAO, X.; SUN, C.; WANG, Y.; LIU, G.; CUI, H. Development of functionalized abamectin poly(lactic acid) nanoparticles with regulatable adhesion to enhance foliar retention. **RSC Advances**, v.7, p.11271-11280, 2017.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v.2, n.3, p.204–226, 2015.

ZHANG, J.J.; LU, Y.C.; ZHANG, J.J.; TAN, L.R.; YANG, H. Accumulation and toxicological response of atrazine in rice crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.102, p.105-112, 2014.

ZHANG, Y.; FU, L.; LI, S.; YAN, J.; SUN, M.; GIRALDO, J.P.; MATYJASZEWSKI, K.; TILTON, R. D.; LOWRY, G.V. Star Polymer Size, Charge Content, and Hydrophobicity Affect their Leaf Uptake and Translocation in Plants. **Environmental Science & Technology**, v.55, p.10758–10768, 2021.

CAPÍTULO II

4. MODO DE AÇÃO DE NANOATRAZINA EM PLANTAS DANINHAS COM DIFERENTE SUSCETIBILIDADE AO INGREDIENTE ATIVO

4.1. RESUMO

A nanoencapsulação de atrazina mantém o seu mecanismo de ação e agrega maior eficiência e segurança na aplicação. As causas dos ganhos em eficiência ainda não estão totalmente claras. Com o presente trabalho, objetivou-se avaliar as respostas bioquímicas de atrazina em formulação convencional e nanoencapsulada em duas espécies de plantas daninhas com diferentes suscetibilidades ao ingrediente ativo (i.a.). Foram realizados experimentos independentes em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, organizados em esquema fatorial 3 x 3 (formulações x tempo de avaliação). As formulações utilizadas foram atrazina convencional (ATZ) e atrazina nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose 2000 g i.a. ha⁻¹. Foram utilizadas plantas de *Raphanus sativus* (menos suscetíveis ao i.a.) e *Bidens pilosa* (mais suscetíveis ao i.a.) em pós-emergência inicial com dois pares de folhas expandidas. Em ambos experimentos foram cultivadas plantas sm aplicação (tratamento controle). Foram avaliados a inibição da atividade do fotossistema II (FSII) e da taxa relativa do transporte de elétrons (rETR), extravasamento de eletrólitos, quantidades de peróxido de hidrogênio e malondialdeído, e atividade de enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidase, catalase, peroxidase, superóxido dismutase) e detoxificante (glutathione S-transferase). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores, com posterior teste de comparação de médias por Tukey ($p \leq 0,05$). Foram observados ganhos em inibição do FSII e intensificação do extravasamento de eletrólitos com a aplicação de nanoatrazina em ambas espécies avaliadas. As quantidades de marcadores de estresse e a atividade enzimática de ação antioxidante foram maiores em plantas de *B. pilosa* em comparação a *R. sativus*. A formulação ZN+ATZ gerou a maior atividade enzimática antioxidante em plantas de *B. pilosa*. A atividade de glutathione S-transferase foi reduzida nas plantas de ambas espécies após a aplicação das três formulações de atrazina. Conclui-se que, a maior inibição do FSII gerado por nanoatrazina agravou a geração de estresse oxidativo, e que as respostas de defesa ao estresse são dependentes da espécie avaliada.

Palavras-chave: *Bidens pilosa*; Estresse oxidativo em plantas; Inibição do FSII; Nanoherbicida; *Raphanus sativus*.

4.2. INTRODUÇÃO

Nanossistemas carreadores de ingredientes ativos baseados em nanocápsulas poliméricas são uma alternativa promissora, tecnologicamente e economicamente viável para que o uso de agrotóxicos seja mais eficiente e com menor risco ambiental (WALKER et al., 2018; AVELLAN, et al., 2021). Polímeros como poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e zeína são exemplos de matrizes poliméricas de sucesso para o carregamento de agrotóxicos e biopesticidas (GRILLO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015; PASCOLI et al., 2019; MONTEIRO et al., 2021). Cada matriz polimérica é capaz de gerar sistemas carreadores com características próprias de tamanho, forma, potencial elétrico, dispersão, absorção e translocação das nanopartículas (YU et al., 2017; ZHANG et al., 2021; PARKINSON et al., 2022).

A atrazina é uma molécula de ação herbicida amplamente utilizada na agricultura brasileira durante os cultivos de milho, sorgo e cana-de-açúcar (BRASIL, 2020; RECKER et al., 2015; NAKKA et al., 2017). Essa molécula pertence ao grupo dos herbicidas com mecanismo de ação inibidor do fotossistema II (FSII), com aplicação recomendada tanto em pré como pós-emergência inicial de plantas daninhas eudicotiledôneas e algumas gramíneas (HANSEN et al., 2013; RECKER et al., 2015). Contudo, essa molécula herbicida está relacionada à contaminação ambiental, apresenta persistência no solo (41-231 dias) e frequentemente é encontrada em recursos hídricos próximos a zonas agrícolas. Seu uso está banido da União Européia e, nas demais nações, deve ser usada com cautela para evitar danos ao meio ambiente (ALBUQUERQUE et al., 2020; HANSEN et al., 2013; SINGH et al., 2018).

As moléculas de atrazina têm como sítio de ligação a proteína D1 do complexo FSII, pelo qual competem com as plastoquinonas (Q_B) intermediárias do transporte de elétrons até o citocromo c_6f (DAYAN et al., 2019; NAKKA et al., 2017). Quando as moléculas de atrazina ocupam o sítio de ligação da Q_A (impedindo o fluxo natural de elétrons), a energia luminosa continua a ser captada pelos centros de reação, que se tornam excitados e liberam a energia na forma de elétrons. Na falta de seus aceptores usuais (Q_B), os elétrons passam a reduzir moléculas de O_2 , podendo reduzir seu potencial a 1O_2 (oxigênio singleto) ou $O_2^{\cdot-}$ (radical superóxido) e, se somado a dois átomos de H^+ o transformam em H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) (LIMA; ABDALLA, 2001). Ou ainda, a molécula de H_2O_2 pode ser convertida em radical

hidroxila ($\cdot\text{OH}$), de alta reatividade e potencial de dano oxidativo (MATTOS et al., 2003). Essas espécies reativas de oxigênio (ERO's) são tóxicos às estruturas celulares, causam estresse oxidativo e peroxidação de lipídeos de membrana, danos que evoluem de morte celular à morte de tecidos e, conseqüentemente, das plantas.

Com o nanossistema carreador de atrazina (nanoatrazina) por nanocápsulas de PCL, tem-se obtido aumento de eficiência herbicida contra plantas daninhas suscetíveis e tolerantes ao ingrediente ativo atrazina, aliado a uma menor toxicidade à maior parte dos organismos não-alvo da aplicação (GRILLO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015; SOUSA et al., 2018; SOUSA et al., 2020; TAKESHITA et al., 2021). Contudo, o ganho em eficiência herbicida de nanoatrazina também é dependente da suscetibilidade, tolerância ou resistência das espécies de plantas daninhas ao ingrediente ativo. Para atrazina, a tolerância pode ser conferida via metabolismo de detoxificação, por meio enzimas glutathione-S-transferase (GST) e hidroxilação não enzimática, ou por barreiras morfológicas e/ou anatômicas que dificultam a penetração da molécula herbicida e absorção (DEVINE; PRESTON, 2000; MARCACCI et al., 2006; SOUSA et al., 2022).

As plantas da espécie *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae) tem hábito de crescimento forrageiro, se perpetuam pelo solo por meio da propagação sementes, com maior ocorrência nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (MOREIRA, BRAGANÇA, 2011; LORENZI, 2014). Em pós-emergência inicial, as plantas de *R. sativus* apresentam-se suscetíveis à atrazina e em pós-emergência tardia, apresentam média suscetibilidade (LORENZI, 2014). Já as plantas da espécie *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) estão presentes em grande parte das lavouras brasileiras anuais e perenes (BRIGHENTI, 2010). Têm hábito de crescimento herbáceo e sua reprodução ocorre exclusivamente por sementes. É uma espécie que apresenta grande variabilidade genética, o que garante grande plasticidade a cada indivíduo com relação à época de florescimento e frutificação (BRIGHENTI, 2010; GAZZIERO et al., 2015). Em estágio inicial de desenvolvimento são altamente suscetíveis à atrazina e pouco suscetíveis em pós-emergência tardia (LORENZI, 2014).

Ainda não são totalmente compreendidas as alterações no modo de ação da atrazina promovidas pelo processo de nanoencapsulação, e as informações sobre danos oxidativos após a aplicação de atrazina nanoencapsulada ainda são limitadas (WU et al., 2021). Nesse sentido, objetivou-se avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas de duas espécies de plantas daninhas (que diferem quanto

à suscetibilidade ao ingrediente ativo) após a pulverização foliar das formulações de atrazina comercial ou de atrazina contida em nanocápsulas de PCL ou zeína.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo

Foram realizados dois experimentos isolados, cada um com uma espécie de planta daninha, em casa de vegetação no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As espécies de plantas daninhas usadas foram *Raphanus sativus* L. (nabo forrageiro) e *Bidens pilosa* L. (picão-preto). Essas espécies foram escolhidas com base em experimentos anteriores que forneceram parâmetros de comparação do efeito das nanoformulações contendo atrazina e diferentes níveis de suscetibilidade das plantas (SOUSA et al., 2018; TAKESHITA et al., 2021).

As sementes de *R. sativus* tiveram como origem amostras do IDR-Paraná, sendo utilizada a cultivar IPR116. As sementes de *B. pilosa* foram coletadas no campus da UEL e armazenadas. As unidades experimentais foram compostas por vasos plásticos com capacidade de 1 L (10,5 cm de altura, 9,5 cm diâmetro inferior, 14 cm de diâmetro superior) preenchidos com substrato solo (características químicas apresentadas na Tabela 5). Foram semeadas dez sementes por vaso e, após a emergência das plântulas, no estágio de um par de folhas verdadeiras expandidas, foi realizada a homogeneização dos vasos (raleio ou transplântio) para que houvesse cinco plantas em cada vaso.

Tabela 5. Atributos químicos do solo utilizado como substrato no experimento com milho e formulações de atrazina.

pH (CaCl ₂)	M.O. g dm ⁻³	P mg dm ⁻³	K	Na	Ca	Mg	SB	CTC	V
					cmol _c dm ⁻³				%
5,36	7,02	5,76	0,12	0,0	2,76	0,85	3,73	8,17	45,68

M.O.: Matéria orgânica; P: Fósforo; K: Potássio; Na: Sódio; Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; SB: Soma de bases; CTC: Capacidade de troca catiônica (pH 7.0); V: Saturação por bases. **Fonte:** O próprio autor.

4.3.2. Formulações

Atrazina Convencional (ATZ): A formulação considerada convencional teve como fonte o produto comercial PRIMÓLEO® (SC 400 g i.a. L⁻¹, Syngenta), onde as moléculas estão livres na formulação.

Atrazina em nanocápsulas de poli(épsilon-caprolactona) (PCL+ATZ): Essa nanoformulação é composta por nanocápsulas do polímero poli(épsilon-caprolactona) (PCL) que abriga moléculas de ingrediente ativo em seu núcleo foi preparada segundo o protocolo de Grillo et al. (2012). Esse processo consistiu na mistura de uma fase orgânica a uma fase aquosa. A fase orgânica é composta por 100 mg de polímero (PCL), 30 mL de solvente orgânico (acetona), 200 mg de óleo (triglicérides de ácido cáprico e caprílico, na forma de Myritol 318), 40 mg de monoestearato de sorbitano (Span 60) e 10 mg de atrazina. A fase aquosa é composta por 30 mL de uma solução contendo 60 mg de surfactante polissorbato 80 (Tween 80). Após a dissolução dos elementos 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, seguida da evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida por evaporador rotativo. Ao fim do processo foi obtida a nanoformulação com concentração de atrazina de 1 g L⁻¹, contendo nanocápsulas em formato esférico, com distribuição uniforme e sem agregados, com tamanho entre 240 ± 4 nanômetros, índice de polidispersão de $0,041 \pm 0,05$, potencial zeta de -30 ± -2 mV e eficiência de nanoencapsulação de aproximadamente 94%.

Atrazina em nanocápsulas de zeína (ZN+ATZ): A nanoformulação foi preparada com base no método de precipitação por antissolvente descrito por Hu e McClements (2014). Primeiramente, 200 mg de zeína foram solubilizados em 10 mL de solução hidroetanólica 85% (v/v). Essa solução foi submetida à centrifugação a $1700 \times g$ durante 30 min para separação de eventuais impurezas ou proteína não solúvel, seguida de um tratamento térmico, a 75 °C por 15 min, e filtrada em filtros de membrana com porosidade de 0,45 µm. Uma segunda solução foi preparada a partir de 30 mg do herbicida atrazina dispersos em 300 mg do tensoativo Polisorbato 80, e a essa dispersão foram adicionados os 10 mL de zeína solubilizada. A solução foi então mantida sob agitação para garantir a completa dissolução do herbicida. Separadamente, foi preparada uma solução aquosa de Poloxamer 188 (2% m/v) com pH ajustado para 4. Posteriormente, a solução de atrazina dissolvida no tensoativo e

zeína foi injetada em 30 mL da solução aquosa sob constante agitação. A dispersão coloidal resultante foi mantida em agitação durante 20 min e o etanol foi evaporado em um evaporador rotativo, obtendo um volume final de 30 mL da formulação. A nanoformulação obtida apresentou nanocápsulas de zeína contendo atrazina com formato esférico, tamanho entre 130 a 170 nm, índice de polidispersão menor que 0,25, potencial zeta no entorno de 12 mV e eficiência de encapsulação maior que 90%, em uma concentração de 1 g i.a. L⁻¹.

4.3.3. Delineamento Experimental

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e organizados em esquema fatorial 3 x 3 (formulações x tempo de avaliação). As formulações utilizadas foram ATZ, PCL+ATZ e ZN+ATZ na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹. Em ambos experimentos foram cultivados um tratamento controle (sem a aplicação de formulações herbicidas), nas mesmas condições que os demais tratamentos, para fornecer os dados de atividade fotossintética da planta em estado de crescimento sem estresse. Os tratamentos foram pulverizados com spray manual com volume de calda de 5,1 mL para cada unidade experimental. O experimento com *B. pilosa* contou com quatro repetições, e o experimento com *R. sativus* com cinco repetições. A aplicação dos tratamentos foi realizada quando as plantas apresentavam estágio de desenvolvimento de dois pares de folhas verdadeiras expandidas, com tamanho suficiente para as análises de atividade do FSII.

4.3.4. Avaliações

4.3.4.1. Avaliações fisiológicas

As avaliações fisiológicas não destrutivas da eficiência quântica máxima (F_v/F_m) e efetiva (YII) do fotossistema II (FSII) foram realizadas às oito, 24, 48 e 72 horas após aplicação utilizando o fluorômetro portátil (OS1p – Opti-Sciences). No momento da medida do YII também foi medida e registrada a incidência de luz no ambiente para posterior cálculo da taxa relativa do transporte de elétrons (rETR).

Para a obtenção dos dados da razão F_v/F_m , inicialmente as folhas avaliadas necessitaram de aclimação ao escuro, realizada por meio de cobertura de todas as plantas por tecido não tecido (TNT) preto por no mínimo 20 minutos. Nas folhas avaliadas foram colocados os cliques FL-DC, aos quais foi conectado o sensor do fluorômetro, que realiza as medidas de intensidade da fluorescência emitida pela clorofila *a*. Esses cliques delimitaram a área de avaliação da fluorescência emitida pelas plantas e isolaram essa área de contato com a luminosidade do ambiente. A partir da aclimação ao escuro, foi possível realizar a medida de intensidade inicial de fluorescência da clorofila *a* (F_0) em resposta à uma luz modulada com baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFA), emitida pelo equipamento por 1,0 segundo. Após a medida de F_0 , o equipamento emitiu um pulso de luz saturante ($8250 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 0,8 segundos, e durante esse período foi obtida a fluorescência máxima emitida pela clorofila *a* (F_m). A fluorescência variável (F_v) foi obtida pela diferença entre F_m e F_0 , possibilitando a obtenção da razão F_v/F_m (BAKER, 2008). Todos os cálculos foram realizados pelo próprio equipamento.

Após as medidas da eficiência máxima do FSII foram realizadas as medidas da eficiência efetiva (YII). Essas medidas foram realizadas com plantas aclimatadas a luminosidade natural do ambiente, tendo a DFFA medida por luxímetro digital modelo LX1010B (Politerm). O mesmo fluorômetro foi utilizado, porém foi alterado o clipe onde o sensor é acoplado. Para isso, foi utilizado o modelo aberto que delimita a área de leitura, porém permite o contato da folha com a luminosidade natural do ambiente. Inicialmente, com as plantas aclimatadas à luminosidade natural foi realizada a medida de fluorescência basal emitida pela clorofila *a* (F'), em seguida, após a emissão do pulso de luz saturante ($8250 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi obtida a fluorescência máxima (F_m'). A partir desses dados foi calculada a fluorescência variável (ΔF), e os valores de YII dados pela razão $\Delta F/F_m'$ calculada pelo próprio equipamento. Com os valores de YII e da DFFA foi calculada a taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) pela seguinte equação fornecida por Baker (2008):

$$rETR = YII \times DFFA \times 0,5 \times 0,84$$

onde, as constantes 0,5 e 0,84 correspondem a divisão da energia captada pelas plantas entre os dois fotossistemas, e ao valor aproximado de máximo aproveitamento da luz captada pelas plantas, respectivamente.

A partir da razão F_v/F_m de plantas que não receberam pulverização dos herbicidas (tratamento controle), foi possível calcular a taxa de inibição do FSII

das plantas de cada tratamento pela seguinte fórmula:

$$\text{Inibição do FSII (\%)} = \frac{Fv/Fm \text{ Controle} - Fv/Fm \text{ Tratamento}}{Fv/Fm \text{ Controle}} \times 100$$

A quantificação do extravasamento de eletrólitos (EE) será realizada de acordo com protocolo descrito por Lima et al. (2009), onde 10 discos foliares de 0,196 cm² foram coletados, lavados em água destilada e acondicionados em frascos de vidro com tampa contendo 10 mL de água ultrapura. Os frascos contendo os discos foliares permaneceram em banho maria a 25 °C por 6 horas, para então ser realizada a primeira leitura de condutividade elétrica (Ci) em medidor portátil HI 8732 (HANNA INSTRUMENTS). Em seguida os frascos retornaram ao banho maria a temperatura de 90 °C por 2 horas. Ao fim do tempo estabelecido, os frascos foram retirados do banho e após o resfriamento dos mesmos foi realizada a segunda medida de condutividade elétrica (Cf). A porcentagem de extravasamento de eletrólitos foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{EE (\%)}: \left(\frac{C_i}{C_f} \right) \times 100$$

4.3.4.2. Avaliações bioquímicas

Nos tempos de 24, 48 e 72 HAA foi coletado aproximadamente 1 g de limbo foliar de cada uma das unidades experimentais, armazenados em envelopes de alumínio e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. O material foi armazenado em biofreezer a -80 °C. Posteriormente, o material congelado de cada envelope foi triturado. Para isso foram utilizados tubos do tipo Falcon de 50 mL, onde foram adicionados o material vegetal, duas esferas metálicas e aproximadamente 10 mL de nitrogênio líquido. Os tubos passaram por agitação em agitador de tubos até a completa trituração do material. Em seguida, em microtubos de 2,0 mL com a tampa perfurada, foram coletadas as alíquotas necessárias para a realização de cada uma das análises bioquímicas. Os microtubos com o material vegetal triturado foram armazenados em biofreezer -80 °C até o momento da utilização.

O estresse oxidativo nas plantas daninhas foi avaliado por meio de duas metodologias: quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (ALEXIEVA et al., 2001) e peroxidação lipídica (quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (CAMEJO; WALLIN; ENOJÄRVI, 1998). A partir de uma alíquota de 100

mg do material triturado coletado foram quantificadas as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (método TBARS) e peróxido de hidrogênio. Aos microtubos de coleta foram adicionados 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA 0,2%) em metanol, agitados levemente, e conservados em caixa térmica com gelo. Em seguida, os microtubos foram levados para centrifugação por 5 min a 4 °C e 15.645 xg em centrífuga refrigerada MIKRO 220 R (Hettich Zentrifugen). Após a centrifugação foram coletadas alíquotas do sobrenadante para a montagem das reações em placas de micropoços.

Para o método TBARS foi montada uma placa de micropoços transparentes contendo 140 µL de PBS (KCl 2,7 mM, KH₂PO 1,4 mM, NaCl 137 mM e K₂HPO₄ 174,18), 50 uL de ácido tricloroacético (TCA) 50 % (em água destilada), 10 uL de BHT (diluído em etanol 95%), 75 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,3% (em NaOH 0,3%) e 40 µL de sobrenadante de cada amostra. Ao final da adição dos reagentes a microplaca foi levada a estufa a 60 °C por 1 hora. Essa microplaca teve as absorbâncias lidas em leitora SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 535 e 600 nm. Para peróxido de hidrogênio foi montada uma reação contendo 400 µL de KI 1M (em água destilada), 100 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 e 100 µL de sobrenadante em microtubos de 1,5 mL, que permaneceram em caixa térmica com gelo por 1 hora. Após esse período, alíquotas de 200 µL das reações foram transferidos para placa de micropoços, e realizada a leitura de absorbância em leitora SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices) no comprimento de onda de 390 nm.

As reações para determinação de atividade das enzimas com ação antioxidante ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) foi avaliada a partir de extratos obtidos de alíquotas de 100 mg do material vegetal. Aos microtubos de coleta foram adicionados 1,5 mL de tampão de extração, composto por EDTA 1 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5), suplementado com polivinil-poli-pirrolidona (PVPP) 2% (p/v). Os tubos foram levemente agitados e conservados em caixa térmica com gelo. Em seguida foram centrifugados a 15.645 xg, a 4 °C por 20 min em centrífuga refrigerada MIKRO 220 R (Hettich Zentrifugen). Após a centrifugação, foram coletadas quatro alíquotas de aproximadamente 300 µL do sobrenadantes em microtubos de 1,5 mL, e levados ao freezer -20 °C, onde permaneceram até o momento de uso.

Para a enzima APX, a atividade foi determinada de acordo com a metodologia de Nakano e Asada (1981). A reação consistiu na adição de 2,85 mL de

tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo EDTA (0,1 mM) e ácido ascórbico (0,5 mM), 50 μ L de extrato (obtidos anteriormente), e 100 μ L de H₂O₂ 30 mM em cubeta de quartzo. Após a adição do H₂O₂, a reação foi rapidamente homogeneizada pela agitação da cubeta. A cubeta foi levada diretamente ao espectrofotômetro (Genesis 10S UV-Vis – Thermo Scientific) para leitura de absorbância em comprimento de onda de 290 nm, a cada 15 segundos, durante dois minutos. A atividade enzimática de APX foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para cada amostra foi utilizado um branco composto por 2,95 μ L do tampão de reação e 50 μ L de extrato para zerar o equipamento.

A atividade da CAT foi determinada segundo Aebi (1974) e Peixoto et al. (1999). Em uma cubeta de quartzo foram adicionados 1950 μ L de tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), contendo EDTA (0,1 mM) e H₂O₂ (12,5 mM). Em seguida foram adicionados 50 μ L do extrato. A reação foi homogeneizada pela agitação da cubeta, que foi levada ao espectrofotômetro (Genesis 10S UV-Vis – Thermo Scientific) para a leitura de absorbância no comprimento de onda de 240 nm a cada 30 segundos durante três minutos. A atividade enzimática de CAT foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (ANDERSON et al., 1995). Para cada amostra foi utilizado um branco contendo 1950 μ L de tampão sem H₂O₂ e 50 μ L de extrato para zerar o equipamento.

Por meio da metodologia descrita por Peixoto et al. (1999), foi determinada a atividade da POD. Para essa análise, foi necessário adaptar o protocolo quanto a espécie avaliada. Para as amostras de *B. pilosa*, foram montadas reações em tubos de ensaio de 10 mL adicionando-se 3,5 mL tampão de fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8) contendo pyrogallol (20 mM) e H₂O₂ (20 mM) e 100 μ L do extrato. Já para as amostras de *R. sativus*, foram adicionados 3,4 mL do mesmo tampão e 200 μ L de extrato. As reações foram homogeneizadas por agitação manual dos tubos de ensaio. Após um minuto da adição do sobrenadante, as reações foram pausadas com adição de 400 μ L de H₂SO₄. Em seguida os tubos foram levados para caixa térmica com gelo. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro (Genesis 10S UV-Vis – Thermo Scientific) em comprimento de onda de 420 nm para quantificar a produção de purpurogalina. A atividade enzimática de POD foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Para a atividade de SOD foi utilizada a metodologia descrita por

Giannopolitis e Ries (1977). Alíquotas de 40 μL dos extratos foram adicionadas em meios de reação constituído de 1,960 μL tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8) contendo EDTA (0,1 mM), metionina (13 mM), riboflavina (2 μM) e 75 μM de NBT (Azul de nitrotetrazólio cloreto). A reação será iniciada ao incubar os tudo de ensaio contendo as reações em uma câmara de iluminação, constituída por uma caixa de isopor contendo três lâmpadas fluorescentes de 75 watts (cada). Essa câmara conta com uma ventoinha do tipo cooler com a finalidade de não permitir o aumento da temperatura das reações. As amostras permaneceram nessa condição durante 8 minutos, necessários para adquirir a coloração azul, resultado da fotorredução do NBT. A absorbâncias das amostras foram avaliadas em espectrofotômetro (Genesis 10S UV-Vis – Thermo Scientific) em comprimento de onda de 560 nm. A atividade da SOD foi avaliada em unidades, onde uma unidade de SOD corresponde a atividade enzimática necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT comparada à uma amostra controle. A amostra controle foi composta pelo mesmo meio de reação, também será levada a câmara de iluminação, contudo, no lugar do extrato foi adicionado água deionizada. Para zerar o equipamento, foi feita uma amostra branco para cada tratamento, composta pelo tampão de reação + extrato, e armazenadas no escuro até o momento da leitura.

Para a análise de atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST), foi realizado um método de extração diferentes das enzimas antioxidantes. A extração foi realizada segundo o protocolo de Knörzer et al. (1996 apud CATANEO et al., 2003). Para isso, em uma alíquota de 300 mg de material coletado em microtubos de 2,0 mL foram adicionados 1,5 mL de tampão TRIS-HCl 50 mmol L^{-1} pH 7,0 gelado (20% de glicerol (v/v), 1 mmol L^{-1} de ácido ascórbico, 1 mmol L^{-1} de ditiotreitol, 1 mmol L^{-1} de EDTA, 1 mmol L^{-1} de glutathiona reduzida e 5 mmol L^{-1} de MgCl_2). Após duas centrifugações à 4 °C (a primeira por 6 min a 12.000 xg e a segunda por 16min a 26.900 xg) em centrífuga refrigerada 320 R (Hettich Zentrifugen), o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -20 °C até o momento da análise.

A atividade enzimática foi determinada segundo Wu et al. (1996), após a mistura de 2000 μL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 6,9), 900 μL de glutathiona reduzida (3,3 mmol L^{-1}) e 60 μL do extrato em uma cubeta de quartzo. A reação foi iniciada com a adição de 100 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), levando a formação de conjugados de GSH-CNDB que promoveram alterações nas absorbâncias das amostras, lidas em espectrofotômetro (Genesis 10S UV-Vis –

Thermo Scientific) no comprimento de onda de 340nm. As leituras começaram com um minuto de espera após a adição do CDNB, e ocorreram a cada 30 segundos, durante cinco minutos. Para cada amostra foi feito um branco para zerar o equipamento, composto por 2100 μL de tampão fosfato de potássio, 900 μL de glutathiona reduzida e 60 μL de extrato.

Após as avaliações das enzimas antioxidantes e detoxificante, foi determinado o conteúdo total de proteínas dos sobrenadantes para padronização de atividade das proteínas. Foi utilizado o protocolo Bradford. Em placas de micropoços foram adicionados 20 mL de água deionizada, 5 μL de extrato e 200 μL de do reagente azul brilhante de *Coomassie* (Coomassie Plus, Thermo Scientific). A leitura das placas foi realizada em leitora SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices) no comprimento de onda de 595 nm. A quantidade de proteínas das amostras foi determinada em mg g^{-1} de material vegetal.

4.3.5. Análise Estatística

Os dados obtidos em porcentagem foram transformados por arco seno \sqrt{x} para serem analisados. Os dados foram testados quanto a normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias e, tendo esses pressupostos aceitos, foram submetidos a ANOVA de dois fatores por teste F ($p \leq 0,05$) e, quando significativo, tiveram as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software R Studio. Com os dados fisiológicos e bioquímicos obtidos com o desenvolvimento dos dois experimentos foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP) e uma análise de Mapa de Calor para obtenção de uma compreensão mais completa do comportamento das plantas após a aplicação das formulações.

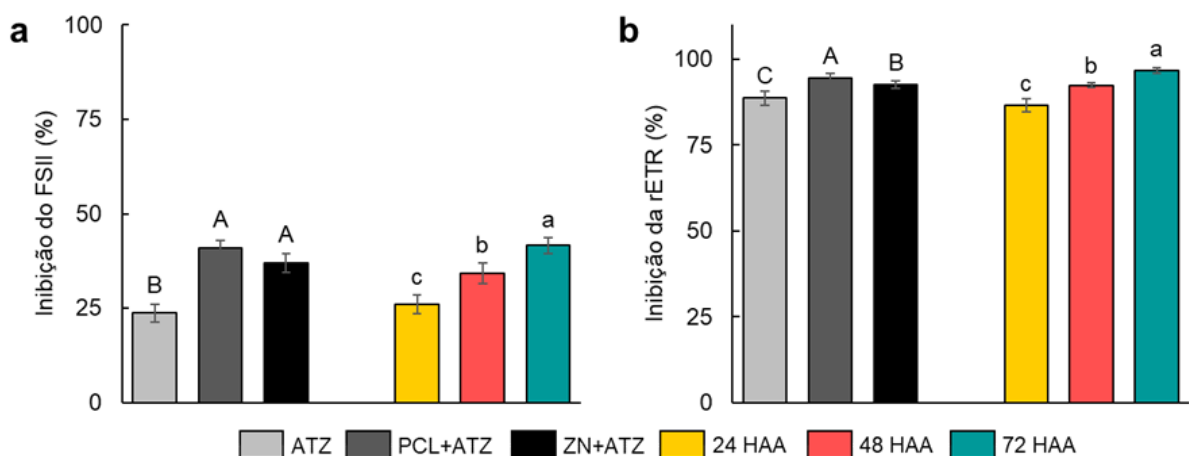
4.4. RESULTADOS

4.4.1. Parâmetros Fisiológicos

Nas avaliações de atividade do fotossistema II (FSII) das plantas de

R. sativus, pode ser observado efeito independente dos fatores estudados (Figura 12). Assim, independente do tempo de avaliação, as formulações PCL+ATZ e ZN+ATZ promoveram maiores inibições do FSII (17,3 e 13,3%, respectivamente) que a formulação ATZ (Figura 12a). Quanto aos tempos de avaliação, pode ser observado um aumento crescente do percentual de inibição independente da formulação aplicada, com ganhos de inibição de 8,2% de 24 para 48 HAA e 7,4% das 48 para 72 HAA, alcançando a percentagem de 41,6% de inibição do FSII. Quanto a inibição da taxa relativa do transporte de elétrons – rETR (Figura 12b), também pode ser observada a maior eficiência das formulações PCL+ATZ e ZN+ATZ. Independentemente do tempo de avaliação, a formulação PCL+ATZ foi 5,8% e 2,0% mais eficiente que ATZ e ZN+ATZ, respectivamente; enquanto ZN+ATZ foi 3,9% mais eficiente que ATZ. Para essa variável, também foi encontrado aumento crescente no percentual de inibição conforme o passar do tempo (independente da formulação aplicada), com ganhos de 3,9% de 24 para 48 HAA e 4,2% até 72 HAA, alcançando a máxima de 96,7% de inibição da rETR.

Figura 12. (a) Inibição da eficiência máxima do fotossistema II (FSII) e **(b)** Inibição da taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) em plantas de *Raphanus sativus* nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA) de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos independente do tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos, independente do tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.

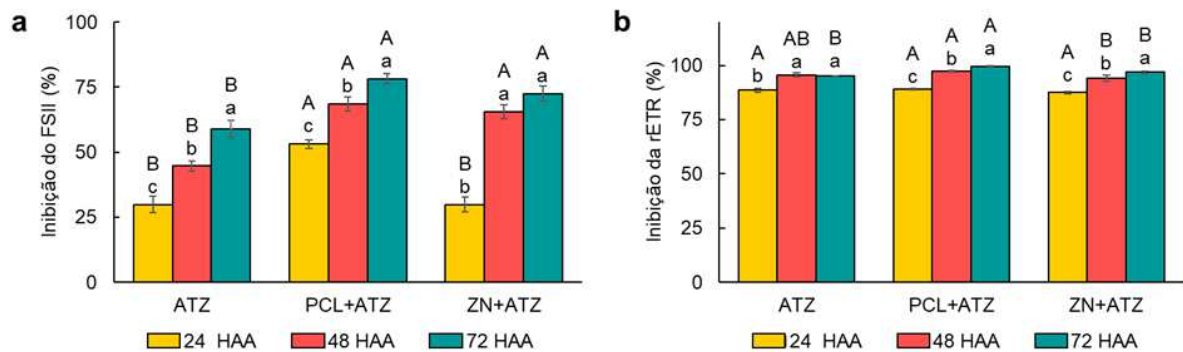


Fonte: O próprio autor.

Quanto às avaliações de atividade do FSII das plantas de *B. pilosa*, pode ser observada a interação entre os fatores estudados (Figura 13a). Com 24 HAA, a aplicação de PCL+ATZ promoveu as maiores inibições do FSII, sendo 23% mais eficiente que ATZ e ZN+ATZ. Às 48 HAA, as inibições do FSII geradas por PCL+ATZ e ZN+ATZ foram semelhantes, em média 22,4% mais eficientes que ATZ; resultado que se repetiu às 72 HAA, com ganhos de eficiência de 16,5% de PCL+ATZ e ZN+ATZ sobre ATZ. Para as formulações ATZ e PCL+ATZ, pode ser observado um aumento gradativo de inibição do FSII conforme o passar do tempo. Em ATZ, os ganhos de inibição entre cada tempo foram parecidos, na casa de 15%, enquanto para PCL+ATZ os ganhos foram de 15% entre 24 e 48 HAA e 19,6% entre 48 e 72 HAA. Já para ZN+ATZ, o ganho em inibição de 24 para 48 HAA foi de 35,6%, alcançando percentagem de inibição que permaneceu às 72 HAA. Para esta espécie, as máximas de inibição do FSII às 72 HAA foram alcançadas por PCL+ATZ (78,2%) e ZN+ATZ (72,5%).

A inibição da rETR gerada às plantas de *B. pilosa* (Figura 13b) foi semelhante entre as três formulações às 24 HAA, entre 87% e 89%. Às 48 HAA, a inibição de rETR gerada por PCL+ATZ foi 3,2% maior que a de ZN+ATZ; contudo, nesse tempo a inibição gerada pela formulação ATZ não diferiu de ambas formulações. No último tempo, de 72 HAA, PCL+ATZ gerou a maior inibição de rETR das plantas de *B. pilosa*, sendo 4,4% e 2,7% mais eficiente que ATZ e ZN+ATZ, respectivamente. Os ganhos de inibição de rETR foram gradativos para PCL+ATZ, (8,3% das 24 para 48 HAA e mais 2,3% até 72 HAA) e ZN+ATZ (6,7% das 24 para 48 HAA e 2,7% até as 72 HAA), contudo, em ATZ houve apenas um ganho de 7,1% entre 24 e 48 HAA, alcançando uma percentagem de inibição que não aumentou as 72 HAA. Nas plantas de *B. pilosa*, a máxima de inibição de rETR às 72 HAA foi encontrada na aplicação de PCL+ATZ (99,6%).

Figura 13. (a) Inibição da eficiência máxima do fotossistema II (FSII) e **(b)** Inibição da taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) em plantas de *Bidens pilosa* nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA) de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.

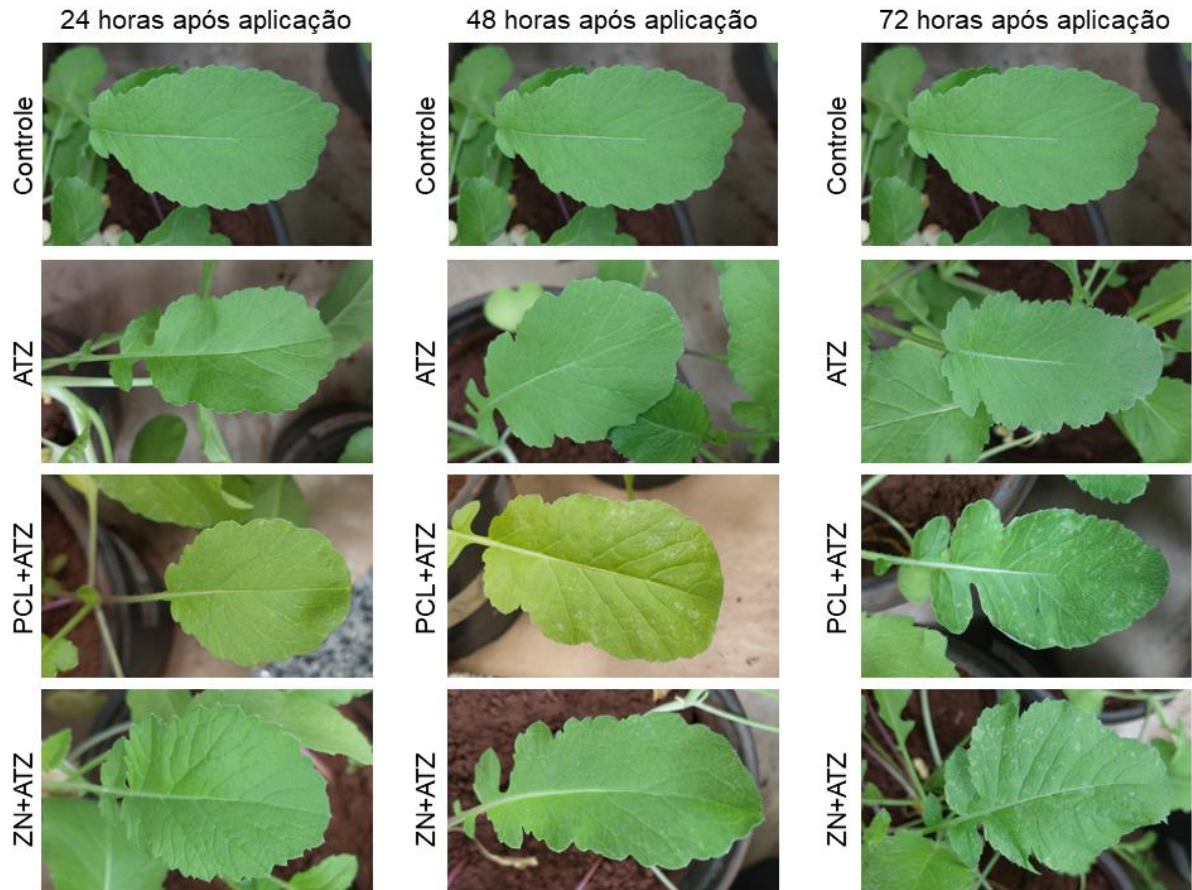


Fonte: O próprio autor.

4.4.2. Sintomas Visuais

Na Figura 14, observou-se avanços dos sintomas visuais após a aplicação das formulações ATZ, PCL+ATZ e ZN+ATZ em comparação ao tratamento Controle (sem aplicação). Sintomas como clorose dos tecidos puderam ser observados a partir de 48 HAA em plantas tratadas com PCL+ATZ e as 72 HAA nas tratadas com ZN+ATZ; contudo, estes sintomas não foram observados nas plantas que receberam aplicação de ATZ.

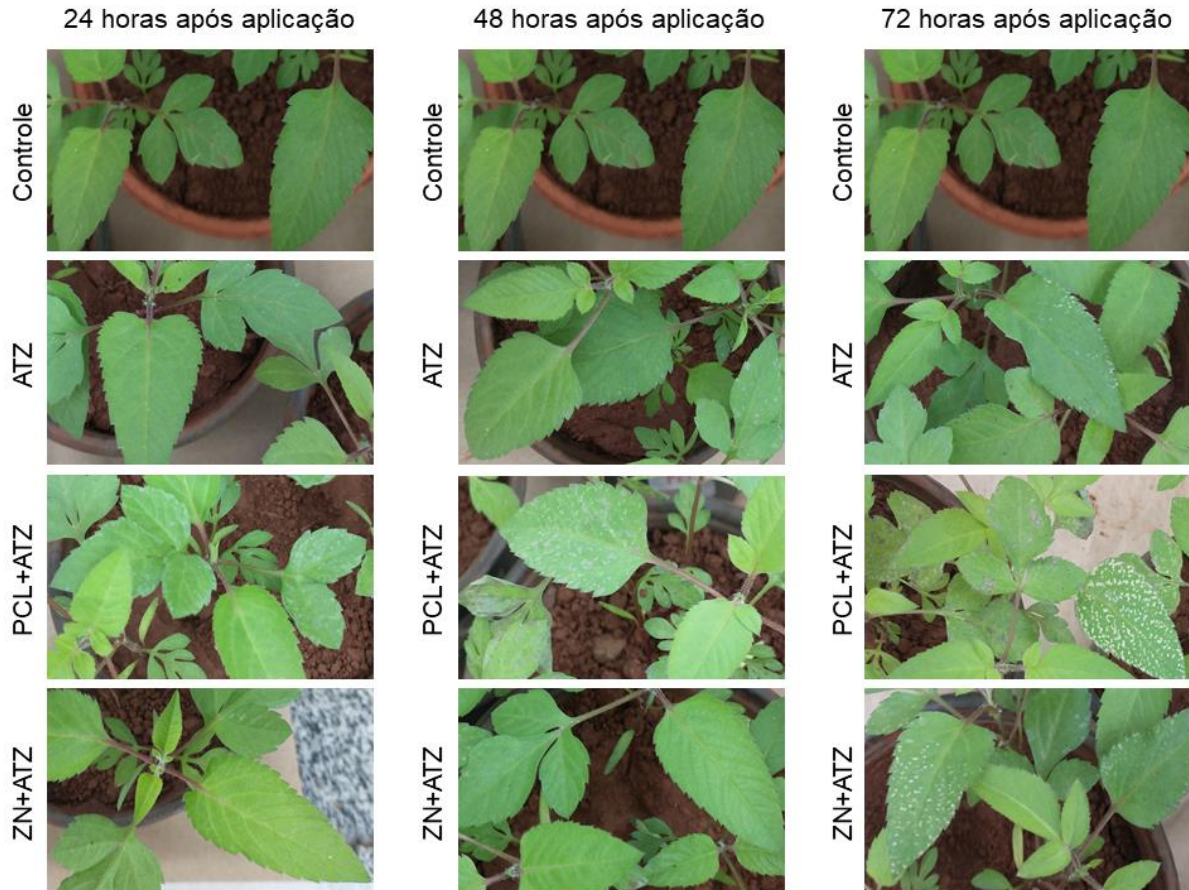
Figura 14. Folhas de *Raphanus sativus* sem e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹; às 24, 48 e 72 horas após aplicação.



Fonte: O próprio autor.

Nas plantas de *B. pilosa*, foram observados sintomas do modo de ação da atrazina (manchas foliares de aspecto clorótico) logo às 24 HAA em plantas que receberam a aplicação de PCL+ATZ (Figura 16). Estes sintomas nas plantas aplicadas com PCL+ATZ se intensificaram nos tempos de 48 e 72 HAA. Apenas no último tempo de avaliação (72 HAA) estes sintomas do modo de ação da atrazina puderam ser observados em plantas aplicadas com ATZ ou ZN+ATZ. Os sintomas presentes nas plantas aplicadas com ATZ apresentavam menor intensidade do que os apresentados por aquelas aplicadas com ZN+ATZ.

Figura 15. Folhas de *Bidens pilosa* sem e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ε-caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹; às 24, 48 e 72 horas após aplicação.



Fonte: O próprio autor.

4.4.3. Marcadores de Estresse Oxidativo

Na Figura 16a, estão os desdobramentos dos resultados da quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em *R. sativus*. A aplicação de PCL+ATZ e ZN+ATZ gerou as maiores quantidades H₂O₂ nas plantas de *R. sativus* logo as 24 HAA, diferindo da quantidade presente nas plantas CTL e geradas pela aplicação de ATZ. Nesta avaliação, PCL+ATZ ficou 21,8% e 34,7% acima do CTL e ATZ, enquanto ZN+ATZ, 31,9% e 45,6% acima de CTL e ATZ; a quantidade de H₂O₂ das plantas que receberam aplicação de ATZ não diferiram do CTL. As 48 HAA, a quantidade de H₂O₂ gerada por PCL+ATZ permaneceu diferente de CTL (35,6% maior) e de ATZ (23,8% maior), assim como ZN+ATZ também permaneceu 44,4% maior que CTL e 31,9% maior que ATZ; a quantidade de H₂O₂ nas plantas que

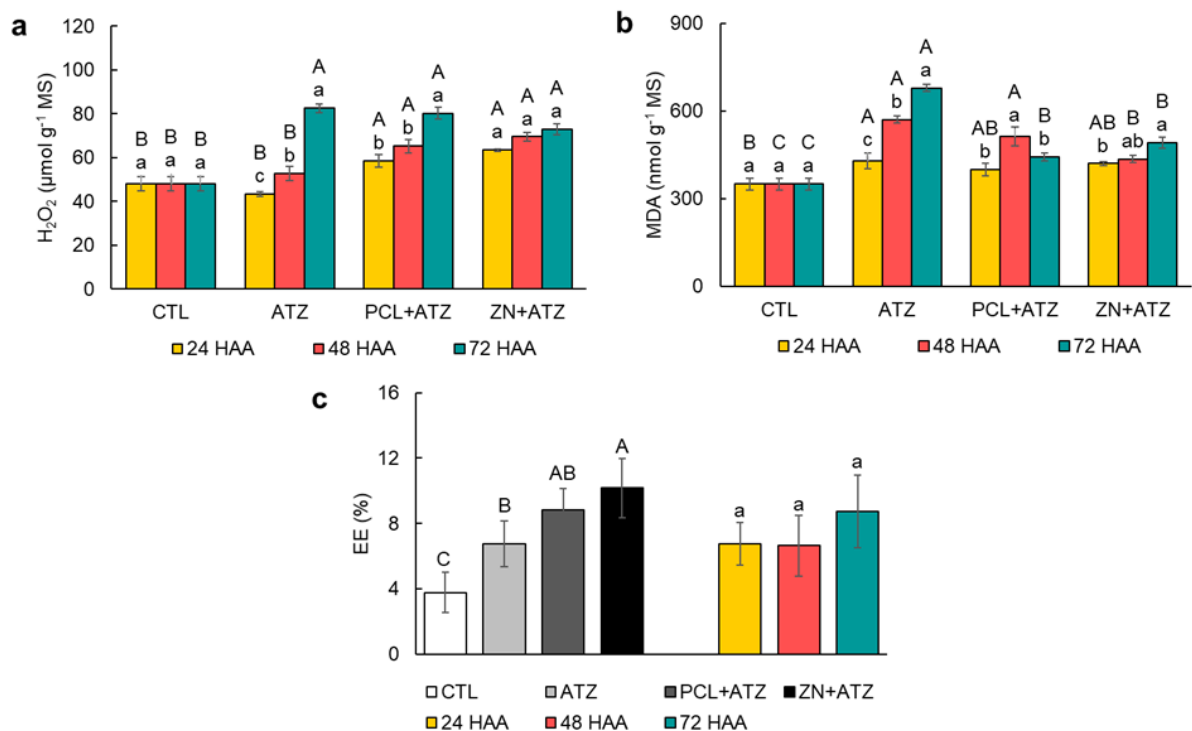
receberam aplicação de ATZ permaneceram semelhantes à quantidade de CTL. Apenas às 72 HAA a quantidade de H_2O_2 foi semelhante entre as três formulações, que diferiram de CTL. Os aumentos na quantidade de H_2O_2 em relação ao CTL foram de 71,5%, 66,7% e 51,3% para ATZ, PCL+ATZ e ZN+ATZ, respectivamente. Para as plantas que receberam aplicação da formulação ATZ, ocorreu aumento na quantidade de H_2O_2 gradativo conforme o passar do tempo, de 21,2% de 24 para 48 HAA e 56,6% para 72 HAA. Com a aplicação de PCL+ATZ, as quantidades de H_2O_2 foram semelhantes as 24 e 48 HAA, com aumento significativo de 23% para 72 HAA. Já para as plantas que receberam aplicação de ZN+ATZ não houve diferença na quantidade de H_2O_2 entre os períodos avaliados.

Na quantificação de MDA (Figura 16b), com 24 HAA, apenas a quantidade de MDA presente nas plantas aplicadas com ATZ diferiu das plantas CTL, sendo 22,3% maior. Neste período, as quantidades de MDA nas plantas aplicadas com PCL+ATZ e ZN+ATZ foram semelhantes a CTL e ATZ. Com 48 HAA, as maiores quantidades de MDA foram encontradas nas plantas de ATZ e PCL+ATZ, que diferiram de ZN+ATZ e do CTL. Com ATZ, a quantidade de MDA foi 62,8% maior que CTL e 31,2% maior que ZN+ATZ; enquanto PCL+ATZ aumentou a quantidade de MDA em 46,1% de CTL e ficou 31,2% acima de ZN+ATZ. A quantidade de MDA nas plantas de ZN+ATZ foi intermediária, 19,4% maior que das plantas CTL. Já as 72 HAA, a maior quantidade de MDA foi encontrada nas plantas aplicadas com ATZ, 93,4% maior que CTL e 53,4% e 38% acima de PCL+ATZ e ZN+ATZ, respectivamente. A quantidade de MDA nas plantas aplicadas com PCL+ATZ e ZN+ATZ foi semelhante as 72 HAA, e maiores que as plantas CTL em 26,1% e 40,1%. Em plantas que receberam aplicações de ATZ e ZN+ATZ ocorreu aumento gradual da quantidade de MDA com o passar do tempo, 3,7% das 24 para 48 HAA e mais 12,9% para 72 HAA. Com a aplicação de PCL+ATZ, ocorreu um pico na quantidade de MDA das plantas, com aumento de 28,1% às 48 HAA em relação a 24 HAA, e redução de 13,7% para as 72 HAA.

Para a variável extravasamento de eletrólitos (EE) não houve interação entre os fatores estudados (Figura 16c). Assim, o percentual de EE nas plantas que receberam aplicação de ZN+ATZ diferiu das plantas aplicadas com ATZ e de CTL, sendo 3,4% e 6,4% maior, respectivamente. Para as plantas que receberam aplicação de PCL+ATZ, o percentual de EE foi semelhante tanto a ATZ quanto a ZN+ATZ. Em relação ao tratamento CTL (plantas sem aplicação), todas as

formulações diferiram; ATZ, PCL+ATZ e ZN+ATZ aumentaram o EE em 2,9%, 5,0% e 6,4%, respectivamente. A porcentagem de extravasamento de eletrólitos não diferiu quanto aos períodos de avaliação. Para esta espécie, a máxima porcentagem de EE foi encontrada nas plantas tratadas com ZN+ATZ, de 10,2%.

Figura 16. Marcadores de estresse oxidativo **(a)** peróxido de hidrogênio (H_2O_2), **(b)** malondialdeído (MDA) e **(c)** extravasamento de eletrólitos (EE) em plantas de *Raphanus sativus* sem aplicação de atrazina (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha^{-1} ; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Em **(a)** e **(b)**, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos independente do tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos, independente do tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$. Em **(c)**, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.



Fonte: O próprio autor.

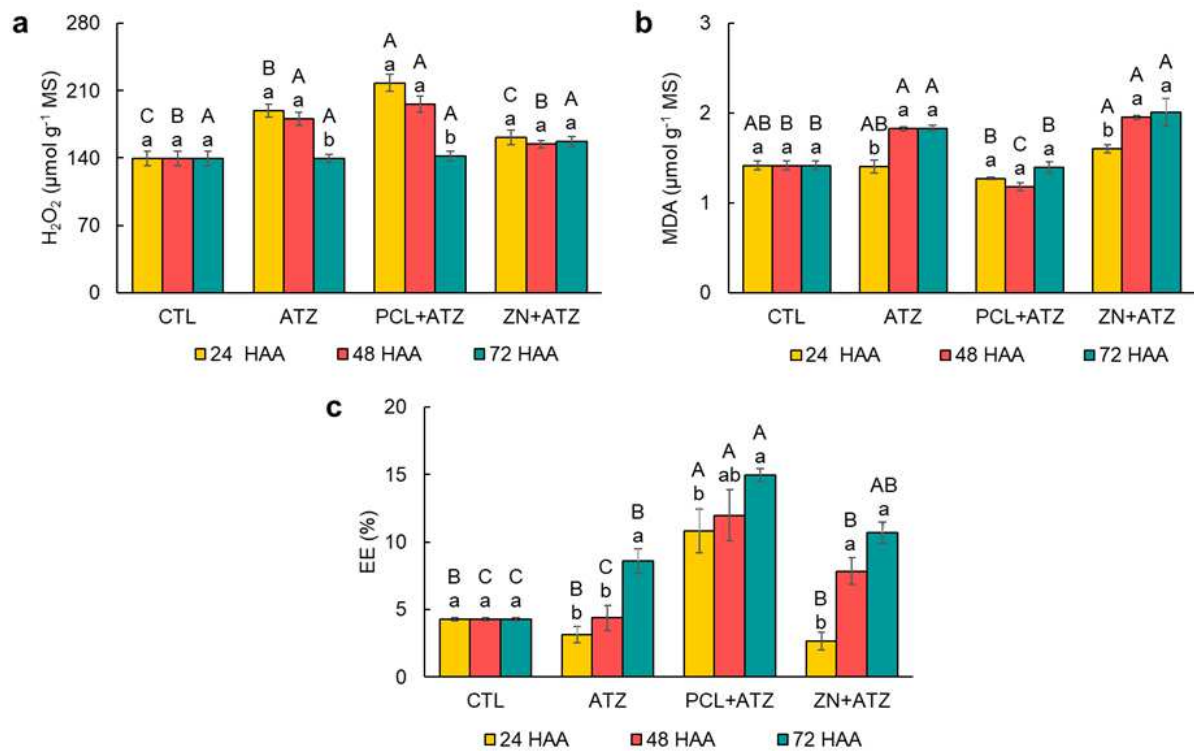
A quantificação de H_2O_2 nas plantas de *B. pilosa* mostrou a maior quantidade em plantas aplicadas com PCL+ATZ logo as 24 HAA (Figura 17a). Essa

quantidade foi 56,1%, 15,4% e 35,1% maior que em CTL, ATZ e ZN+ATZ, respectivamente. A aplicação de ATZ, apesar de gerar quantidade de H₂O₂ menor que PCL+ATZ nas plantas, ainda sim foi 17,1% maior do que foi gerado pela aplicação de ZN+ATZ e 35,2% maior que a quantidade presente nas plantas CTL. Neste tempo, a aplicação de ZN+ATZ não levou a alteração da quantidade de H₂O₂ em relação as plantas CTL. Às 48 HAA, as quantidades de H₂O₂ foram semelhantes em plantas aplicadas com ATZ e PCL+ATZ, e maiores que em CTL e ZN+ATZ. Para PCL+ATZ a quantidade de H₂O₂ foi 40,3% e 27% superior ao CTL e ZN+ATZ, respectivamente. Para ATZ, as quantidades de H₂O₂ foram 29,6% e 17,2% acima de CTL e ZN+ATZ. Não houve diferença na quantidade de H₂O₂ entre as plantas do CTL e aplicadas com ZN+ATZ neste tempo. Já no último tempo de avaliação, não houve diferença na quantidade de H₂O₂ das plantas tratadas com as três formulações contendo atrazina em relação ao CTL. Tanto em plantas tratadas com ATZ quanto PCL+ATZ pode ser observada semelhanças de comportamento com o passar do tempo e as quantidades de H₂O₂. Nos tempos de 24 e 48 HAA, a quantidade de H₂O₂ foram semelhantes, com redução de 22,9% em ATZ e 27,6% em PCL+ATZ ao chegar às 72 HAA. Para a aplicação de ZN+ATZ, não houve diferença entre as quantidades de H₂O₂ encontradas nos três tempos de avaliação.

De maneira geral, com 24 HAA houve semelhança entre todos os tratamentos para a quantidade de MDA das plantas de *B. pilosa* (Figura 17b), com a exceção de ZN+ATZ apresentar quantidade de MDA 25,9% acima de PCL+ATZ. Às 48 HAA, as maiores quantidades de MDA foram encontradas em plantas aplicadas com ATZ e ZN+ATZ. A quantidade de MDA em ATZ foi 28,9% e 54,9% acima do CTL e PCL+ATZ, respectivamente. Em plantas aplicadas com ZN+ATZ, a quantidade de MDA foi 38% e 65,7% acima do CTL e PCL+ATZ. Neste tempo, a quantidade de MDA nas plantas aplicadas com PCL+ATZ foi 16,7% inferior à do CTL. Com 72 HAA, as plantas que receberam aplicação de ATZ e PCL+ATZ permaneceram como àquelas com a maior quantidade de MDA. Em ATZ a quantidade de MDA foi 29,2% e 30,8% superior ao CTL e PCL+ATZ, respectivamente. Em ZN+ATZ, a quantidade de MDA foi 41,9% e 43,6% superior ao CTL e PCL+ATZ. Tanto para a aplicação de ATZ quanto ZN+ATZ, ocorreu aumento da quantidade de MDA nas plantas do tempo de 24 para 48 HAA, de 30% e 22%, respectivamente, com estabilização as 72 HAA. Para plantas aplicadas com PCL+ATZ, não diferença na quantidade de MDA entre os tempos avaliados.

Com 24 HAA, a maior porcentagem de extravasamento de eletrólitos (EE) foi observada nas plantas que receberam aplicação de PCL+ATZ, ficando 6,5% acima das plantas do CTL e 7,7% e 8,2% maior que das plantas aplicadas com ATZ e ZN+ATZ, respectivamente (Figura 17c). O EE das plantas aplicadas com ATZ e ZN+ATZ não diferiram do CTL. Às 48 HAA, o maior EE continuou a ocorrer em plantas aplicadas com PCL+ATZ, com 7,7% acima do CTL, e ganhos de 7,6% e 4,1% sobre ATZ e ZN+ATZ, respectivamente. Nesse tempo, ZN+ATZ diferiu de ATZ, com ganho de 3,5%. O EE gerado pela aplicação de ATZ não foi suficiente para diferir do CTL. No último tempo de avaliação, às 72 HAA, o EE gerado pela aplicação de PCL+ATZ foi 10,7% maior que o encontrado em CTL e 6,4% acima do gerado pela aplicação de ATZ. O EE gerado pela aplicação de ZN+ATZ (10,7%) não diferiu de ATZ nem PCL+ATZ, superando apenas o CTL em 6,4%. Apenas neste último tempo o EE gerado por ATZ diferiu de CTL, em 4,3%. Apenas a formulação PCL+ATZ apresentou aumento na porcentagem de EE entre os três tempos avaliados, sendo o aumento de 1,2% de 24 para 48 HAA e 3% até 72 HAA. Para ATZ, houve semelhança de EE entre os tempos 24 e 48 HAA, com aumento de 4,2% para 72 HAA. Já para ZN+ATZ, o principal aumento de EE ocorreu de 24 para 48 HAA, em 5,2%, e assim o EE permaneceu semelhante as 72 HAA.

Figura 17. Marcadores de estresse oxidativo **(a)** peróxido de hidrogênio (H_2O_2), **(b)** malondialdeído (MDA) e **(c)** extravasamento de eletrólitos (EE) em plantas de *Bidens pilosa* sem aplicação de atrazina (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha^{-1} ; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.



Fonte: O próprio autor.

4.4.4. Atividades Enzimáticas

A atividade da Ascorbato Peroxidase (APX) foi reduzida nas plantas de *R. sativus* logo às 24 HAA das formulações contendo atrazina em relação ao CTL (Figura 18a). A maior redução ocorreu nas plantas tratadas com PCL+ATZ, 72,8% menor em relação ao CTL. A atividade de APX nas plantas que receberam aplicação de ATZ ou ZN+ATZ foi semelhante tanto ao CTL (maior) quanto a PCL+ATZ (menor). Às 48 HAA, não houve diferença de atividade de APX entre as plantas do CTL e das aplicadas com ATZ, PCL+ATZ ou ZN+ATZ. No último período, as 72 HAA, a aplicação de ATZ, PCL+ATZ e ZN+ATZ levaram a reduções na atividade de APX em 43,8%,

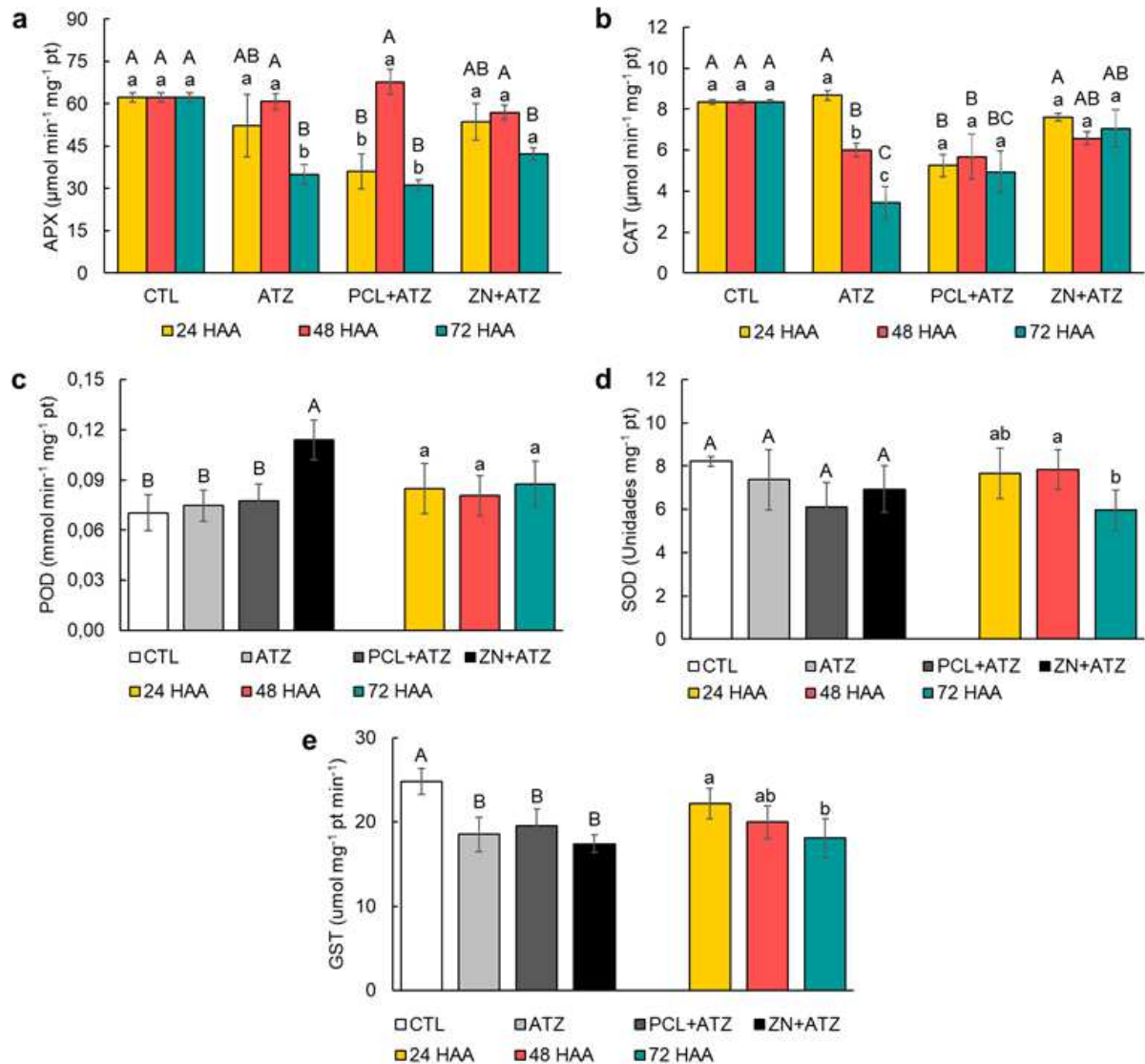
49,9% e 32,3% em relação ao CTL. Tanto para a aplicação de ATZ quanto ZN+ATZ, a atividade de APX foi semelhante as 24 e 48 HAA, com redução apenas as 72 HAA, de 42,5% em ATZ e 26% em ZN+ATZ; Já para a aplicação de PCL+ATZ, ocorreu um pico de atividade de APX às 48 HAA (aumento de 88% da atividade em relação às 24 HAA, seguido de uma queda de 54% às 72 HAA).

Para a atividade da catalase (CAT), de maneira geral a aplicação das formulações contendo atrazina levou a reduções nas plantas de *R. sativus* (Figura 18b). Às 24 HAA a aplicação de PCL+ATZ reduziu em 37% a atividade de CAT em relação ao CTL, 39,5% em relação a ATZ e 31% em relação a ZN+ATZ. Nesse tempo, a atividade de CAT das plantas aplicadas com ATZ ou ZN+ATZ não diferiu das plantas CTL. Com 48 HAA, houve redução na atividade de CAT nas plantas aplicadas com ATZ e PCL+ATZ em relação ao CTL, em 28% e 31,8%, respectivamente. Nesse período, a atividade de CAT nas plantas aplicadas com ZN+ATZ não diferiu de CTL nem de ATZ e PCL+ATZ. Às 72 HAA, a atividade de CAT registrada para plantas aplicadas com ATZ foi 58,7% menor que o CTL e 51,2% menor que em ZN+ATZ. Em plantas aplicadas com PCL+ATZ, houve redução de 40,8% na atividade de CAT em relação ao CTL, porém, não diferiu da atividade em ATZ e ZN+ATZ. Nesse último período, a atividade de CAT foi semelhante entre as plantas CTL e àquelas aplicadas com ZN+ATZ e PCL+ATZ, contudo, em plantas aplicadas com ZN+ATZ a atividade foi 105% maior que as aplicadas com ATZ. A aplicação de ATZ levou a uma decrescente de atividade de CAT nas plantas com o passar do tempo, sendo em 72 HAA uma atividade 60,3% menor em relação a 24 HAA; enquanto que a aplicação de PCL+ATZ ou ZN+ATZ mantiveram os níveis de atividade de CAT semelhantes nos três períodos de avaliação.

Para a atividade das Peroxidases (POD), independente do período de avaliação, a maior atividade enzimática foi encontrada em plantas aplicadas com ZN+ATZ (Figura 18c). A aplicação de ZN+ATZ gerou aumento da atividade de POD nas plantas de 62,3% em relação CTL e foi 52,9% e 46,9% maior àquelas aplicadas com ATZ ou PCL+ATZ, respectivamente. Todavia, não houve diferença na atividade de POD entre os períodos de avaliação. Em plantas de *R. sativus*, atividade de Superóxido Dismutase (SOD) não foi alterada pela aplicação das três formulações contendo atrazina (Figura 18d). No entanto, com o passar do tempo das avaliações foi observada um discreto aumento (2,2%) no às 48 HAA em relação a 24 HAA; com redução de 23,9% às 72 HAA. A atividade de Glutathione S-transferase (GST) foi

reduzida em relação ao CTL pela aplicação das três formulações contendo atrazina, independente do período de aplicação (Figura 18e). As formulações ATZ, PCL+ATZ e ZN+ATZ levaram a reduções de atividade de GST nas plantas em 25,3%, 21,1% e 29,8%, respectivamente. Independente da formulação, ocorreu uma decrescente de atividade de GST com o passar do tempo, ocorrendo em 72 HAA plantas com atividade 18,5% menor que em 24 HAA.

Figura 18. Atividade da (a) ascorbato peroxidase (APX), (b) catalase (CAT), (c) peroxidases (POD) e (d) superóxido dismutase (SOD) e (e) glutationa S-transferase (GST), em plantas de *Raphanus sativus* sem aplicação de atrazina (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Em (a) e (b), letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento por teste Tukey $p \leq 0,05$. Em (c), (d) e (e), letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos independente do tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos independente do tratamento por teste Tukey $p \leq 0,05$.



Fonte: O próprio autor.

A atividade enzimática de APX nas plantas de *B. pilosa* (Figura 19a) no tempo de 24 HAA foi alterada apenas pela aplicação de ZN+ATZ. Em relação ao CTL, ATZ e PCL+ATZ, a atividade de APX nas plantas aplicadas com ZN+ATZ foi 4, 4,4 e 3,4 vezes maior, respectivamente. No tempo de 48 HAA, a atividade de APX foi novamente alterada apenas em plantas aplicadas com ZN+ATZ, diferindo de CTL, ATZ e PCL+ATZ, com atividade 2,5, 3,1 e 4 vezes maior, respectivamente. Às 72 HAA, de modo geral, a atividade de APX foi semelhante entre todos os tratamentos. Contudo, a atividade das plantas aplicadas com ZN+ATZ ainda foi 74,3% maior que naquelas aplicadas com ATZ. As plantas apresentaram comportamentos diferentes para a atividade de APX após a aplicação de cada uma das três formulações. Em plantas aplicadas com ATZ não houve diferença de atividade entre os três tempos. Para a aplicação de PCL+ATZ, houve uma redução de 39,3% de atividade das 24 para 48 HAA, porém, as 72 HAA houve um pequeno incremento (25,8%), retornando ao nível semelhante à 24 HAA. A atividade de APX nas plantas aplicadas com ZN+ATZ foi semelhante nos tempos de 24 e 48 HAA, com uma redução de 62,8% às 72 HAA.

Para a enzima CAT (Figura 19b), no tempo de 24 HAA a maior atividade foi registrada em plantas aplicadas com ZN+ATZ, que diferiu da atividade das plantas do CTL, ATZ e PCL+ATZ, respectivamente, 4,8, 9 e 12 vezes maior. Às 48 HAA, a atividade de APX em plantas aplicadas com ZN+ATZ e ATZ foram semelhantes e diferiram da atividade das plantas do CTL. Para ZN+ATZ a diferença foi de 1,2 vezes para mais, e em ATZ a diferença ficou em 3 vezes para mais. A atividade de CAT nas plantas aplicadas com PCL+ATZ não diferiu de CTL, mas também foi semelhante aos demais tratamentos. Por fim, às 72 HAA a atividade de CAT foi semelhante entre as plantas de todos os tratamentos. Em plantas aplicadas com ATZ, ocorreu um pico de atividade de CAT com o passar do tempo, com um aumento de 272% das 24 para 48 HAA, seguido de uma redução de 45,6% ao chegar em 72 HAA. A aplicação de PCL+ATZ elevou a atividade de CAT das plantas em 3,3 vezes de 24 para 48 HAA, que permaneceu estável no tempo de 72 HAA. Já em plantas aplicadas com ZN+ATZ, a atividade de CAT foi semelhante às 24 e 48 HAA, com redução de 75,6% às 72 HAA.

A maior atividade enzimática de POD nas plantas de *B. pilosa*, às 24 HAA, ocorreu em plantas aplicadas com ZN+ATZ (Figura 19c), ficando acima da atividade das plantas do CTL em 166%, e das aplicadas com ATZ e PCL+ATZ em

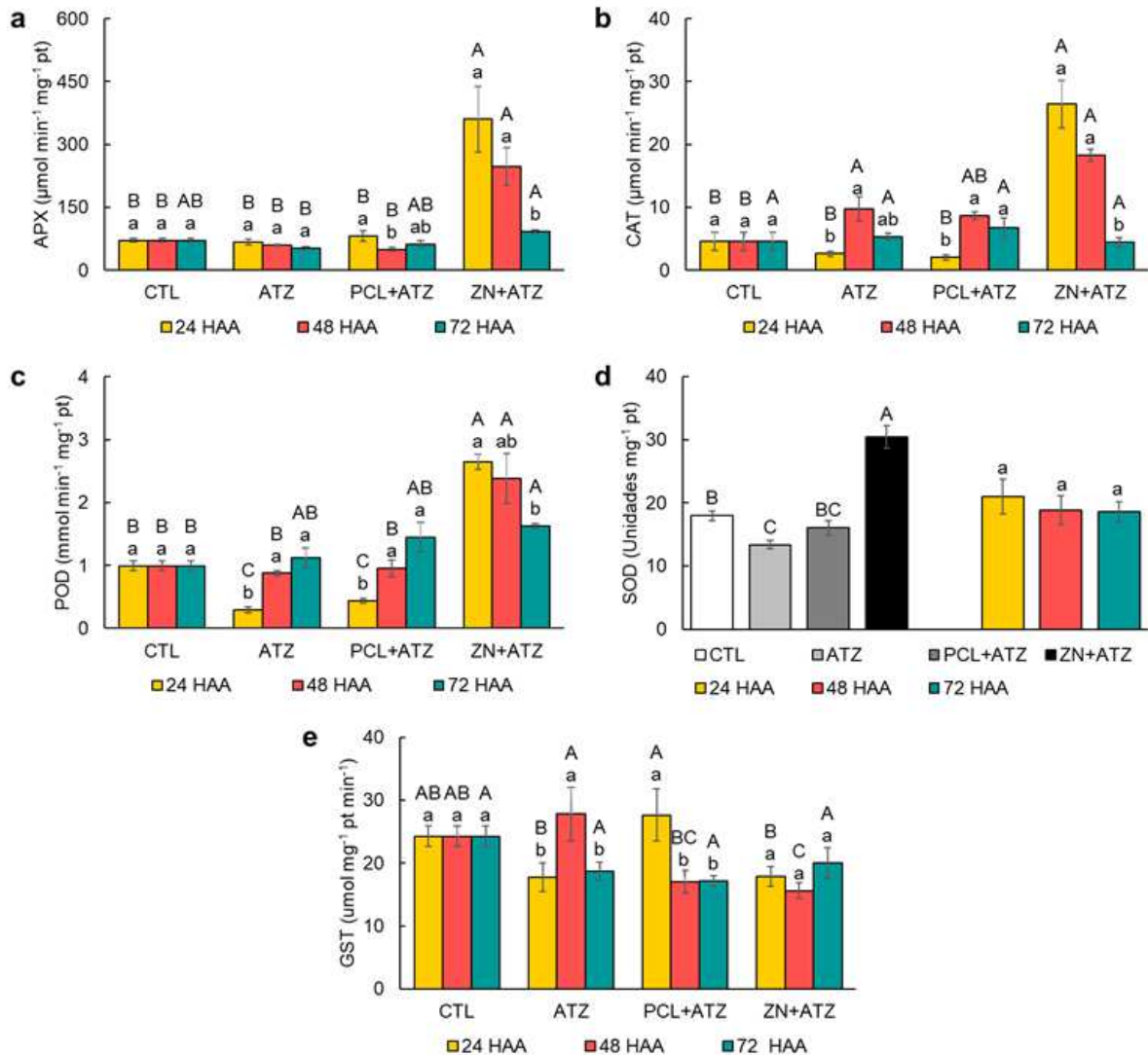
805% e 502%, respectivamente. A aplicação de ATZ e PCL+ATZ reduziu a atividade de POD nesse tempo em relação ao CTL, sendo 70,6% e 55,8% menor, respectivamente. Com 48 HAA, a atividade de POD foi semelhante entre as plantas do tratamentos CTL, ATZ e PCL+ATZ. Todavia, em plantas aplicadas com ZN+ATZ a atividade de POD foi superior aos demais tratamentos, sendo 1,4, 1,7 e 1,5 vezes maior que em CTL, ATZ e PCL+ATZ, respectivamente. Às 72 HAA, de maneira geral, todos os tratamentos apresentaram semelhanças para a atividade de POD, contudo, em plantas aplicadas com ZN+ATZ a atividade foi 63,5% maior que em plantas CTL. Tanto na aplicação de ATZ quanto PCL+ATZ, houve incremento na atividade de POD do tempo 24 para 48 HAA, na ordem de 2 e 1,2 vezes, respectivamente, sem alterações na atividade até às 72 HAA. Para a aplicação de ZN+ATZ, a atividade de POD nas plantas foi decrescente com o passar do tempo, com queda de 10,1% de 24 para 48 HAA e 31,6% para 72 HAA.

Para a atividade de SOD não houve interação entre os fatores estudados, assim, independentemente do tempo avaliado, a maior atividade de SOD foi encontrada nas plantas aplicadas com ZN+ATZ (Figura 19d). Dessa forma, nas plantas aplicadas com ZN+ATZ a atividade de SOD foi 69,7%, 127% e 89,9% maior que nas plantas CTL e nas aplicadas com ATZ e PCL+ATZ, respectivamente. A atividade de SOD em plantas aplicadas com PCL+ATZ não diferiu de ATZ nem do CTL, contudo, em plantas aplicadas com ATZ a atividade de SOD foi 25,5% menor que do CTL. Independentemente do tratamento, não houve diferença na atividade de SOD nas plantas entre os três tempos de avaliação.

Com 24 HAA, a aplicação de PCL+ATZ, induziu a atividade de GST 55,8% maior que em que em ATZ e 54,6% maior que em ZN+ATZ (Figura 19e). Todavia, nesse tempo, a atividade de GST em plantas CTL não diferiu das plantas aplicadas com as três formulações contendo atrazina. Às 48 HAA, a atividade de GST das plantas aplicadas com ATZ foi 63,5% e 77,9% maior que das aplicadas com PCL+ATZ e ZN+ATZ, respectivamente. Em plantas aplicadas com PCL+ATZ, atividade de GST foi semelhante as plantas do CTL e àquelas aplicadas com ZN+ATZ. Apenas a aplicação de ZN+ATZ reduziu a atividade de GST em 55,4% em relação às plantas CTL. No tempo de 72 HAA não houve diferença entre os tratamentos para a atividade de GST nas plantas de *B. pilosa*. As três formulações induziram comportamentos diferentes após aplicação nas plantas. Nas plantas aplicadas com ATZ ocorreu um pico de atividade de GST, com um aumento de 56,7% de 24 para 48

HAA, e um recuo de 32,8% de atividade às 72 HAA. Para a aplicação de PCL+ATZ, às 48 HAA ocorreu uma redução de 38,5% de atividade em relação à 24 HAA, não havendo diferença de atividade entre 48 e 72 HAA. Em plantas aplicadas com ZN+ATZ, não houve diferença de atividade de GST entre os três tempos avaliados.

Figura 19. Atividade da (a) ascorbato peroxidase (APX), (b) catalase (CAT), (c) peroxidases (POD) e (d) superóxido dismutase (SOD) e (e) glutationa S-transferase (GST) em plantas de *Bidens pilosa* sem aplicação de atrazina (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹; nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA). Em (a), (b), (c) e (d), letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos de um mesmo tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$. Em (e), letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos independente do tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tempos independente do tratamento pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.



Fonte: O próprio autor.

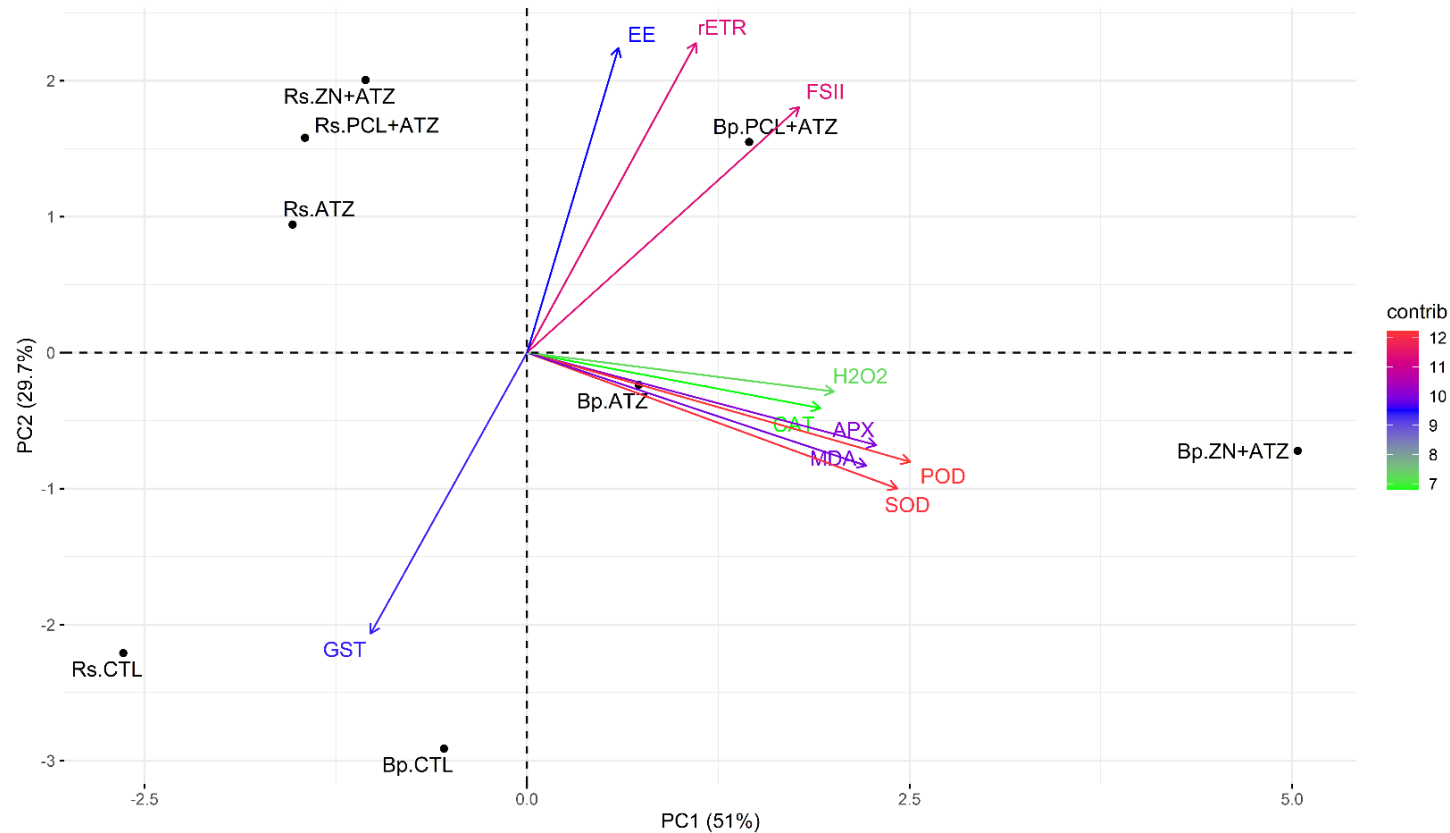
4.4.5. Análise de Componentes Principais e Mapa de Calor

Por meio da análise de componentes principais (Figura 20), pode ser observado o comportamento diferenciado entre as duas espécies de plantas daninhas após a aplicação das formulações contendo atrazina, que contribui para explicar 80,7% dos resultados. Os tratamentos, assim como as espécies, ficaram distribuídos entre os quatro quadrantes da análise. Quanto à contribuição das variáveis na análise de componentes principais, as variáveis de quantidade de H₂O₂ e atividade de CAT apresentaram baixa contribuição (baixa variação). Por outro lado, as variáveis atividade de POD e SOD e inibições do FSII e rETR apresentaram as maiores contribuições para os resultados obtidos com esta análise (variáveis com maior variação).

O tratamento PCL+ATZ em *B. pilosa* ficou alocado no quadrante com correlação positiva às variáveis inibição do FSII, inibição da rETR e EE. As variáveis atividade de APX, CAT, SOD e POD e as quantidades de MDA e H₂O₂ correlacionaram-se positivamente com o tratamento ZN+ATZ nas plantas de *B. pilosa*, indicando a maior variação nesse tratamento/espécie. Apesar de o tratamento com ATZ em *B. pilosa* estar alocado no mesmo quadrante que ZN+ATZ, sua proximidade ao eixo mostra baixa correlação aos vetores com os vetores. Já a atividade de GST ocupou o mesmo quadrante no qual estão alocados os CTL's de ambas espécies. Para essa variável há uma correlação negativa com as variáveis EE e inibição do F_v/F_m e rETR.

Quanto a espécies *R. sativus*, os tratamentos ATZ, PCL+ATZ e ZN+ATZ apresentaram correlação negativa com às atividades de APX, CAT, POD e SOD, assim como a quantidade acumulada de MDA e H₂O₂ nas plantas. Houve maior distanciamento entre os tratamento ATZ e PCL+ATZ e ZN+ATZ nas plantas de *B. pilosa* em comparação as plantas de *R. sativus*.

Figura 20. Análise de componentes principais (PCA) das variáveis fisiológicas e bioquímicas avaliadas em plantas de *Raphanus sativus* e *Bidens pilosa* sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹.



Bp.; *Bidens pilosa*; Rs.: *Raphanus sativus*; APX: Ascorbato peroxidase; CAT: catalase; EE: Extravasamento de eletrólitos; FSII: inibição do fotossistema II; GST: Glutaciona S-transferase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; MDA: Malondialdeído; POD: peroxidase; rETR: Inibição da rETR; SOD: Superóxido dismutase.

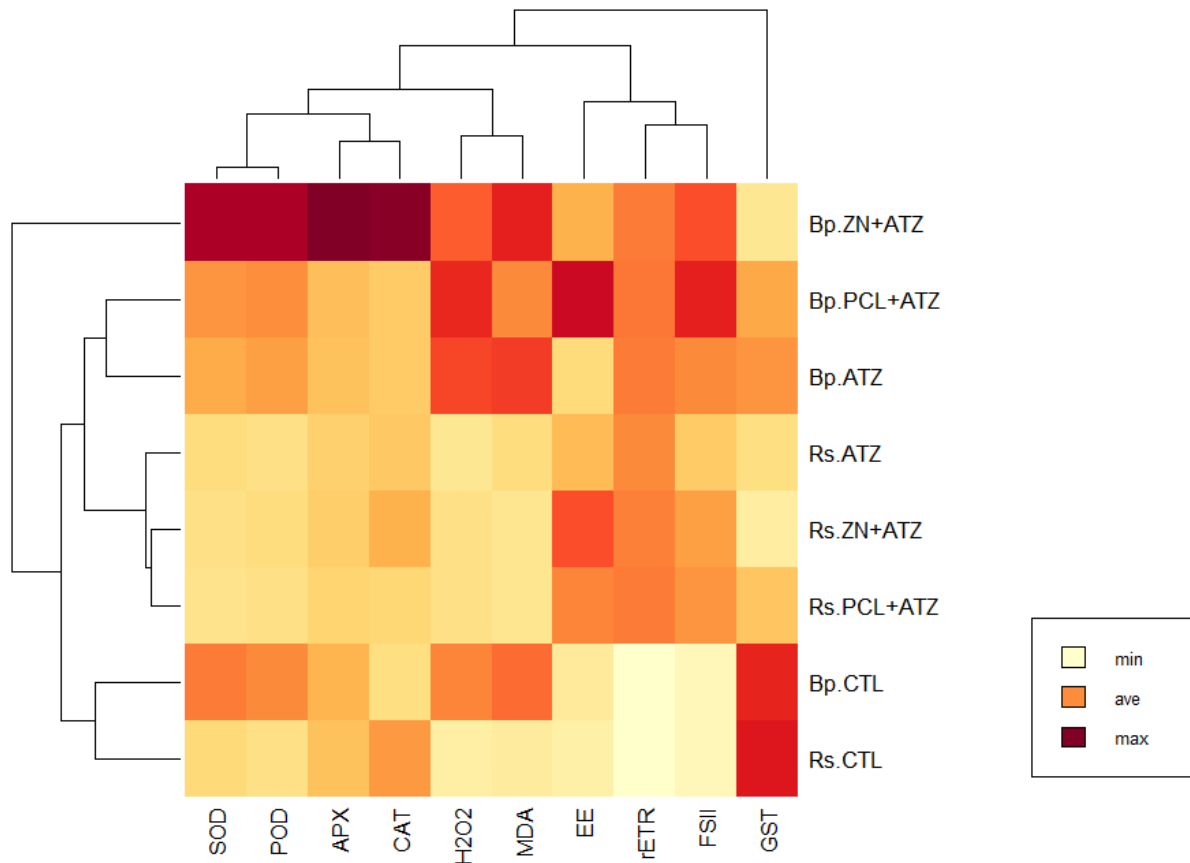
Fonte: O próprio autor.

No mapa de calor (Figura 21), é possível observar a clara divisão de três maiores grupos (em linhas) quanto aos tratamentos das duas espécies. O primeiro grupo (na seção superior) compreende a espécie *B. pilosa* com a aplicação das três formulações contendo atrazina, o segundo grupo compreende a espécie *R. sativus* com a aplicação das três formulações, e o terceiro grupo compreende os CTL's das duas espécies. Quanto as variáveis avaliadas, três grandes grupos também podem ser observados (em colunas). O primeiro grupo (da esquerda para direita) compreende a atividade das enzimas antioxidantes SOD, POD, APX e CAT, o segundo grupo compreende as quantidades de H₂O₂ e MDA e EE, e o terceiro grupo com as variáveis de inibição da rETR, inibição do FSII e atividade de GST.

No grupo formado pela espécie *B. pilosa* pode ser observado o maior distanciamento da formulação ZN+ATZ em relação a ATZ, o qual foi formado principalmente pelo agrupamento de correlação positiva com a atividade das enzimas de atividade antioxidante (APX, CAT, POD e SOD), quantidade dos marcadores de estresse H₂O₂ e MDA e inibições do FSII e rETR. Já no grupo formado pela espécie *R. sativus* o maior distanciamento de ATZ foi representado pela formulação PCL+ATZ. A formação deste grupo se deu pela correlação negativa com as enzimas antioxidantes e positiva com EE e inibições do FSII e rETR.

O agrupamento do tratamento CTL de ambas espécies ocorreu basicamente pela correlação positiva das plantas não aplicadas com a atividade da enzima GST, e correlação negativa com EE e as inibições do FSII e da rETR.

Figura 21. Mapa de calor das variáveis fisiológicas e bioquímicas avaliadas em plantas de *Raphanus sativus* e *Bidens pilosa* sem aplicação (CTL) e com aplicação de atrazina nas formulações: convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ) na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹.



Bp.; *Bidens pilosa*; Rs.: *Raphanus sativus*; APX: Ascorbato peroxidase; CAT: catalase; DC: Dienos conjugados; EE: Extravasamento de eletrólitos; FSII: inibição do fotossistema II; GST: Glutathione S-transferase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; MDA: Malondialdeído; POD: peroxidase; rETR: Inibição da rETR; SOD: Superóxido dismutase. Os agrupamentos foram gerados aplicando a distância de Euclidean como medida de dissimilaridade e a distância média como método de aglomeração. O agrupamento resultante teve uma correlação de cofenética de 0,9285. **Fonte:** O próprio autor.

4.5. DISCUSSÃO

Os nanossistemas carreadores de ingredientes ativos constituídos por nanocápsulas poliméricas tem sido desenvolvido com intuito de proporcionar aumento de eficiência do ingrediente ativo, melhorar a sua absorção e translocação e gerar

entrega gradual (OLIVEIRA; RISTROPH, 2024). Dentre essas características citadas, no presente estudo foi avaliada somente o aumento da eficiência do ingrediente ativo. Tanto a formulação com nanocápsulas do polímero PCL quanto zeína, aumentaram a eficiência do ingrediente ativo atrazina na inibição da atividade do FSII das plantas de ambas espécies avaliadas. Nas plantas de *R. sativus* (menos suscetível aos efeitos da atrazina), independente do período de aplicação, PCL+ATZ e ZN+ATZ promoveram ganhos sobre ATZ na inibição do FSII. Já em plantas de *B. pilosa* (mais suscetível aos efeitos da atrazina), o ganho em inibição do FSII proporcionada por PCL+ATZ sobre ATZ encontrado as 24 HAA, foi proporcionada por ZN+ATZ as 48 HAA.

A formulação composta por nanocápsulas de PCL+ATZ tem demonstrado aumento da eficiência herbicida de atrazina em aplicações foliares (pós-emergente) de plantas daninhas. Já foram relatados ganhos de inibição do FSII em plantas de *Brassica juncea*, *Amaranthus viridis*, *B. pilosa*, *Digitaria insularis* (tolerante a atrazina), *Raphanus raphanistrum*, e *Alternanthera tenella*. (OLIVEIRA et al., 2015; SOUSA et al., 2018; SOUSA et al., 2020; TAKESHITA et al., 2021; SOUSA et al., 2022). Os ganhos são atribuídos às características da formulação como, maior adesão das gotas às folhas, entrada facilitada por aberturas naturais das folhas (como hidatódios e estômatos), mais rápida penetração e chegada ao mesofilo foliar e translocação para tecidos jovens (BOMBO et al., 2019; TAKESHITA et al., 2021). Entretanto, a espécie, assim como o estágio de aplicação ainda exercem influência na eficiência da formulação de nanoatrazina (SOUSA et al., 2022).

Ainda não são relatados na literatura resultados da aplicação de nanocápsulas de ZN+ATZ em pós-emergência de plantas daninhas para efeito de comparação dos ganhos em eficiência herbicida. Contudo, quando aplicada diretamente ao solo na modalidade de pré-emergência, foi possível reduzir em 80 vezes a dose de ZN+ATZ sem comprometer o controle de plantas de *B. juncea* (CARVALHO et al., 2023). Esse resultado corrobora sua maior eficiência perante PCL+ATZ, que anteriormente foi relatada a possibilidade de redução de 10 vezes a dose sem comprometer o controle pré-emergente de *B. juncea* (PREISLER et al., 2020).

Como reflexo da maior e mais rápida inibição do FSII proporcionado pelas formulações PCL+ATZ e ZN+ATZ em comparação a ATZ, também puderam ser

vistos sintomas de necrose das folhas das plantas que receberam a aplicação dessas formulações, característicos da morte de células e tecidos gerados pela atrazina (KARAM; OLIVEIRA, 2007). Em ambas espécies avaliadas, logo as 48 HAA, as plantas aplicadas com PCL+ATZ apresentaram sintomas que foram intensificados as 72 HAA, enquanto os sintomas da aplicação de ZN+ATZ puderam ser observados a partir das 72 HAA. Em folhas de *B. juncea* constatou-se que a absorção de PCL+ATZ ocorre mais rapidamente que a absorção de ATZ. Com 24 HAA, 80% da quantidade de ingrediente ativo aplicado pela formulação de PCL+ATZ foi absorvido, ante 40% aplicado pela formulação ATZ (TAKESHITA et al., 2021). A maior e mais rápida absorção do ingrediente ativo quando nanoencapsulado por PCL é favorecida pela entrada por estômatos (BOMBO et al., 2019), todavia, ainda não foram realizados estudos quanto as características de absorção foliar da formulação ZN+ATZ para efeito de comparação.

Os sintomas da aplicação de ATZ não foram observados nas plantas de *R. sativus* em nenhum dos tempos de avaliação, porém, nas plantas de *B. pilosa* apareceram em baixa intensidade somente as 72 HAA. A partir dessas observações, é possível ratificar a menor eficiência de ATZ ante PCL+ATZ e ZN+ATZ, já observados na inibição do FSII e rETR. Também, é possível colocar em evidência a maior suscetibilidade de *B. pilosa* ao ingrediente ativo atrazina em comparação *R. sativus* apresentada como hipótese. Segundo Fuerst et al. (1986), o grau de inibição do transporte de elétrons por herbicidas inibidores do FSII é altamente correlacionado à lesão herbicida. Resultado semelhante foi encontrado no presente trabalho, onde puderam ser observadas maiores porcentagens de inibição do FSII nas plantas de *B. pilosa* (de até 78%) em relação a *R. sativus* (até 41%), com maior ocorrência de sintomas da aplicação de atrazina (independentemente da formulação) em *B. pilosa*.

Tanto para a aplicação de ATZ quanto PCL+ATZ, puderam ser observados aumentos nos marcadores de estresse oxidativo em ambas espécies avaliadas. As observações de manifestação de sintomas de necrose corroboram as maiores quantidades de H₂O₂ presentes nas plantas de ambas espécies as 24 HAA e 48 HAA de PCL+ATZ. A aplicação de ZN+ATZ levou ao aumento da quantidade de MDA nas plantas de ambas espécies, sem alterar a quantidade de H₂O₂. A quantidade estável de H₂O₂ após a aplicação de ZN+ATZ pode ser resultado do baixo acúmulo desta molécula pelas plantas, seja pela rápida conversão em radical hidroxila ([•]OH)

que apresenta alta reatividade (MATTOS et al., 2003) ou pela eliminação por meio da ação de enzimas como APX, CAT e POD. Estes resultados também podem indicar que a maior parte do dano oxidativo observado após a aplicação de ZN+ATZ esteja sendo causado por $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou $\cdot\text{OH}$. Em plantas de alface (*L. sativa*) que cresceram em substrato contendo PCL+ATZ, ocorreu maior estresse oxidativo em comparação as plantas que cresceram com atrazina convencional, aumentando a quantidade de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e MDA (WU et al., 2021). A peroxidação lipídica está relacionada a um processo contínuo, com alta rotatividade e autocatálise (MUELLER, 2004), sendo o malondialdeído (MDA) um produto secundário da peroxidação lipídica, formado durante a oxidação dos ácidos graxos poli insaturados (LIMA, ABDALLA, 2001). Esse composto parece ser rapidamente metabolizado pelas plantas, com tempo de meia vida estimado em 60 minutos nas folhas de plantas de *Arabidopsis* (WEBER et al., 2004).

Em plantas de *R. sativus*, de maneira geral, a aplicação das três formulações (ATZ, PCL e ZN+ATZ) não resultaram em incrementos de atividade das enzimas antioxidantes APX e CAT em relação ao CTL, e que foram reduzidas com o passar do tempo. Apenas a atividade das POD, que tende a ser um melhor marcador de estresse oxidativo (tanto biótico quanto abiótico) (TIECHER, 2016), foi aumentada apenas após a aplicação de ZN+ATZ (independentemente do período avaliado), enquanto a atividade de SOD, independentemente da formulação, teve a atividade reduzida com o passar do tempo. Segundo Barbosa et al. (2014), quanto mais grave a situação de estresse enfrentada pela planta, maior a atividade das POD.

Já nas plantas de *B. pilosa*, a atividade das enzimas antioxidantes APX, CAT e POD foi incrementada com aplicação de ZN+ATZ apenas na avaliação inicial, sendo reduzidas com o passar do tempo. Já a aplicação de ATZ e PCL+ATZ promoveram incrementos graduais na atividade de POD com o passar do tempo. A atividade de SOD foi inibida com a aplicação de ATZ, enquanto ZN+ATZ incrementou, independentemente do tempo de avaliação. Corroborando os resultados de marcadores de estresse oxidativo, possivelmente, a aplicação de ZN+ATZ nas plantas de *B. pilosa* tenham desencadeado a maior formação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (não quantificado neste trabalho) logo as 24 HAA, despertando a maior atividade de SOD, enzima esta que atua na linha de frente da defesa contra o estresse oxidativo na dismutação dos radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$ gerando H_2O_2 (BARBOSA et al., 2014). Assim, quanto maior a quantidade

de H₂O₂ gerado, mais grave a situação de estresse enfrentada pela planta, dependendo da maior atividade das enzimas APX, CAT e POD que atuam em conjunto no citosol e nos plastídeos das células no combate ao H₂O₂ gerado pela ação da SOD (BREUSEGEM et al., 2001; MITTLER, 2002; ASADA, 2006; LOCATO et al., 2010; SHARMA et al., 2012; BARBOSA et al., 2014).

A atividade das enzimas antioxidantes parece ser dependente tanto da dose de atrazina aplicada quanto da espécie alvo da aplicação. Por exemplo, em plantas da espécie *Setaria italica* L. que cresceram em substrato contendo de 2,5 até 32,5 mg/kg de atrazina, o aumento de dose do ingrediente ativo incrementou a atividade de APX e POD, enquanto reduziu a atividade de CAT e SOD (SHER et al., 2021). Resultados semelhantes foram encontrados em plantas da espécie *Pennisetum americanum*, que cresceram em substrato contendo atrazina de 5 a 50 mg/kg (ERINLE et al., 2018). Em plantas de *Arabidopsis thaliana* a aplicação de atrazina reprimiu a expressão de SOD (RAMEL et al., 2009), enquanto em plantas de arroz (*Oriza sativa*) a atividade de SOD, CAT e POD foram incrementadas (ZHANG et al., 2014). Em plantas de alface (*L. sativa*) que cresceram em solo contendo PCL+ATZ, foi encontrada maior atividade enzimática antioxidante de APX, CAT, SOD e POD em comparação as plantas que cresceram no solo contendo ATZ (WU et al., 2021). A determinação da tolerância à atrazina pode estar relacionada a eficiência da atividade do sistema de inativação e/ou eliminação de ¹O₂ (RAMEL et al., 2009).

No presente estudo, a maior atividade enzimática de combate ao estresse oxidativo ocorreu em plantas de *B. pilosa* (principalmente após a aplicação da formulação ZN+ATZ). Todavia, esperava-se que a maior atividade de defesa após a aplicação de atrazina ocorresse em plantas de *R. sativus*, devido a maior tolerância à atrazina nanoencapsulada em plantas do gênero *Raphanus* em comparação as plantas de *B. pilosa* (SOUSA et al., 2018; TAKESHITA et al., 2021). Contudo, quando o herbicida é aplicado em doses altas, é possível que os sistemas de defesa das plantas mais tolerantes fiquem sobrecarregados (FUERST et al., 1986).

A resposta de atividade de GST's das plantas de ambas espécies foi baixa ou nula, e até reduzida em relação ao CTL após a aplicação de atrazina. O grau de suscetibilidade das duas espécies à atrazina parece não ser comandado unicamente pela atividade dessa enzima, e outros mecanismos de detoxificação de também podem estar atuando nas plantas, como a hidroxilação (CHERIFI et al., 2001;

EVANS JUNIOR et al., 2017). Por outro lado, as moléculas de H₂O₂ têm poder de inativar enzimas por meio da oxidação de grupo tiol reativos (BARREIROS; DAVID, 2006), como os presentes na glutathione da enzima GST (DIXON; SKIPSEY; EDWARDS, 2010).

Apesar das plantas aplicadas com ATZ apresentarem aumento nas quantidades de H₂O₂, dienos conjugados e MDA, foram elas que apresentaram as menores reduções de atividade do FSII e extravasamento de eletrólitos (em ambas espécies). Também não foram observados aumentos expressivos na atividade de enzimas antioxidantes de defesa ou detoxificante após a aplicação de ATZ. A chegada da molécula de atrazina não nanoencapsulada ao local de ação pode ser dificultada e/ou postergada, ficando retida em barreiras físicas da estrutura das folhas ou metabolizadas por outras vias além da GST, como a hidroxilação (CHERIFI et al., 2001; EVANS JUNIOR et al., 2017). A chegada mais lenta e em menor quantidade das moléculas de atrazina ao local de ação também pode permitir a recuperação dos centros de reação do FSII das plantas.

A proteína D1 apresenta naturalmente sensibilidade a luz, que acaba promovendo a sua oxidação (VASS; CSER, 2009), e devido aos danos, os centros de reação do FSII precisam ser regenerados constantemente (BARBOSA et al., 2014). Dessa maneira, haveria uma brecha entre a ação das moléculas de atrazina não nanoencapsuladas e a regeneração dos centros de reação, permitindo o maior aproveitamento de energia pelas plantas, menor dano oxidativo e maior disposição para regeneração dos danos causados pela peroxidação lipídica. Contudo, a maior ação herbicida das formulações de nanoatrazina pode estar relacionada a chegada do ingrediente ativo ao local de ação em maior quantidade e em menor tempo, como já observado para a formulação PCL+ATZ (TAKESHITA et al., 2021). Em plantas da espécie *P. americanum*, o gene que codifica a expressão da proteína D1 foi suprimido com doses elevadas de atrazina (ERINLE et al., 2018). Dessa forma, apesar de ATZ, PCL+ATZ e ZN+ATZ serem aplicadas em mesma dose (2000 g i.a.), a maior quantidade do ingrediente ativo chegando ao local de ação via nanocápsulas poderia também estar suprimindo o gene de expressão da proteína D1 e intensificando a ação herbicida.

Quando se fala em tolerância ou suscetibilidade à atrazina, a maioria dos trabalhos relacionam a capacidade inerente da espécie em detoxificação da

molécula herbicida, principalmente via GST (JACHETTA; RADOSEVICH, 1981; HATTON et al., 1996; EVANS JUNIOR et al., 2017). De fato, a maior presença de mecanismos de defesa contra estresse e metabolização de xenobióticos (como herbicidas) pode conferir maior tolerância (KREUZ; TOMMASINI; MARTINOIA, 1996). Todavia, além do metabolismo, a suscetibilidade das espécies pode ser influenciada por fatores ambientais como umidade relativa, temperatura e intensidade luminosa (HAMMERTON, 1967). Entre espécies, a comparação quanto a suscetibilidade vem acompanhada de outros fatores, sendo eles a capacidade de retenção da calda de aplicação na folha e as taxas de penetração, absorção e translocação (FUERST et al., 1986; HATTON et al., 1996; GAINES et al., 2020).

A utilização de nanocápsulas poliméricas como sistemas carreadores de ingredientes ativos mostram-se promissores, aumentando a eficiência da entrega do ingrediente ativo, proporcionando maior eficiência na aplicação, possibilidade de redução da quantidade de ingrediente ativo aplicada e assim, redução dos riscos de contaminação ambiental (BOMBO et al., 2019; KAH et al., 2018; PÉREZ-DE-LUQUE, 2017; WALKER et al., 2018). Contudo, diferenças na eficiência entre sistemas podem ser observadas de acordo com características como o tamanho das nanocápsulas, cargas elétricas (potencial zeta), perfil de liberação do i.a., retenção sobre as folhas, penetração e absorção.

As nanocápsulas de ZN+ATZ apresentam menor tamanho que as nanocápsulas de PCL+ATZ, característica que pode beneficiar a entrada por aberturas naturais das folhas. Enquanto a formulação ZN+ATZ é composta por nanocápsulas de potencial zeta positivo (≈ 12 mV), a formulação PCL+ATZ é composta por nanocápsulas com potencial zeta negativo (≈ -30 mV). O potencial zeta positivo das nanocápsulas de ZN+ATZ pode favorecer a adesão à superfície das folhas, que apresentam carga negativa (JETTER, KUNST, SAMUELS, 2006; YU et al., 2017), aumentando a chances de penetração e absorção do ingrediente ativo pelo tecido foliar. A adesão das nanocápsulas de ZN+ATZ foram observadas nas raízes das plantas de *Z. mays* e *B. juncea* em sistema de hidroponia (CARVALHO et al., 2023). Justamente por apresentar característica de adesão prolongada, as nanocápsulas de zeína são apresentadas como promotoras do aumento da eficiência de ingredientes ativos, que beneficia a entrega deste de maneira controlada e regular para as plantas-alvo da aplicação (KACSÓ et al., 2018). Já as nanocápsulas de PCL+ATZ com caráter

anfífilico, apresentam maior ângulo de contato e menor molhabilidade das folhas, entretanto, ainda conferem maior eficiência que a formulação ATZ (TAKESHITA et al., 2021).

A nanoencapsulação de atrazina consiste em uma metodologia promissora para aprimorar a sua atividade herbicida. Com o uso das nanocápsulas, mantém-se o mecanismo de ação de ingrediente ativo promovendo alterações em seu modo de ação, como por exemplo, a maior geração do estresse oxidativo. A aplicação de nanoatrazina nas plantas de *B. pilosa* (suscetíveis) resultou em maior inibição do FSII e desencadeou maior estímulo a atividade das enzimas de ação antioxidante e a mais rápida expressão de sintomas visuais da ação do herbicida que nas plantas de *R. sativus* (tolerantes). Desse modo, foi possível observar que o ganho em eficiência gerado pelo processo de nanoencapsulação ainda é dependente tanto da matriz polimérica utilizada quanto da espécie alvo da aplicação, e nesse ponto, as características morfofisiológicas de cada espécie serão determinantes para tal resultado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. In: Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**. COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Eds). v.105. Florida: Acad. Press; 1984. p.114–121.

ALBUQUERQUE, F.P.; OLIVEIRA, J.L.; MOSCHINI-CARLOS, V.; FRACETO, L.F. An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. **Science of the Total Environment**, v.700, p.1-9, 2020.

ALEXIEVA, V; SERGIEV, I; MAPELLI, S; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v.24, n.12, p.1337-1344, 2001.

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, n.4, p.1247-1257, 1995.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v.141, p.391-396, 2006.

AVELLAN, A.; YUN, J.; MORAIS, B.P.; CLEMENT, E.T.; RODRIGUES, S.M.; LOWRY, G.V. Critical review: Role of inorganic nanoparticle properties on their foliar

uptake and in planta translocation. **Environmental Science & Technology**, v.55, n.20, p.13417-13431, 2021.

BAKER, N.R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.89-113, 2008.

BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINA, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p.453-460, 2014.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.1-30.

BOMBO, A.B.; PEREIRA, A.E.S.; LUSA, M.G.; MEDEIROS OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R.; JESUS, M.B.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F.; MAYER, J.L.S. A mechanistic view of interactions of a nanoherbicide with target organism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.67, n.16, p.4453-4462, 2019.

BOWLER, C.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and Stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-116, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de ingrediente ativo**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 13 abr. 2020.

BREUSEGEM, F.V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.

BRIGHENTI, A.M. **Manual de identificação e manejo de plantas daninhas em cultivos de cana-de-açúcar**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2010, 212p.

CAMEJO, G.; WALLIN, B; ENOJÄRVI, M. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: AMSTRONG, D. (Ed.). **Free Radical and Antioxidants Protocols**. Human Press, Molndal, 1998, p.377–387.

CARVALHO, L. B.; GODOY, I. S.; PREISLER, A. C.; PROENÇA, P. L. F.; SARAIVA-SANTOS, T.; VERRI JR, W. A.; OLIVEIRA, H. C.; DALAZEN, G.; FRACETO, L. F. Pre-emergence herbicidal efficiency and uptake of atrazine-loaded zein nanoparticles: a sustainable alternative to weed control. **Environmental Science: Nano**, v.10, n.e.1629, 2023.

CATANEO, A.C.; DÉSTRO, G.F.G.; FERREIRA, L.C.; CHAMMA, K.L.; SOUSA, D.C.F. Atividade de glutatona s-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.307-312, 2003.

CHERIFI, M.; RAVETON, M.; PICCIOCCI, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Atrazine metabolism in corn seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.39, p.665–672, 2001.

DABROWSKA, G.; KATA, A.; GOC, A.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; SKRZYPEK, E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia**, v.49, n.1, p.7-17, 2007.

DAYAN, F.E.; BARKER, A.; BOUGH, R.; ORTIZ, M.; TAKANO, H.; DUKE, S.O. Herbicide Mechanisms of Action and Resistance. In: MOO-YOUNG, M. (E.). *Comprehensive Biotechnology*, 3ª edição, v.4, **Publisher Pergamon Elsevier**, p.23-35, 2019.

DE GARA, L. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.3, n.1-2, p.195-205, 2004.

DEVINE, M.D.; PRESTON, C. The molecular basis of herbicide resistance. In: COBB, A.; KIRKWOOD, R. (Eds.). **Herbicides and Their Mechanisms of Action**. Sheffield, U.K: Sheffield Academic Press. 2000. p.72–104.

DIXON, D.P.; SKIPSEY, M.; EDWARDS, R. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v.71, n.4, p.338-350, 2010.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. p.178-203.

ERINLE, K.O.; JIANG, Z.; MA, B.; UR-REHMAN, K.; SHAHLA, A.; ZHANG, Y. Physiological and molecular responses of pearl millet seedling to atrazine stress. **International Journal of Phytoremediation**, v.20, n.4, p.343-351, 2018.

EVANS JUNIOR, A.F.; O'BRIEN, S.R.; MA, R.; HAGER, A.G.; RIGGINS, C.W.; LAMBERT, K.N.; RIECHERS, D.E. Biochemical characterization of metabolism-based atrazine resistance in *Amaranthus tuberculatus* and identification of an expressed GST associated with resistance. **Plant Biotechnology Journal**, v.15, n.10, p.1238-1249, 2017.

FUERST, E.P.; ARNTZEN, C.J.; PFISTER, K.; PENNER, D. Herbicide Cross-Resistance in Triazine-Resistant Biotypes of Four Species. **Weed Science**, v.34, n.3, p.344-353, 1986.

GAINES, T.A.; DUKE, S.O.; MORRAN, S.; RIGON, C.A.G.; TRANEEL, P.J.; KÜPPER, A.; DAYAN, F.E. Mechanisms of evolved herbicide resistance. **JBC Reviews**, v.295, n.30, p.10307-10330, 2020.

GAZZIERO, D.L.P.; LOLLATO, R.P.; BRIGHENTI, A.M.; PITELLI, R.A.; VOLL, E. Documentos 274. **Manual de identificação de plantas daninhas da cultura da soja**. 2.ed. Londrina: Embrapa Soja, 2015. 126p.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superóxido dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, n.2, p.309-314, 1977.

GRILLO, R.; DOS SANTOS, N.Z.P.; MARUYAMA, C.R.; ROSA, A.H.; DE LIMA R.; FRACETO, L.F. Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v.231, p.1-9, 2012.

HANSEN, A.M.; TREVIÑO-QUINTANILLA, L.G. MÁRQUEZ-PACHECO, H. VILLADA-CANELA, M. GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, L.C.; GUILLÉN-GARCÉS, R.S.; HERNÁNDEZ-ANTONIO, A. Atrazina: un herbicida polémico. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v.29, (Número especial sobre plaguicidas), p.65-84, 2013.

HAMMERTON, J.L. Environmental Factors and Susceptibility to Herbicides. **Weeds**, v.15, n.4, p.330-336, 1967.

HATTON, P.J.; DIXON, D.; COLE, D.J.; EDWARDS, R. Glutathione Transferase Activities and Herbicide Selectivity in Maize and Associated Weed Species. **Journal of Pesticide Science**, v.46, p.267-275, 1996.

KACSÓ, T.; NEAGA, I.O.; ERINCZ, A.; ASTETE, C.E.; SABLIOV, C.M.; OPREAN, R.; BODOKI, E. Perspectives in the design of zein-based polymeric delivery systems with programmed wear down for sustainable agricultural applications. **Polymer Degradation and Stability**, v.155, p.130-135, 2018.

KAH, M.; KOOKANA, R.S.; GOGOS, A.; BUCHELI, T.D. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature Nanotechnology**, v.13, n.8, p.677:684, 2018.

KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old Enzymes for a New Job. **Plant Physiology**, v.11, n.1, p.349-353, 1996.

JACHETTA, J.J.; RADOSEVICH, S.R. Enhanced Degradation of Atrazine by Corn (*Zea mays*). **Weed Science**, v.29, n.1, p.37-44, 1981.

JETTER, R.; KUNST, L.; SAMUELS, A. L. Composition of Plant Cuticular Waxes. In: **Biology of the Plant Cuticle**. 1st ed. Annual Plant Reviews online v. 23; Blackwell Publishing Ltd, 2006; pp 145-175.

KARAM, D.; OLIVEIRA, M.F. **Seletividade de herbicidas na cultura do milho**. Circular Técnica 98. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007, 8p.

KNÖRZER, O.C.; DURNER, J.; BÖGER, P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.97, p.388-396, 1996.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.

LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.45-64.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 7 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2014. 383p.

MARCACCI, S.; RAVETON, M.; RAVANEL, P.; SCHWITZGUÉBEL, J. Conjugation of atrazine in vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. **Environmental and Experimental Botany**, v.56, p.205–215, 2006.

MATTOS, I.L.; SHIRAIISHI, K.A.; BRAZ, A.D.; FERNANDES, J.R. Peróxido de hidrogênio: Importância e determinação. **Química Nova**, v.26, n.3, p.373-380, 2003.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.9, p.405-410, 2002.

MONTEIRO, R.A.; CAMARA, M.C.; OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R.; CARVALHO, L.B.; PROENÇA, P.L.F.; GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R.; NASCIMENTO, J.; GONÇALVES, K.C.; POLANCZYK, R.A.; FRACETO, L.F. Zein based-nanoparticles loaded botanical pesticides in pest control: An enzyme stimuli-responsive approach aiming sustainable agriculture. **Journal of Hazardous Materials**, v.417, n.e.126004, 2021.

MOREIRA, H.J.C.; BRAGANÇA, H.B.N. **Manual de identificação de plantas infestantes: hortifrúti**. 1. ed. São Paulo: FMC Agricultural Products, 2011. 1017p
MUELLER, M.J. Archetype signals in plants: the phytoprostanes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.441–448, 2004.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v.22, n.5, p.867-880, 1981.

NAKKA, S. GODAR, A.S.; THOMPSON, C.R.; PETERSONA, D.A.; JUGULAMA, M. Rapid detoxification via glutathione S-transferase (GST) conjugation confers a high level of atrazine resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Pest Management Science**, v.73, p.2236–2243, 2017.

OLIVEIRA, H.C.; STOLF-MOREIRA, R.; MARTINEZ, C.B.R.; GRILLO, R.; DE JESUS, M.B.; FRACETO, L.F. Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. **PLoS ONE**, v.10, n.7, 2015.

PARKINSON, S.J.; TUNGSIRISURP, S.; SIKDER, A.; LYNCH, I.; O'REILLY, R.K.; NAPIER, R.M. 2022. "Polymer nanoparticles pass the plant interface". Preprint, submetido a **bioRxiv** em 24 de março de 2022.

PASCOLI, M.; JACQUES, M.T.; AGARRAYUA, D.A.; AVILA, D.S.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for applications in sustainable agriculture: An ecotoxicological perspective. **Science of the Total Environment**, v.677, p.57-67, 2019.

PEIXOTO, H.P.P.; CAMBRAIA, J.; SAN'T ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, A.M. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-43, 1999.

PÉREZ-DE-LUQUE, A. Interaction of Nanomaterials with Plants: What Do We Need for Real Applications in Agriculture? **Frontiers in Environment Science**, v.5, n.12, p.1-7, 2017.

PREISLER, A.C.; PEREIRA, A.E.S.; CAMPOS, E.V.; DALAZEN, G.; FRACETO, L.F.; OLIVEIRA, H.C. Atrazine nanoencapsulation improves pre-emergence herbicidal activity against *Bidens pilosa* without enhancing long-term residual effect on *Glycine max*. **Pest Management Science**, v.76, n.1, p.141-149, 2020.

RAMEL, F.; SULMON, C.; BOGARD, M.; COUÉE, I.; GOUESBET, G. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. **BMC Plant Biology**, v.9, n.28, 18p. 2009.

RECKER, R. A.; MITCHELL, P. D.; STOLTENBERG, D. E.; LAUER, J. G.; DAVIS, V. M. Late-season weed escape survey reveals discontinued atrazine use associated with greater abundance of broadleaf weeds. *Weed Technology*, v.29, n.3, p.451–463, 2015.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012, p.1-26, 2012.

SHER, A.; MAQBOOL, M.M.; IQBAL, J.; NADEEM, M.; FAIZ, S.; NOOR, H.; HAMID, Y.; YUAN, X.; PINGYI, G. The Growth, physiological and biochemical response of foxtail millet to atrazine herbicide. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.28, p.6471-6479, 2021.

SINGH, S.; KUMAR, V.; CHAUHAN, A.; DATTA, S.; WANI, A.B.; SINGH, N.; SINGH, J. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, v.16, p.211–237, 2018.

SOUSA, B.T.; PEREIRA, A.E.S.; FRACETO, L.F.; OLIVEIRA, H.C.; DALAZEN, G. Effectiveness of nanoatrazine in post-emergent control of the tolerant weed *Digitaria insularis*. **Journal of Plant Protection Research**, v.60, n.2, p.185-192, 2020

SOUSA, B.T.; PEREIRA, A.E.S.; FRACETO, L.F.; OLIVEIRA, H.C.; DALAZEN, G. Post-emergence herbicidal activity of nanoatrazine against *Alternanthera tenella* Colla plants compared to other weed species. **Heliyon**, v.8, n.7, e09902, 2022.

SOUSA, G.F.M.; GOMES, D.G.; CAMPOS, E.V.R.; OLIVEIRA, J.L.; FRACETO, L.F.; STOLF-MOREIRA, R.; OLIVEIRA, H.C. Post-emergence herbicidal activity of nanoatrazine against susceptible weeds. **Frontiers in Environmental Science**, v.6, p.1-12, 2018.

TAKESHITA, V.; SOUSA, B.T.; PREISLER, A.C; CARVALHO, L.B.; PEREIRA, A.E.S.; TORNISIELO, V.L.; DALAZEN, G.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F. Foliar absorption and field herbicidal studies of atrazine-loaded polymeric nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v.418, n.e.126350, 2021.

TIECHER, T.L.; CERETTA, C.A.; FERREIRA, P.A.A.; LOURENZI, C.R.; TIECHER, T.; GIROTTO, E.; NICOLOSO, F.T.; SORIANI, H.H.; DE CONTI, L.; MIMMO, T.; CESCO, S.; BRUNETTO, G. The potential of *Zea mays* L. in remediating copper and zinc contaminated soils for grapevine production. **Geoderma**, v.262, p.52-61, 2016.

VASS, I.; CSER, K. Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. **Trends in Plant Science**, v.14, n.4, p.200-205, 2009.

WALKER, G.W.; KOOKANA, R.S.; SMITH, N.E.; KAH, M.; DOOLETTE, C.L.; REEVES, P.T.; LOVELL, W.; ANDERSON, D.J.; TURNEY, T.W.; NAVARRO, D.A. Ecological Risk Assessment of Nano-enabled Pesticides: A Perspective on Problem Formulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, p.6480-6486, 2018.

WEBER, H.; CHETELAT, A.; REYMOND, P.; FARMER, E.E. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. **The Plant Journal**, v.37, p.877-888, 2004.

WU, J.; OMOKAWA, H.; HATZIOS, K.K. Glutathione S-Transferase Activity in Unsafened and Fenclorim-Safened Rice (*Oryza sativa*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.54, p.220-229, 1996.

WU, J; ZHAI, Y.; MONIKH, F.A.; ARENAS-LAGO, D.; GRILLO, R.; VIJVER, M.G.; PEIJNENBURG, J.G.M. The Differences between the Effects of a Nanoformulation and a Conventional Form of Atrazine to Lettuce: Physiological Responses, Defense Mechanisms, and Nutrient Displacement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.69, p.12527-12540, 2021.

YU, M.; YAO, J.; LIANG, J.; ZENG, Z.; CUI, B.; ZHAO, X.; SUN, C.; WANG, Y.; LIU, G.; CUI, H. Development of functionalized abamectin poly(lactic acid) nanoparticles with regulatable adhesion to enhance foliar retention. **RSC Advances**, v.7, p.11271-11280, 2017.

ZHANG Y.; FU, L.; LI, S.; YAN, J.; SUN, M.; GIRALDO, J.P.; MATYJASZEWSKI, K.; TILTON, R. D.; LOWRY, G.V. Star Polymer Size, Charge Content, and Hydrophobicity Affect their Leaf Uptake and Translocation in Plants. **Environmental Science & Technology**, v.55, p.10758-10768, 2021.

ZHANG, J.J.; LU, Y.C.; ZHANG, J.J.; TAN, L.R.; YANG, H. Accumulation and toxicological response of atrazine in rice crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.102, p.105-112, 2014.

CAPÍTULO III

5. CHITOSAN COATING AS A STRATEGY TO INCREASE POST-EMERGENT HERBICIDAL EFFICIENCY AND ALTER THE INTERACTION OF NANOATRAZINE WITH *Bidens pilosa* L. PLANTS¹

5.1. ABSTRACT

The atrazine nano-delivery system, composed of poly(ϵ -caprolactone) (PCL+ATZ) nanocapsules (NCs), efficiently delivers the active ingredient to target plants, leading to greater herbicide effectiveness than conventional formulations. Established nanosystems can be enhanced or modified to generate new biological activity patterns. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of chitosan coating of PCL+ATZ NCs on herbicidal activity and interaction mechanisms with *Bidens pilosa* plants. Chitosan-coated NCs (PCL/CS+ATZ) were synthesized and characterized for size, zeta potential, polydispersity, and encapsulation efficiency. Herbicidal efficiency was assessed in post-emergence greenhouse trials, comparing the effects of PCL/CS+ATZ NCs (coated), PCL+ATZ NCs (uncoated), and conventional atrazine (ATZ) on photosystem II (PSII) activity and *Bidens pilosa* plants control. Using a hydroponic system, we evaluated the root absorption and shoot translocation of fluorescently labeled NCs. PCL/CS+ATZ presented positive zeta potential (25 mV), sizes of 200 nm, and efficiency of atrazine encapsulation higher than 90%. The post-emergent herbicidal activity assay showed an efficiency gain of PSII activity inhibition of up to 58% compared to ATZ and PCL+ATZ at 96 h post-application. The evaluation of weed control 14 days after application ratified the positive effect of chitosan coating on herbicidal activity, as the application of PCL/CS+ATZ at 1000 g a.i. ha⁻¹ resulted in better control than ATZ at 2000 g a.i. ha⁻¹ and PCL+ATZ at 1000 g a.i. ha⁻¹. In the hydroponic experiment, chitosan-coated NCs labeled with a fluorescent probe accumulated in the root cortex, with a small quantity reaching the vascular cylinder and leaves up to 72 h after exposure. This behavior resulted in lower leaf atrazine levels and PSII inhibition than ATZ. Chitosan coating of nanoatrazine improved the herbicidal activity against *B. pilosa* plants when applied to the leaves, but negatively affected the root-to-shoot translocation of the herbicide. This study opens avenues for further investigations to improve and modify established nanosystems, paving the way for developing novel biological activity patterns.

Keywords: Biopolymers; Nanocarriers; Nanopesticides; Weed science.

¹Artigo submetido à revista ACS Applied Materials & Interfaces em 06/03/2024

5.2. INTRODUCTION

The use of herbicides for weed management is a common practice in agriculture. Synthetic molecules of various chemical groups are designed to promote the death of weeds and increase crop productivity (DUKE, DAYAN, 2018; QU et al., 2021). Identifying new herbicides is a time-consuming and expensive process, so the correct use and conservation of existing herbicide molecules is necessary (DUKE, DAYAN, 2018; QU et al., 2021). Nanoencapsulation of herbicides is a strategy to encapsulate herbicide molecules without altering their mechanism of action, providing new physicochemical properties to formulations that are superior to the conventional properties. These include increases in the active ingredient absorption and delivery efficiency and reductions in application losses, environmental impacts, and water and energy consumption, due to less frequent application (WALKER et al., 2018; KUMAR et al., 2019; KAH, TUFENKJI, WHITE, 2019; USMAN et al., 2020; AVELLAN et al., 2021).

Atrazine is an herbicide molecule frequently used in maize, sorghum, and sugarcane cultivation (HANSEN et al., 2013; RECKER et al., 2015). It belongs to the triazine chemical group and inhibits photosystem II (PSII), making it suitable for use in control both pre and early post-emergence of dicotyledonous weeds and some grasses (HANSEN et al., 2013; DUKE, DAYAN, 2018). However, atrazine presents drawbacks, including high persistence in soils and frequent contamination of natural aquatic environments due to its large-scale use (SENE et al., 2010; HANSEN et al., 2013; SINGH et al., 2018).

The application of nanotechnology in developing carrier systems for active ingredients allows for more efficient and safer agricultural practices, with fewer side effects (PASCOLI et al., 2018; WANG et al., 2022). The carrier system using nanocapsules (NCs) of poly(ϵ -caprolactone) for atrazine (PCL+ATZ) has shown high efficiency in delivering the active ingredient to target plants, yielding promising results for weed control in pre- and post-emergence assays (SOUSA et al., 2018; PREISLER et al., 2020; SOUSA et al., 2020; TAKESHITA et al., 2021). Application in post-emergence has demonstrated increased PSII inhibition efficiency in species like *Alternanthera tenella*, *Amaranthus viridis*, *Bidens pilosa*, *Digitaria insularis*, and *Raphanus raphanistrum* (SOUSA et al., 2018; SOUSA et al., 2020; TAKESHITA et al.,

2021; SOUSA et al., 2022). These gains are attributed to improved characteristics of the nanoformulation, such as increased leaf adhesion, faster penetration into the leaf mesophyll through natural leaf apertures (such as hydathodes and stomata), and increased translocation to younger plant tissues (BOMBO et al., 2019; TAKESHITA et al., 2021).

Additionally, it has been demonstrated that the herbicidal activity of atrazine via root absorption is potentiated by PCL+ATZ NCs, reaching the vascular cylinder of the roots and being transported to the above-ground parts of the plants (PREISLER et al., 2022a). This characteristic enhances the herbicidal activity of the nanosystem in pre-emergent weed control, as previously reported by Preisler et al. (2020). In *Lactuca sativa* plants, the application of PCL+ATZ NCs in the substrate increased oxidative stress parameters in comparison with the conventional formulation at the same dose (WU et al., 2021). Moreover, PCL NCs themselves were toxic to *Brassica juncea* seeds, reducing germination and increasing the number of abnormal seedlings (PREISLER et al., 2022b).

The coating of NCs is a strategy to reduce phytotoxic effects and/or alter their physicochemical properties. For PCL NCs, a potential coating option is chitosan, a natural, biodegradable, and biocompatible biopolymer derived from chitin, the second most abundant carbon-containing polymer on Earth (ZARGAR, ASGHARI, DASHTI, 2015; NEGM et al., 2020; ZHANG, YING, PING, 2021). Its biocompatibility can reduce the phytotoxicity of active ingredients when encapsulated and of nanoparticles when coated (ZHANG, YING, PING, 2021). Chitosan is cationic, capable of changing the zeta potential of nanoparticles (from negative to positive) through interactions with surface electric charges (NEGM et al., 2020; PRAUDO-AUDELO et al., 2020). This nanoparticle coating strategy has shown promising results for drug delivery due to its adhesive properties (PAULUK et al., 2019; CAMPOS et al., 2022).

Interactions between NCs and plants (absorption, transport, accumulation, and transformation) need further clarification to aid in the development of the most efficient systems for delivering active ingredients (AVELLAN et al., 2021). It is known that nanoparticle adhesion, absorption, and translocation depend on electrical potential and other characteristics (such as size, shape, and polymer matrix), with the xylem being a crucial pathway for nanoparticle distribution in plants (ASLANI et al., 2014; YU et al., 2017; AVELLAN et al., 2021; ZHANG et al., 2021). Changes in

the physicochemical patterns of nanoparticles can confer new biological activity patterns, and these are yet to be evaluated in plants for the formulation of PCL+ATZ NCs after chitosan coating. Therefore, the objective of the current study was to characterize the chitosan-coated PCL+ATZ NCs formulation regarding size, zeta potential, and polydispersity, as well as to evaluate its post-emergent herbicidal activity and its absorption and translocation dynamics in *B. pilosa* plants through evaluations of PSII activity, weed control, endogenous levels of active ingredient, and in situ localization of fluorescently-labeled NCs in plant tissues.

5.3. MATERIAL AND METHODS

5.3.1. Synthesis of Nanoformulations

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) NCs were prepared using the antisolvent nanoprecipitation method (GRILLO et al., 2012). An organic phase was prepared by dissolving 100 mg of PCL, 40 mg of sorbitan monostearate surfactant, and 200 mg of caprylic/capric acid triglyceride in 30 mL of acetone. For the formulation containing atrazine, 10 mg of atrazine was added to this organic phase. The organic phase was introduced into 30 mL of an aqueous phase, consisting of a 0.2% (w/v) solution of polysorbate 80 surfactant. After 20 min of orbital stirring, the formulation was concentrated using a rotary evaporator to a final volume of 10 mL. A control NC was obtained without the addition of atrazine (PCL) and a NC containing atrazine (PCL+ATZ) at 1 g a.i L⁻¹.

For the coating of NCs, a chitosan solution was prepared at 0.5% (w/v) in a 1% (v/v) aqueous solution of acetic acid. The solubilization was performed overnight and filtered under vacuum conditions to eliminate any insoluble impurities. The nanoformulations were initially concentrated to 5 mL, and then 5 mL of the 0.5% chitosan solution were slowly added under constant stirring (which was maintained for 1 h after adding the chitosan solution). The following formulations were obtained: Coated NC control without the addition of the active ingredient (PCL/CS) and coated NCs containing atrazine (PCL/CS+ATZ) at 1 g a.i L⁻¹.

5.3.2. Functionalization of Chitosan with FITC and Preparation of Labeled Nanoformulations

The synthesis of FITC-labeled chitosan was carried out following the methodology described by Colonna et al. (2008). Low molecular weight chitosan (2.5 g) was dissolved in 250 mL of 0.1 mol L⁻¹ acetic acid, followed by the addition of 250 mL of methanol and 125 mL of a methanolic solution of FITC (500 mg L⁻¹). The reaction was conducted for 3 h in the dark under constant stirring. Subsequently, the labeled chitosan was precipitated by adding 0.5 mol L⁻¹ NaOH until reaching pH 10. The precipitate was recovered by centrifugation at 1700 × g for 15 min. An exhaustive washing process was performed by resuspending the precipitate in a methanol/water solution (70:30, v/v), followed by centrifugation, until absorbance signals (at UV-Vis range) were no longer observed in the supernatant. The labeled chitosan was then dissolved in 0.1 mol L⁻¹ acetic acid and dialyzed in the dark against ultrapure water for 5 days, with two daily water changes during dialysis. Finally, the FITC-labeled chitosan was obtained by lyophilization. The labeled chitosan was characterized by FTIR through transmittance measurements obtained by the diffuse reflection method on KBr pellets containing 1% (w/w) of the sample. Jasco FTIR-410 infrared equipment was used, operating in the range of 400 to 4000 cm⁻¹, with 64 scans and a resolution of 8 cm⁻¹.

For the preparation of the labeled nanoformulation, the steps were followed as described earlier, using a proportion of 30% FITC-functionalized chitosan mixed with unlabeled chitosan. The coating of NCs was also carried out as described previously, resulting in labeled NCs containing atrazine (PCL/CS_f+ATZ) at 1 g a.i. L⁻¹.

5.3.3. Characterization and Stability of Nanoformulations

The hydrodynamic size and polydispersity index (PDI) of the NCs were determined by dynamic light scattering (DLS), while microelectrophoresis was employed to measure the zeta potential. The colloidal suspensions of PCL, PCL+ATZ, PCL/CS, and PCL/CS+ATZ were diluted in ultrapure water (2:1000, v/v) for these measurements and analyzed using a Zetasizer Nano ZS 90 instrument (Malvern)

operated at a 90° detection angle. The measurements were conducted in triplicate at 25 °C over a storage period of 120 days.

The suspension of PCL/CSf+ATZ was characterized using nanoparticle tracking analysis (NTA) with a NanoSight LM 10 cell (532 nm) equipped with a CMOS camera and NanoSight software (version 3.2). The nanocapsule suspension was diluted in deionized water (1:20000, v/v), and five injections were made at a temperature of 25 °C, with 60-s videos collected for each injection.

The morphology and size analysis of PCL/CS+ATZ NCs were performed using atomic force microscopy (AFM). A diluted suspension of NCs in ultrapure water (1:30000, v/v) was drop-cast onto a silicon plate and dried in a desiccator. Micrographs were obtained using an Easy Scan 2 instrument (Basic AFM – Standard BT02217; Nanosurf, Switzerland) operating in non-contact mode with a TapAI-G cantilever (BudgetSensor, Bulgaria) and a scanning rate of 90 Hz. Images were processed using Gwyddion software.

The encapsulation efficiency of atrazine in PCL/CS NCs was indirectly determined by the ultrafiltration/centrifugation method. The atrazine concentration was quantified using an ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) Thermo Scientific Ultimate 3000 instrument with a Phenomenex Luna 5 µm C18 column (100 Å, 250 mm × 4.6 mm) maintained at 30 °C. The UV-vis detector operated at 223 nm. The mobile phase consisted of acetonitrile:water (50:50, v/v) with a flow rate of 1.5 mL min⁻¹. The method's limit of detection (LOD) was 1.19 µg L⁻¹, and the limit of quantification (LOQ) was 3.96 µg L⁻¹ (R² = 0.9997). Triplicate measurements were performed over 120 days.

5.3.4. Release Assays

The release profile of atrazine from PCL/CS+ATZ was determined through release kinetic assays. A system with a donor and acceptor compartment, separated by a semipermeable cellulose membrane with a molecular exclusion pore of 1 kDa (SpectraPore), was set up to meet the sink condition. A volume of 495 µL of PCL/CS+ATZ or ATZ (Primóleo SC, 400 g a.i. L⁻¹, Syngenta®) at 1 g a.i. L⁻¹ was added to the donor compartment. The membrane's cross-sectional area (1.54 cm²) was immersed in the acceptor medium, consisting of 150 mL of an aqueous solution of

polysorbate 80 (0.25% w/v). The system was maintained under constant agitation, and the released amount was monitored for 96 h. The assays were conducted in triplicate, and the released atrazine was quantified by UHPLC according to Equation 1.

$$\% \text{ Cumulative release} = \frac{Q_m - Q_t}{Q_m} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Where Q_m is the total amount of atrazine present in the formulation, and Q_t is the amount of atrazine released as a function of time.

The release data were fitted ($Q_t/Q_\infty < 0,6$) to the semi-empirical Korsmeyer-Peppas kinetic model (Equation 2).

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = Kt^n \quad \text{Eq. 2}$$

Where Q_∞ corresponds to the total atrazine released at infinite time, K is the constant involving the structure and geometry of the system, and n is the exponent indicative of the herbicide release mechanism, valid for Fickian and non-Fickian diffusion processes.

5.3.5. Herbicidal Activity Assay

The herbicidal activity assay in the greenhouse involved experimental units comprising plastic pots with a 1 L capacity (10.5 cm height, 9.5 cm lower diameter, 14 cm upper diameter) filled with Eutric Nitisol clayey latosol soil collected from the Experimental Farm of the State University of Londrina (UEL). The soil had a high clay content typical for northern Paraná, with chemical characteristics as described: pH (CaCl₂) – 4.83; organic matter – 28.2 g dm⁻³; P – 7.63 mg dm⁻³; K – 0.65 cmol_c dm⁻³; Na – 0.0 cmol_c dm⁻³; Ca – 3.96 cmol_c dm⁻³; Mg – 1.80 cmol_c dm⁻³; sum of bases – 6.41 cmol_c dm⁻³; cation exchange capacity at pH 7.0 (CEC) – 11.0 cmol_c dm⁻³; and base saturation (BS) – 58.2%. Base saturation was calculated using Equation 3

$$BS = \left(\frac{K+Ca+Mg}{CEC} \right) \times 100 [\%] \quad \text{Eq. 3}$$

Each experimental unit contained five *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) plants directly sown into the soil in the pots, with seeds collected from random plants on the UEL campus. The experiment followed a completely randomized design

organized in a factorial scheme (3 x 3 + 1) with three formulations (ATZ, PCL+ATZ, and PCL/CS+ATZ) and three doses (200, 1000, and 2000 g a.i. ha⁻¹), each with four replications, plus an additional control treatment (only water). Formulations were applied between 7:00 AM and 8:30 AM via foliar spray with a manual sprayer at a volume of 5.1 mL per experimental unit.

Non-destructive physiological assessments of the maximum quantum efficiency of PSII (F_v/F_m) and the relative electron transport rate (rETR) were conducted at 24, 48, 72, and 96 h post-application. A portable fluorometer model OS1p (Opti-Sciences, Hudson, USA) was used for assessments. For F_v/F_m data acquisition, plants required dark acclimation for 20 min. For rETR determination, the effective quantum efficiency of PSII ($\Delta F/F_m'$) was measured with plants acclimated to ambient light, monitored by a digital lux meter model LX1010B (Politerm, São Paulo, Brazil). F_v/F_m measurements and rETR calculations were carried out following the procedure described by Sousa et al.¹⁶. Inhibition rates of PSII and rETR were calculated using Equations 4 and 5.

$$\text{PSII Inhibition} = \left(\frac{F_v/F_m \text{ Control} - F_v/F_m \text{ Treatment}}{F_v/F_m \text{ Control}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

$$\text{rETR Inhibition} = \left(\frac{rETR \text{ Control} - rETR \text{ Treatment}}{rETR \text{ Control}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

Weed control was assessed 14 days after application using the ALAM (1974) scale, assigning scores from 1 to 6 based on the percentage of control, as described: 1 = 0 to 40% control (poor, none); 2 = 41% to 60% (fair); 3 = 61% to 70% (sufficient); 4 = 71% to 80% (good); 5 = 81% to 90% (very good); and 6 = 91% to 100% (excellent).

After the control assessment, plants were collected and stratified into above-ground and root parts. Each portion of plant material was placed in paper bags (separated by experimental unit) and dried at 60 °C for five days. Following this period, the plant material was weighed using a semi-analytical scale, RC 2013 (Sauter, Germany). For both above-ground and root portions, the mass reduction in relation to the control treatment was calculated using Equation 6.

$$\text{Mass reduction (\%)} = \left(\frac{\text{Mass Control} - \text{Mass Treatment}}{\text{Mass Control}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 6}$$

5.3.6. Absorption and Translocation Assay in Hydroponic System

Seeds of *B. pilosa* (from the same batch as the herbicide activity experiment) were sown in soil-filled pots. When the plants exhibited two pairs of fully expanded true leaves, they were transferred to a hydroponic system with the nutrient solution detailed in Table S1 (Supplementary Material). The experiment took place in a laboratory, using aquariums with 2 L of nutrient solution, constant aeration, and a 12/12-hour light/dark photoperiod. Before starting the treatments, the nutrient solution was replaced with distilled water, and the formulations ATZ, PCL+ATZ, or PCL/CS+ATZ were added to achieve a concentration of 8 mg a.i. L⁻¹. An additional treatment (control) was maintained with plants in water only. Each treatment had eight replicates. Non-destructive physiological assessments of the maximum quantum efficiency of PSII (F_v/F_m) and the relative electron transport rate (rETR) were performed at 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, and 72 h after exposure in hydroponics, using the methodology described in section 2.5.

5.3.7. Confocal Microscopy

The confocal microscopy assay was conducted with adaptations from Preisler et al. (2022a). Tests were performed using *B. pilosa* plants grown in a hydroponic system similar to that used in the absorption and translocation assay. However, the evaluated treatments were the control (water) and PCL/CS+ATZ labeled with a fluorescent probe. To monitor the labeled NCs, the root system (main and lateral roots) and the second fully expanded youngest leaf were collected at exposure intervals of 1, 2, 4, 12, 24, and 36 h.

Samples were fixed for 4 h with 4% paraformaldehyde (PFA) at 4 °C, protected from light, and washed for 10 min in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). Segments (1 cm) from two root regions (maturation zone near the root apex and branching zone near the collar) and the mid-region of the leaf, close to the central vein, were prepared for slide mounting using Fluormount (Southern Biotech). The samples were analyzed with a 20× objective on a Leica TCS SP8 confocal spectral microscope

(Leica Microsystems, Wetzla, Germany) with excitation at 448 nm and emission from 457 to 558 nm (color range from blue to green).

As a negative control for parameter standardization and removal of all markers, plants not exposed to labeled NCs (treated with water) were used. Once the intensity and laser parameters of the negative control were standardized, they were applied to the treatments with labeled NCs. Therefore, the fluorescence observed in the images resulted from the NCs and not from constitutive elements, as it did not appear in the negative control. Brightfield microscopy was used to determine the region of interest and capture images. The images were processed, and fluorescence intensity was quantified using Leica LAS X LS software (version 3.5.7).

5.3.8. Extraction and Quantification of Atrazine and Fluorescent Probe in Plant Tissues

The extraction of FITC-labeled NCs from plant tissues was performed following the methodology of Carvalho et al. (2023) with some modifications. In summary, fresh plant tissues (roots, stems, and leaves) were incubated with 5 mL of NaOH at 70 °C for 60 min. The samples were then centrifuged for 15 minutes at 1700 x g. After a 10-fold dilution of the supernatant, the fluorescence was measured using a microplate reader (Tecan Infinite 200 Pro; Männedorf, Switzerland) with an excitation wavelength of 457 nm and an emission wavelength of 522 nm. The results were calculated by subtracting the average fluorescence signal of the control from the plant samples that did not receive the FITC probe treatment. The method's detection limit was 125.3 ng L⁻¹ with a quantification limit of 417.8 ng L⁻¹ ($R^2 = 0.9996$).

To determine the endogenous levels of atrazine, plant tissues underwent a simultaneous two-stage extraction process for 24 h (CARVALHO et al., 2023). The process involved keeping the samples in conical tubes containing 10 mL of methanol with moderate agitation at 25 °C. The samples were centrifuged at 1700 × g, and the solid phase was subjected to the extraction process again. The methanolic extract obtained in the two stages was placed in amber vials without a cap for solvent evaporation and concentration to a final volume of nearly 5 mL. The samples were filtered through 0.22 µm nylon filters (Allcrom, São Paulo, Brazil), and atrazine was

quantified by UHPLC. The analytical conditions were identical to those described for the determination of encapsulation efficiency (section 2.2).

5.3.9. Statistical Analysis

The inhibition data obtained in percentages were transformed by the arcsine square root transformation (\sqrt{x}). All data were tested for the normality of errors and homogeneity of variances. The herbicidal activity data in the greenhouse were subjected to a two-factor ANOVA using the F-test ($p \leq 0.05$), and when significant, means were compared using the Tukey test ($p \leq 0.05$). For the results of confocal microscopy analyses and herbicidal activity in hydroponics, one-way ANOVA was used. When significant, the means were compared by the Tukey test ($p \leq 0.05$).

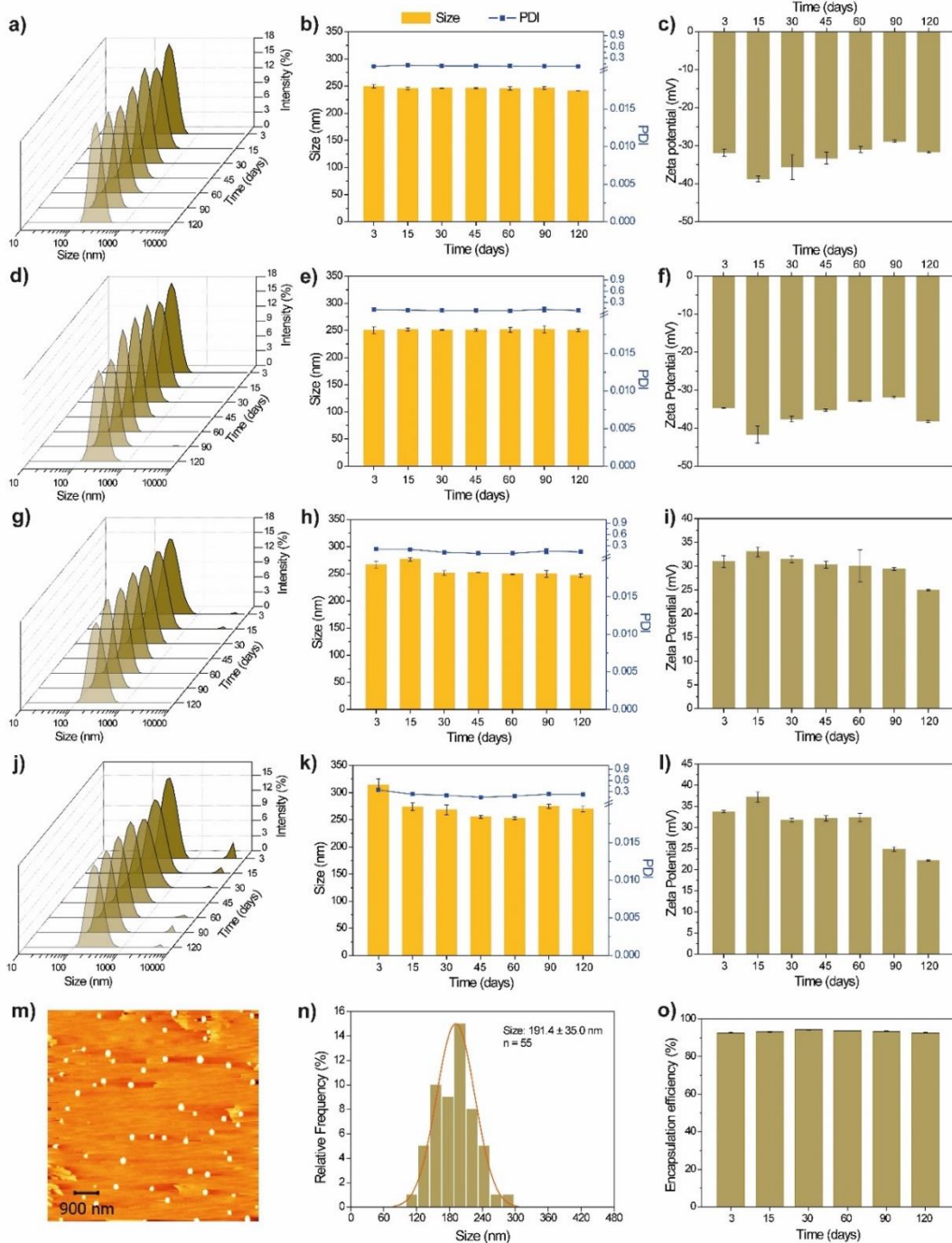
5.4. RESULTS

5.4.1. Characterization and Stability of Nanoformulations

The PCL and PCL+ATZ NCs presented a negative zeta potential, and coating with chitosan made the PCL/CS and PCL/CS+ATZ NCs positively charged ($\zeta = 25 \pm 2$ mV), indicating the modification of the surface of these NCs. The systems remained stable during the monitoring period (120 days) (Figure 22), with an average size of PCL/CS+ATZ NCs of 262 ± 3 nm, 193 ± 5 nm, and 191 ± 35 nm, as determined by DLS, NTA, and AFM techniques, respectively (Figure 22). The system is predominantly monodispersed (PDI = 0.208 ± 0.03), the nanocapsules concentration remained in the range of 10^{12} to 10^{13} nanocapsules mL^{-1} , and the encapsulation efficiency was above 90% during the analyzed period.

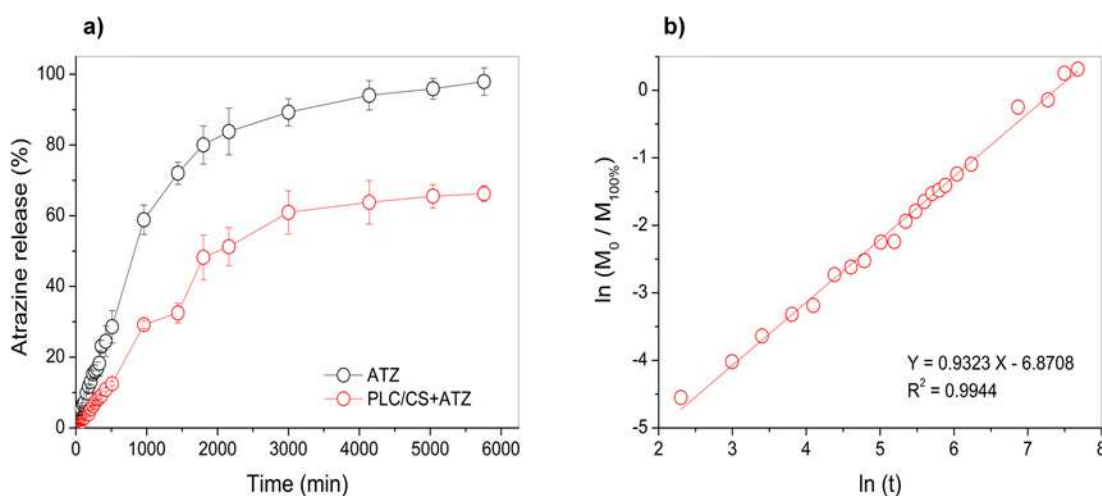
It is noteworthy that the functionalization of chitosan with the FTIC probe was successful, as demonstrated by FTIR analyses (Figure S2 and Table S2), showing shifts in the chitosan bands and the appearance of N=C=O bonds from the aromatic groups of fluorescein. PCL/CS+ATZ presented a size similar to the non-labeled formulations, with a diameter of approximately 194 nm and a nanoparticle concentration in the order of 10^{12} , as shown in the NTA analyses (Figure S3).

Figure 22. Size distribution, average hydrodynamic size, polydispersity index (PDI) and zeta potential for the nanoformulations: (a, b, c) control polycaprolactone (PCL) nanocapsules; (d, e, f) polycaprolactone nanocapsules containing atrazine (PCL-ATZ); (g, h, i) control polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS); (j, k, l) polycaprolactone nanocapsules containing atrazine and coated with chitosan (PCL/CS+ATZ); (m) morphology and (n) size distribution of PCL/CS+ATZ nanocapsules; (o) encapsulation efficiency of atrazine in PCL/CS+ATZ nanocapsules for a period of 120 days.



The release kinetics of atrazine, as obtained in in vitro assays through dialysis using a semi-permeable membrane (Figure 23a), revealed alterations in the release profile of atrazine from the nanoformulation PCL/CS+ATZ. Nanoencapsulation led to a reduction in the atrazine release rate, with the released quantity being approximately 30% lower than that of the commercial herbicide after 92 h of the assay and about 60% lower within the first 24 hours. The release data for PCL/CS+ATZ were fitted to the mathematical model of Korsmeyer–Peppas (0.9944) (Figure 23b), indicating that the release rate is governed by the swelling and relaxation of the polymeric matrix of the nanocapsules (RITGER, PEPPAS, 1987; SINGH et al., 2020).

Figure 23. (a) In vitro release curves for commercial atrazine (ATZ) and polycaprolactone nanocapsule nanoformulation containing atrazine and coated with chitosan (PCL/CS+ATZ). (b) Release data fitted to the Korsmeyer and Peppas kinetic model.



5.4.2. Herbicidal Activity Evaluation

The nanoatrazine formulation PCL/CS+ATZ provided a 70% inhibition of the maximum quantum yield of the photosystem II (PSII) in *B. pilosa* plants at 2000 g a.i. ha⁻¹, just 24 h after foliar application (Figure 24a). The inhibition percentage of this nanoformulation was 23.4% higher than PCL+ATZ and 39.7% higher than ATZ at the same dose. For 200 g a.i. ha⁻¹, the PCL/CS+ATZ formulation also exhibited the highest inhibition among the three formulations (29.7%), with a gain of 8% over

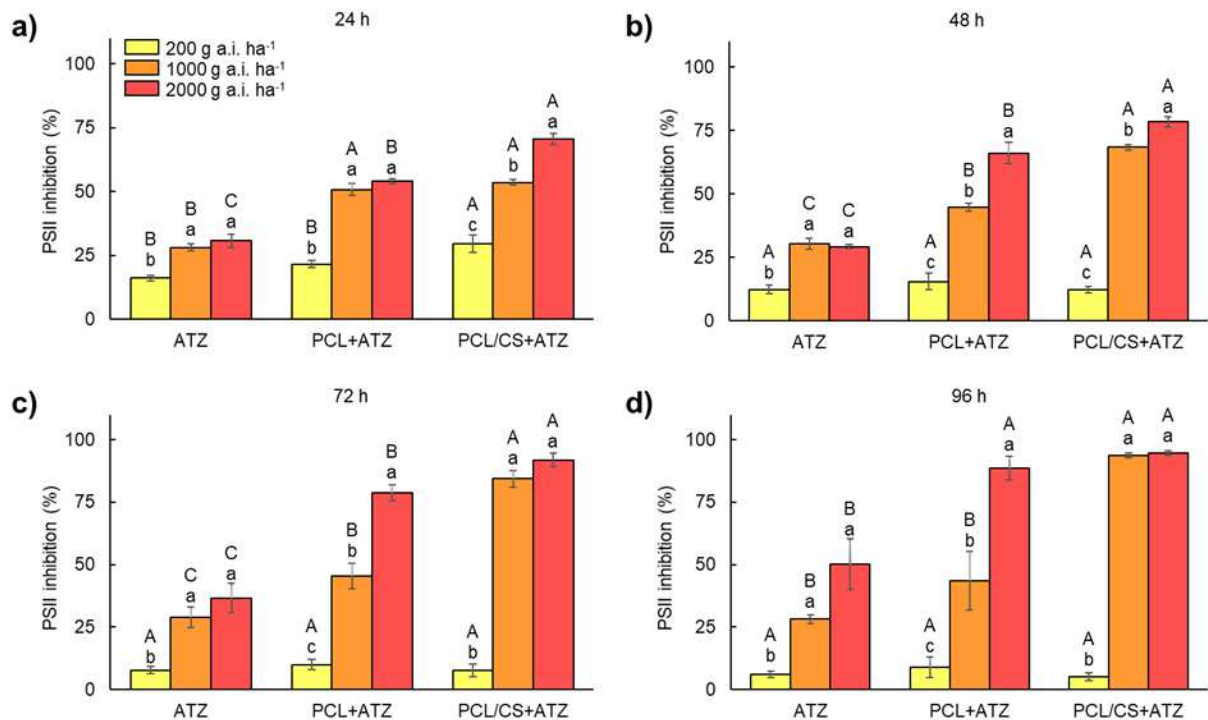
PCL+ATZ and 13.5% over ATZ. At 1000 g a.i. ha⁻¹, the inhibitions provided by PCL/CS+ATZ and PCL+ATZ were similar and, on average, 24.1% higher than ATZ.

At 48 h after application (Figure 24b), the PSII inhibitions resulting from the application of PCL/CS+ATZ at 1000 and 2000 g a.i. ha⁻¹ were 68.4 and 78.3%, respectively. Compared to the PCL+ATZ formulation, these represented gains of 23.7 and 12.2%, and compared to ATZ, the gains were 37% and 49.1% at the respective doses. However, the PCL+ATZ formulation still achieved gains in PSII inhibition over ATZ, which were 14.3% and 38% at 1000 and 2000 g a.i. ha⁻¹. No differences among formulations were observed for PSII inhibition at 200 g a.i. ha⁻¹.

At 72 h (Figure 24c), the highest PSII inhibition percentages continued to be provided by PCL/CS+ATZ, with 84.4% and 91.9% inhibition at 1000 and 2000 g a.i. ha⁻¹. These percentages represented efficiency gains of 38.9% and 13.1% over PCL+ATZ and 55.4% and 55.2% over ATZ, at the respective doses. The PCL+ATZ formulation also provided higher PSII inhibition than ATZ, by 16.5% and 42.2%, at 1000 and 2000 g a.i. ha⁻¹, respectively.

At 96 hours after application (Figure 24d), the PSII inhibition percentages at 1000 and 2000 g a.i. ha⁻¹ were above 90% for PCL/CS+ATZ. The PSII inhibition provided by the PCL/CS+ATZ and PCL+ATZ formulations at the 2000 g a.i. ha⁻¹ dose were similar and, on average, 42% higher than ATZ. However, at the 1000 g a.i. ha⁻¹ dose, the PSII inhibitions provided by the PCL+ATZ and ATZ formulations were similar, being on average 57.9% lower than the PCL/CS+ATZ formulation.

Figure 24. Inhibition of photosystem II (PSII) activity of *Bidens pilosa* plants at 24 (a), 48 (b), 72 (c), and 96 (d) hours after foliar application of commercial atrazine (ATZ), polycaprolactone nanocapsules containing atrazine (PCL+ATZ) and atrazine-containing polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS+ATZ) in three doses of active ingredient (200, 1000, and 2000 g a.i. ha⁻¹). Different uppercase letters indicate differences between formulations within the same dose, and different lowercase letters indicate differences between doses of the same formulation by Tukey's test ($p \leq 0.05$). Data represent means \pm standard deviation ($n = 5$).



The visual assessment of *B. pilosa* control 14 days after foliar application demonstrated that the 200 g a.i. ha⁻¹ dose of any formulation was not sufficient to kill the plants (Table 6 and Figure 25a). However, with 1000 g a.i. ha⁻¹ of PCL/CS+ATZ, weed control was satisfactorily better than with 2000 g a.i. ha⁻¹ of ATZ, allowing a 50% reduction in the active ingredient dose without compromising atrazine's herbicidal activity. At 200 g a.i. ha⁻¹, all three formulations received a score of 1, indicating poor or no plant control. Plant control scores were similar between ATZ and PCL+ATZ (score 2) at the 1000 g a.i. ha⁻¹, while PCL/CS+ATZ achieved a score of 5 at the same dose. For plant control at the 2000 g a.i. ha⁻¹, the PCL+ATZ and

PCL/CS+ATZ formulations showed very good (score 5) and excellent (score 6) performance, while the performance of ATZ was good (score 4).

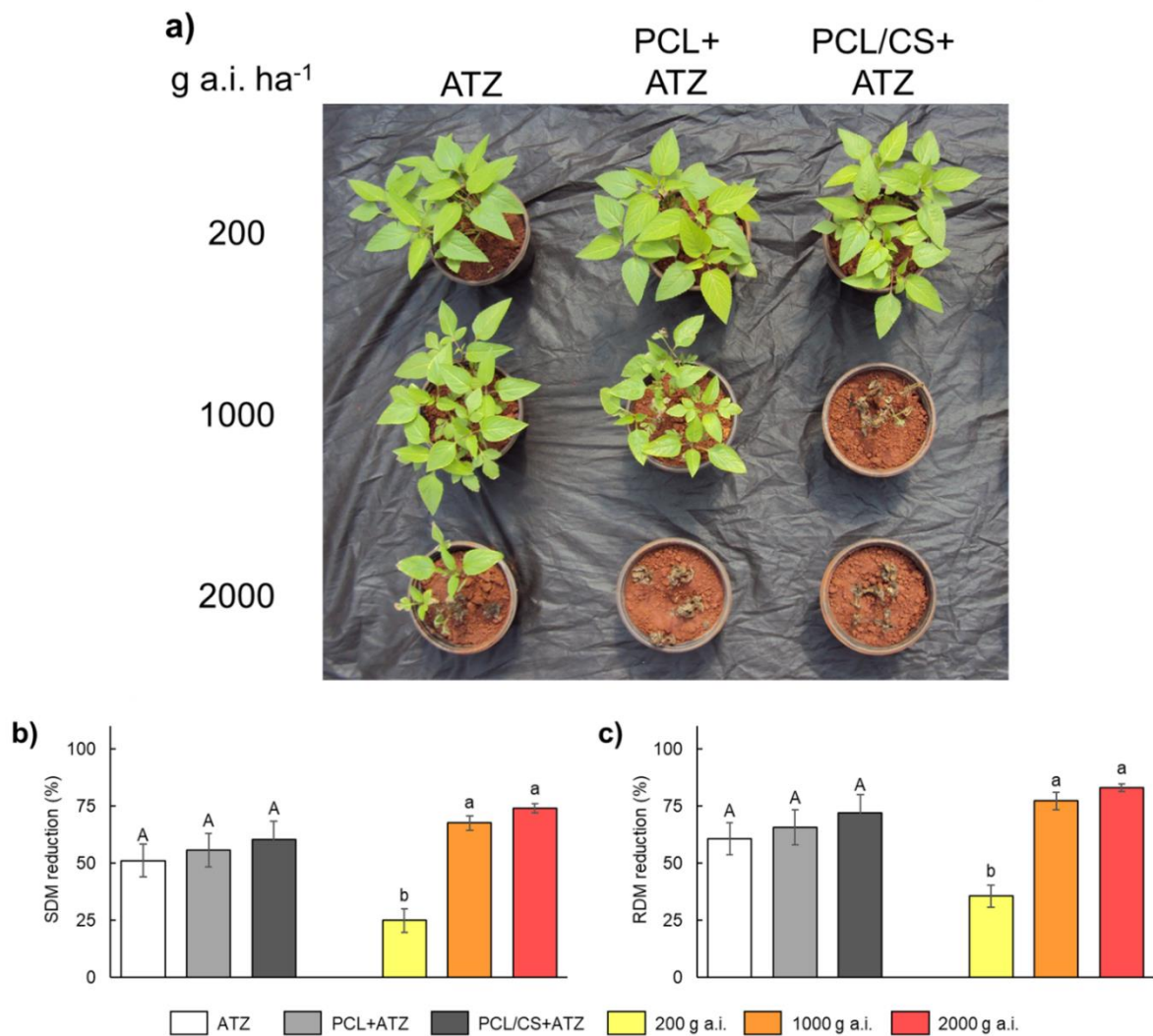
Table 6. Visual evaluation scores of control of *Bidens pilosa* plants 14 days after application of atrazine at doses of 200, 1000, and 2000 g a.i. ha⁻¹ in the formulations: conventional (ATZ), polycaprolactone nanocapsules (PCL+ATZ), or polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS+ATZ).

g a.i. ha ⁻¹	ATZ	PCL+ATZ	PCL/CS+ATZ
200	1	1	1
1000	2	2	5
2000	4	5	6

ALAM scale (1974), grades: 1 = 0 to 40% control (poor, none); 2 = 41% to 60% (regular); 3 = 61% to 70% (sufficient); 4 = 71% to 80% (good); 5 = 81% to 90% (very good); 6 = 91% to 100% (excellent).
Source: The author.

Despite the gains in PSII inhibition efficiency and weed control provided by the PCL/CS+ATZ and PCL+ATZ formulations, no differences were observed among formulations for the reductions in shoot and root dry masses (Figures 25b-c). However, higher percentages of reductions in dry masses were observed with doses of 1000 and 2000 g a.i. ha⁻¹ compared to 200 g a.i. ha⁻¹, regardless of the formulation.

Figure 25. (a) Images of representative units, (b) shoot dry mass (SDM) reduction and (c) root dry mass (RDM) reduction of *Bidens pilosa* plants 14 days after application of commercial atrazine (ATZ), polycaprolactone nanocapsules containing atrazine (PCL+ATZ) and atrazine-containing polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS+ATZ) in three doses of active ingredient (200, 1000 and 2000 g a.i. ha⁻¹). Different uppercase letters indicate differences between formulations regardless of dose, and different lowercase letters indicate differences between doses regardless of formulation by Tukey test $p \leq 0.05$. Data represent means \pm standard deviation ($n = 5$).

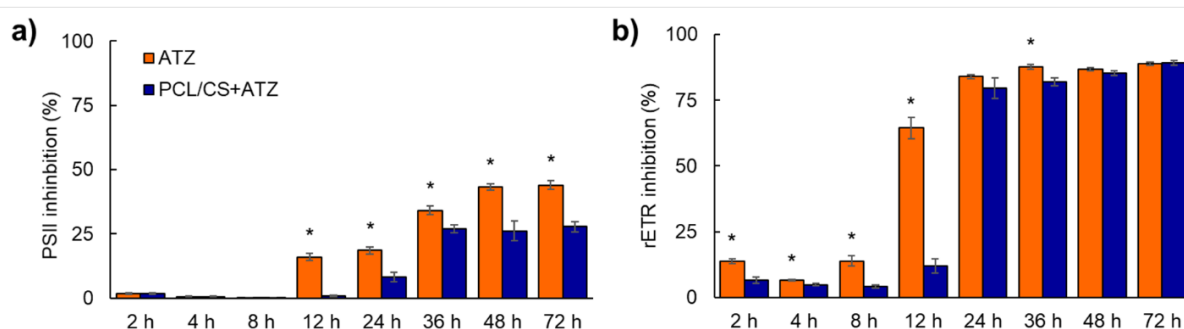


5.4.3. Evaluation of Absorption and Transport of Nanocapsules in Hydroponic System

After 2 and 8 h of exposure of *B. pilosa* plants to atrazine, minimal percentages of PSII inhibition occurred for both formulations ($\approx 0.8\%$), showing no significant differences (Figure 26a). However, from 12 to 72 h of exposure, the lowest percentages of PSII inhibition were observed in plants exposed to PCL/CS+ATZ, ranging from 8.2% to 27.2%. The PSII inhibitions provided by PCL/CS+ATZ were, on average, 12.7% lower than those of ATZ (which reached 44% inhibition at 72 h).

The inhibitions of rETR in *B. pilosa* plants exposed to ATZ at 2, 4, and 8 h were, on average, 7.4, 2, and 10% higher than those exposed to PCL/CS+ATZ (Figure 26b). At 12 h after exposure, the rETR inhibition caused by ATZ was 52.5% higher than PCL/CS+ATZ. From 24 h of exposure onwards, the percentages of rETR inhibition induced by both formulations were similar, except at 36 h, when rETR inhibition of ATZ was 5.7% higher than PCL/CS+ATZ.

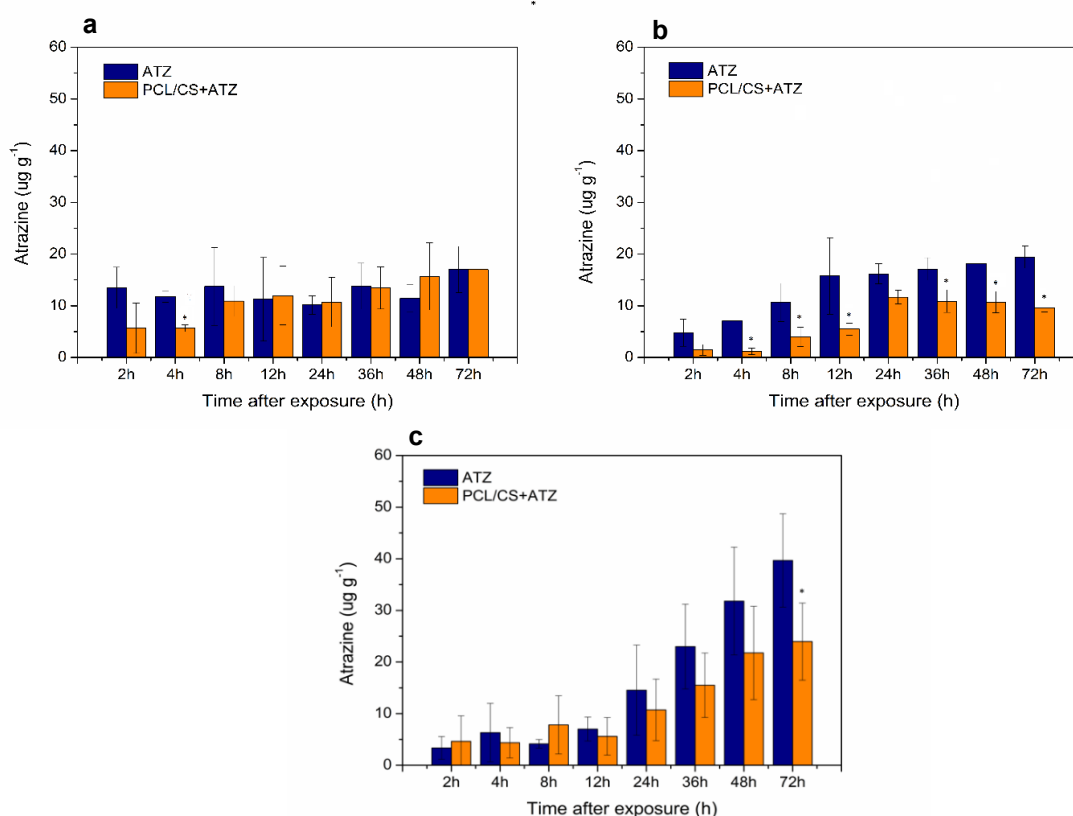
Figure 26. (a) Inhibition of photosystem II (PSII) activity and (b) inhibition of the relative electron transport rate (rETR) of *Bidens pilosa* plants exposed to atrazine (8 mg L^{-1}) in hydroponic system with conventional formulation (ATZ) or polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS+ATZ). The presence of an asterisk (*) indicates a significant difference between the PCL/CS+ATZ and conventional formulation (ATZ) within each time analyzed according to the F test ($p \leq 0.05$). Data represent means \pm standard deviation ($n = 8$).



The endogenous atrazine levels were quantified in organs of hydroponically-grown *B. pilosa* plants exposed to different formulations (Figure 27). In the roots, the herbicide levels remained unchanged in the ATZ treatment, while an

increase in atrazine content over time was observed for PCL/CS+ATZ (Figure 27a). In the stem, an increase in atrazine concentration was observed until 12 h in the ATZ treatment and until 24 h for the nanoformulation (Figure 27b). In the leaves, the commercial formulation induced greater levels of atrazine in a shorter period of time than PCL/CS+ATZ (Figure 27c).

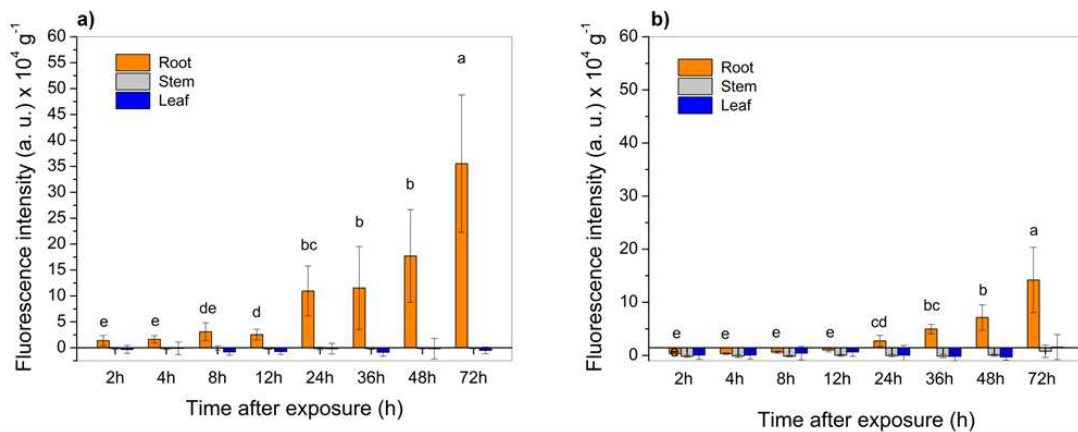
Figure 27. Quantification of endogenous atrazine levels in (a) roots, (b) stems, and (c) leaves of *Bidens pilosa* plants exposed to atrazine (8 mg L^{-1}) in a hydroponic system with conventional formulation (ATZ) or atrazine-containing polycaprolactone nanocapsules coated with chitosan (PCL/CS+ATZ). The presence of an asterisk (*) indicates a significant difference between the PCL/CS+ATZ and conventional formulation (ATZ) within each time analyzed according to the F test ($p \leq 0.05$). Data represent means \pm standard deviation ($n = 5$).



Hydroponically-grown *B. pilosa* plants were also exposed to the FITC-labeled nanoformulation (PCL/CSf+ATZ). The fluorescence intensity in roots increased over time, which clearly demonstrates the uptake and accumulation of NCs in this

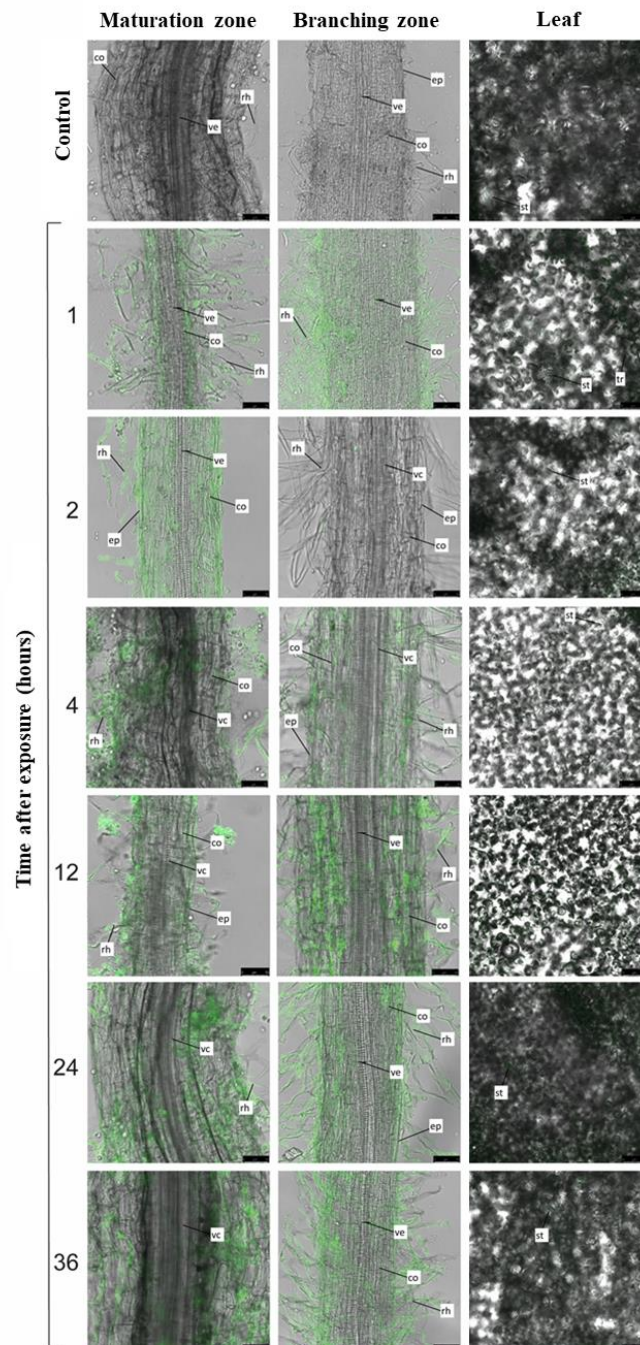
organ (Figure 28). However, the fluorescence signal was not detected in the stem or leaves.

Figure 28. Fluorescence intensity measured in root, stem, and leaf extracts of *B. pilosa* plants hydroponically exposed to the atrazine-containing polycaprolactone nanocapsules coated with fluorescently-labeled chitosan (PCL/CSf+ATZ nanoformulation). Different lowercase letters indicate differences among time-points according to Tukey's test ($p \leq 0.05$). Data represent means \pm standard deviation ($n = 5$.)



For PCL/CSf+ATZ, images obtained using confocal microscopy showed a higher fluorescence intensity (FI) in the region between the root branching zone and the maturation zone of *B. pilosa* roots (Figure 29), demonstrating that the NCs were absorbed through the primary root structures. However, the intensity is visibly greater near the region of the epidermis and root hairs regardless of the exposure interval (Figures 29 and S4), indicating low penetration.

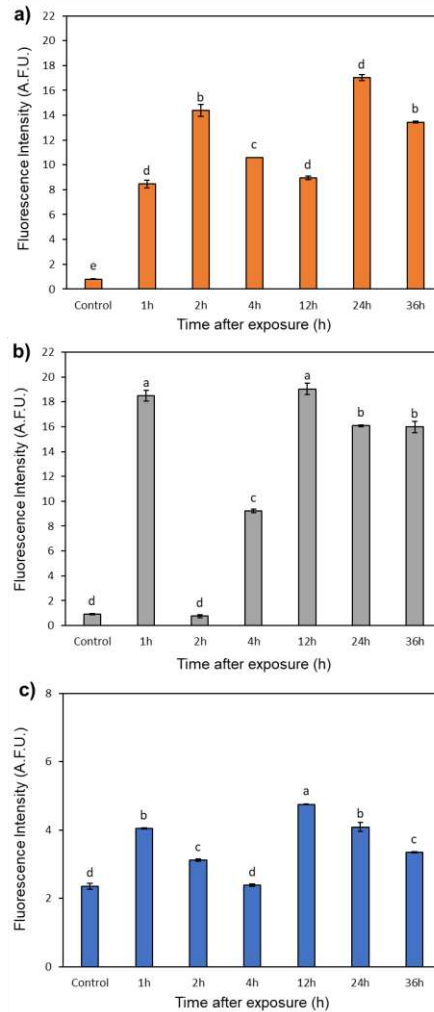
Figure 29. Representative confocal microscopy images of chitosan-coated PCL nanocapsules containing atrazine and labeled with FITC (PCL/CSf+ATZ) in *B. pilosa* tissues as a function of exposure time in the hydroponic system (1, 2, 4, 12, 24, and 36 h after exhibition). The figure shows representative images of the root maturation zone, root branching zone, and leaf. Images were obtained at 20x magnification. The negative control refers to plants maintained in distilled water. Stoma (st), trichomes (tr), vascular cylinder (vc), vessel element (ve), cortex (co), epidermis (ep), absorbent hairs (rh). Bars = 50 μ m. Data represent means \pm standard deviation (n = 3).



Through the images, it was also possible to quantify the FI for each region depending on the exposure interval (Figure 30). With a short exposure period (1 h), the FI in the branching zone (Figure 30a) was approximately 2 times higher than in the maturation zone (Figure 30b). In contrast, with exposure of 2 hours, there was a drastic drop in the fluorescence signal for this region and a significant increase in the maturation zone compared to the 1-hour interval. After prolonged exposure, high FI was still observed in both regions, with similar values after 24 and 36 hours of exposure.

The low penetration resulted in the accumulation of PCL/CSf+ATZ in the root cortex, reaching the vascular cylinder in small quantities, justifying the low FI in leaves (Figure 30c). Despite this, at 1 and 12 hours after exposure, the fluorescence signal in the leaves is approximately 2 times higher than in the negative control (Figure 9).

Figure 30. Fluorescence intensity measured as arbitrary fluorescence units (A.F.U.) by confocal microscopy in the (a) root maturation zone, (b) root branching zone, and (c) adaxial surface of the leaf. The negative control refers to plants maintained in distilled water. Letters indicate differences between time intervals (Tukey's test, $p \leq 0.05$) in each region. Data represent mean \pm standard deviation ($n = 3$).



5.5. DISCUSSION

The chitosan coating successfully altered the negative zeta potential of PCL+ATZ NCs to positive, as described by Grillo, Rosa and Fraceto (2014). This alteration occurs due to the electrostatic interactions of the negative surface of the NCs with the amino radicals present in chitosan molecules (LI et al., 2016; PAULUK et al., 2019). In the current work, the chitosan coating was achieved more successfully, with

encapsulation efficiency exceeding 90%, compared to the value of approximately 65% reported by Grillo, Rosa and Fraceto (2014).

Similar to previous studies (GRILLO, ROSA, FRACETO, 2014), the PCL-based formulations demonstrated stability over time, and the addition of chitosan coating did not alter this stability. Additionally, release assays illustrated that, even with the coating, the formulations effectively modulated the release of atrazine, exhibiting slower release compared to the commercial product, which could improve the herbicidal effect over time (CARVALHO et al., 2023).

Indeed, the PCL/CS+ATZ nanoformulation benefited the post-emergence activity of the active ingredient, with gains over the conventional ATZ formulation and the non-coated PCL+ATZ. The gains in PSII activity inhibition of PCL/CS+ATZ over ATZ ranged from 40 to 58% and reflected in better control of *B. pilosa* plants. Only the dose of 200 g a.i. ha⁻¹ of PCL+ATZ or PCL/CS+ATZ NCs was not sufficient for the control of *B. pilosa* plants, as described in previous studies (OLIVEIRA et al., 2015; SOUSA et al., 2018). However, with 1000 g a.i. ha⁻¹, PCL/CS+ATZ NCs provided excellent plant control, surpassing the results of ATZ at 2000 g a.i. ha⁻¹ and of PCL+ATZ at 1000 g a.i. ha⁻¹.

The recommended atrazine dose for weed control in the early post-emergence maize culture (two to four expanded true leaves) is 2000 g a.i. ha⁻¹. Therefore, a significant advancement is achieved with the possibility of a 50% reduction in the active ingredient dose without compromising weed control efficacy, as observed for PCL/CS+ATZ NCs. In greenhouse experiments, with a dose of 1000 g a.i. ha⁻¹ of PCL+ATZ NCs, similar control percentages were obtained as with 2000 g a.i. ha⁻¹ of ATZ in *Digitaria insularis* and *Raphanus raphanistrum* plants (SOUSA et al., 2020; TAKESHITA et al., 2021).

Nanocapsules of positively charged poly(lactic acid) loaded with abamectin showed higher adhesion to leaves (≈58%) compared to negatively charged nanocapsules (≈35%) in cucumber plants (YU et al., 2017). In both maize (monocotyledon) and cotton (eudicotyledon), positively charged nanoparticles reached the chloroplasts at higher quantities compared to negatively charged nanoparticles (HU et al., 2020). The epicuticular wax layer found in plants is formed by long-chain hydrocarbons with functional groups such as alcohols, aldehydes, and fatty acids, presenting a negatively charged surface (JETTER, KUNST, SAMUELS, 2006;

KRÄMER et al., 2021). Possibly, via foliar application, the chitosan coating favored greater interaction and adhesion to the leaf surfaces, as indicated by Grillo, Rosa and Fraceto (2014). Another consideration is the adhesive characteristic of chitosan-coated nanoparticles (PAULUK et al., 2019; CAMPOS et al., 2022), which may also have benefited the adhesion of NCs to the leaves and allowed the active ingredient to reach the action site at higher quantities.

The characteristics of the adaxial face with a high density of trichomes and low stomatal density provide a barrier to the penetration of herbicides into the leaves of *B. pilosa* (FERREIRA et al., 2002). However, the nanoencapsulation of atrazine by PCL (coated or not with chitosan) may have helped overcome these barriers and allowed the active ingredient to reach its site of action more easily, providing greater inhibition of PSII and plant death.

Some studies report that the nanoparticle charge, as well as the composition, has an important effect on the absorption and distribution of particles in the plant, influencing the interaction with functional groups present in the cell wall. Positively charged nanoparticles exhibit greater resistance to root permeability, resulting in greater surface accumulation (ZAHNG, YING, PING, 2021). Root hairs are responsible for increasing the contact surface area of the roots (CAI, AHMED, 2022). However, plants have high selectivity regarding the entry of inappropriate compounds into the vascular cylinder, added to which, the root epidermis acts as a selective barrier between the external environment and internal plant tissues (DE-JESÚS-GARCIA, ROSAS, DUBROVSKY, 2020).

Through the analysis of fluorescence images, it was possible to observe the accumulation of nanocapsules in the roots depending on the exposure time, mainly in the region of the epidermis and root hairs. These results ratified that chitosan nanocapsules have a high adsorption capacity to roots. In a recent study using fluorescently labeled polymers, chitosan nanocapsules also showed a high adsorption capacity to wheat seed surface, although the involved mechanisms are still unclear (LI et al., 2019).

The detection of a low fluorescence signal related to the nanocapsules in the *B. pilosa* leaves corroborated with the lower amounts of atrazine in this organ and lower inhibition of PSII activity than those observed in the treatment with commercial formulation. Similar results were obtained with zein nanocapsules coated

with chitosan, which accumulated in root hairs, epidermis, and cortex, without translocation to the leaves (CARVALHO et al., 2023). Thus, it seems that the greater interaction of PCL/CS+ATZ NCs with the root was detrimental to the translocation to the shoot.

The coating present in PCL/CS+ATZ NCs provided individual interactions with each of the two main entry gates for herbicides in plants. While it proved to be a promising strategy for improving the delivery of the active ingredient to target plants through foliar spray, the greater interaction of NCs with the roots hindered the arrival of the active ingredient at the action site. The biocompatible characteristics and reduction in phytotoxic effects attributed to chitosan coating have the potential to contribute to improving the interaction of NCs with the environment, thus reducing the negative aspects raised about PCL+ATZ. New studies evaluating the action of PCL/CS+ATZ NCs against non-target organisms remain necessary for this nanosystem.

REFERENCES

- ALAM. Asociación Latinoamericana de Malezas. Recommendations on unifying evaluation systems in weed control tests. 1974, 1 (1), 35-38.
- ASLANI, F.; BAGHERI, S.; JULKAPLI, N. M.; JURAIMI, A. S.; HASHEMI, F. S. G.; BAGHDADI, A. Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth: An Overview. **The Scientific World Journal**, 2014, 2014, 641759. DOI: 10.1155/2014/641759
- AVELLAN, A.; YUN, J.; MORAIS, B. P.; CLEMENT, E. T.; RODRIGUES, S. M.; LOWRY, G.V. Critical review: Role of inorganic nanoparticle properties on their foliar uptake and in planta translocation. **Environmental Science & Technology**, 2021, 55 (20), 13417-13431. DOI: 10.1021/acs.est.1c00178
- BOMBO, A. B.; PEREIRA, A. E. S.; LUSA, M. G.; OLIVEIRA, E. M.; OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; JESUS, M. B.; OLIVEIRA, H. C.; FRACETO, L. F.; MAYER, J. L. S. A mechanistic view of interactions of a nanoherbicide with target organism. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 2019, 67, 4453–4462. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00806
- CAI, G.; AHMED, M. A. The role of root hairs in water uptake: recent advances and future perspectives. **Journal of Experimental Botany**, 2022, 73 (11), 3330–3338. DOI: 10.1093/jxb/erac114
- CAMPOS, E. V. R.; PROENÇA, P. L. F.; COSTA, T. G.; LIMA, R.; FRACETO, L. F.; ARAUJO, D. R. Using Chitosan-Coated Polymeric Nanoparticles-Thermosensitive Hydrogels in association with Limonene as Skin Drug Delivery Strategy. **Biomed Research International**, 2022, 9165443. DOI: 10.1155/2022/9165443

- CARVALHO, L. B.; GODOY, I. S.; PREISLER, A. C.; PROENÇA, P. L. F.; SARAIVA-SANTOS, T.; VERRI JR, W. A.; OLIVEIRA, H. C.; DALAZEN, G.; FRACETO, L. F. Pre-emergence herbicidal efficiency and uptake of atrazine-loaded zein nanoparticles: a sustainable alternative to weed control. **Environmental Science: Nano**, 2023, 10, 1629. DOI: 10.1039/d2en01064j
- COLONNA, C.; CONTI, B.; PERUGINI, P.; PAVANETTO, F.; MODENA, T.; DORATI, R.; IADAROLA, P.; GENTA, I. Ex vivo evaluation of prolidase loaded chitosan nanoparticles for the enzyme replacement therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2008, 70 (1), 58-65. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.04.014
- DE-JESÚS-GARCÍA, R.; ROSAS, U.; DUBROVSKY, J. G. The barrier function of plant roots: biological bases for selective uptake and avoidance of soil compounds. **Functional Plant Biology**, 2020, 47, 383–397. DOI: 10.1071/FP19144
- DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Herbicides. **eLS** 2018. DOI: 10.1002/9780470015902.a0025264
- FERREIRA, E. A.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, E. A. M.; SILVA, A. A.; RUFINO, R. J. N. Leaf Anatomical Studies in Weed Species. II - *Bidens pilosa*, *Emilia sonchifolia*, *Ageratum conyzoides* and *Sonchus asper*. **Planta Daninha**, 2002, 20 (3), 327-335. DOI: 10.1590/S0100-83582002000300001
- GRILLO, R.; DOS SANTOS, N. Z. P.; MARUYAMA, C. R.; ROSA, A. H.; DE LIMA R.; FRACETO, L. F. Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, 2012, 231, 1-9. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.06.019
- GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Poly(e-caprolactone) nanocapsules carrying the herbicide atrazine: effect of chitosan-coating agent on physico-chemical stability and herbicide release profile. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2014, 11, 1691–1700. DOI: 10.1007/s13762-013-0358-1
- HANSEN, A. M.; TREVIÑO-QUINTANILLA, L. G.; MÁRQUEZ-PACHECO, H.; VILLADA-CANELA, M.; GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, L. C.; GUILLÉN-GARCÉS, R. A.; HERNÁNDEZ-ANTONIO, A. Atrazina: un herbicida polémico. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, 2013, 29, 65-84. (accessed 2024-02-25 from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37028958004>)
- HU, P.; AN, J.; FAULKNER, M. M.; WU, H.; LI, Z.; TIAN, X.; GIRALDO, J. P. Nanoparticle Charge and Size Control Foliar Delivery Efficiency to Plant Cells and Organelles. **ACS Nano**, 2020, 14 (7), 7970–7986. DOI: 10.1021/acsnano.9b09178
- JETTER, R.; KUNST, L.; SAMUELS, A. L. Composition of Plant Cuticular Waxes. In: *Biology of the Plant Cuticle*. 1st ed. **Annual Plant Reviews online** Vol. 23; Blackwell Publishing Ltd, 2006; pp 145-175. DOI: 10.1002/9781119312994.apr0232
- KAH, M.; TUFENKJI, N.; WHITE, J. C. Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. **Nature Nanotechnology**, 2019, 14, 532–540. DOI: 10.1038/s41565-019-0439-5
- KRÄHMER, H.; WALTER, H.; JESCHKE, P.; HAAF, K.; BAUR, P.; EVANS, R. What makes a molecule a pre- or a post-herbicide – how valuable are physicochemical parameters for their design? **Pest Management Science**, 2021, 77 (11), 4863-4873. DOI: 10.1002/ps.6535

- KUMAR, S.; NEHRA, M.; DILBAGHI, N.; MARRAZZA, G.; HASSAN, A. A.; KIM, K.-H. Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. **Journal of Controlled Release**, 2019, 294, 131–153. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.12.012
- LI, J.; HWANG, I-C.; CHEN, X.; PARK, H. J. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. **Food Hydrocolloids**, 2016, 60, 138-147. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.03.016
- LI, R.; HE, J.; XIE, H.; WANG, W.; BOSE, S. K.; SUN, Y.; HU, J.; YIN, H. Effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019, 126, 91-100. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.118
- NEGM, N. A.; HEFNI, H. H. H.; ABD-ELAAL, A. A. A.; BADR, E. A.; KANA, M. T. H. A. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 152, 681-702. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.196
- OLIVEIRA, H. C.; STOLF-MOREIRA, R.; MARTINEZ, C. B. R.; GRILLO, R.; DE JESUS, M. B.; FRACETO, L. F. Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. **PLoS ONE**, 2015, 10 (7), e0132971. DOI: 10.1371/journal.pone.0132971
- PASCOLI, M., LOPES-OLIVEIRA, P.J., FRACETO, L.F., SEABRA, A.B., OLIVEIRA, H.C. State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with agricultural applications. **Energy, Ecology and Environment**, 2018, 3 (3), 137–148. DOI: 10.1007/s40974-018-0090-2
- PAULUK, D.; PADILHA, A. K.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. **Food Hydrocolloids**, 2019, 94, 411-417. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.03.042
- PRADO-AUDELO, M. L.; CABALLERO-FLORÁN, I. H.; SHARIFI-RAD, J.; MENDONZA-MUÑOZ, N.; GONZÁLEZ-TORRES, M.; URBÁN-MORLÁN, Z.; FLORÁN, B.; CORTES, H.; LEYVA-GÓMEZ, G. Chitosan-decorated nanoparticles for drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2020, 59, 101896. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101896
- PREISLER, A. C.; CARVALHO, L. B.; SARAIVA-SANTOS, T.; VERRI JR, W. A.; MAYER, J. L. S.; FRACETO, L. F.; DALAZEN, G.; OLIVEIRA, H. C. Interaction of Nanoatrazine and Target Organism: Evaluation of Fate and Photosystem II Inhibition in Hydroponically Grown Mustard (*Brassica juncea*) Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2022, 70, 7644–7652. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c01601
- PREISLER, A. C.; GUARIZ, H. R.; CARVALHO, L. B.; PEREIRA, A. E. S.; OLIVEIRA, J. L.; FRACETO, L. F.; DALAZEN, G.; OLIVEIRA, H. C. Phytotoxicity evaluation of poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules prepared using different methods and compositions in *Brassica juncea* seeds. **Plant Nano Biology**, 2022, 1, 100003. DOI: 10.1016/j.plana.2022.100003.
- PREISLER, A. C.; PEREIRA, A. E. S.; CAMPOS, E. V. R.; DALAZEN, G.; FRACETO, L. F.; OLIVEIRA, H. C. Atrazine nanoencapsulation improves pre-emergence herbicidal activity against *Bidens pilosa* without enhancing long-term

- residual effect on Glycine max. **Pest Management Science**, 2020, 76 (1), 141–149. DOI: 10.1016/j.plana.2022.100003
- QU, R.-Y.; HE, B.; YANG, J.-F.; LIN, H.-Y.; YANG, W.-C.; WU, Q.-Y.; LI, Q. X.; YANG, G.-F. Where are the new herbicides?. **Pest Management Science**, 2021, 77, 2620-2625. DOI: 10.1002/ps.6285
- RECKER, R. A.; MITCHELL, P. D.; STOLTENBERG, D. E.; LAUER, J. G.; DAVIS, V. M. Late-season weed escape survey reveals discontinued atrazine use associated with greater abundance of broadleaf weeds. **Weed Technology**, 2015, 29 (3), 451–463. DOI: 10.1614/WT-D-14-00122.1
- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, 1987, 5, 37–42. DOI: 10.1016/0168-3659(87)90035-6
- SENE, L.; CONVERTI, A.; SECCHI, G. A. R.; SIMÃO, R. C. G. New Aspects on Atrazine Biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2010, 53 (2), 487-496. DOI: 10.1590/S1516-89132010000200030
- SINGH, A.; DHIMAN, N.; KAR, A. K.; SINGH, D.; PUROHIT, M. P.; GHOSH, D.; PATNAIK, S. Advances in controlled release pesticide formulations: Prospects to safer integrated pest management and sustainable agriculture, **Journal of Hazardous Materials**, 2020, 385, 121525. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121525
- SINGH, S.; KUMAR, V.; CHAUHAN, A.; DATTA, S.; WANI, A.B.; SINGH, N.; SINGH, J. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, 2018, 16, 211–237. DOI: 10.1007/s10311-017-0665-8
- SOUSA, B. T.; PEREIRA, A. E. S.; FRACETO, L. F.; OLIVEIRA, H. C.; DALAZEN, G. Effectiveness of nanoatrazine in post-emergent control of the tolerant weed *Digitaria insularis*. **Journal of Plant Protection Research**, 2020, 60 (2), 185–192. DOI: 10.24425/jppr.2020.133311
- SOUSA, B. T.; PEREIRA, A. E. S.; FRACETO, L. F.; OLIVEIRA, H. C.; DALAZEN, G. Post-emergence herbicidal activity of nanoatrazine against *Alternanthera tenella* Colla plants compared to other weed species. **Heliyon**, 2022, 8, e09902. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09902
- SOUSA, G. F.; GOMES, D. G.; CAMPOS, E. V.; OLIVEIRA, J. L.; FRACETO, L. F.; STOLF-MOREIRA, R.; OLIVEIRA, H. C. Post-emergence herbicidal activity of nanoatrazine against susceptible weeds. **Frontiers in Environmental Science**, 2018, 6 (12), 1–6. DOI: 10.3389/fenvs.2018.00012
- TAKESHITA, V.; SOUSA, B. T.; PREISLER, A. C.; CARVALHO, L. B.; PEREIRA, A. E. S.; TORNISIELO, V. L.; DALAZEN, G.; OLIVEIRA, H. C.; FRACETO, L. F. Foliar absorption and field herbicidal studies of atrazine-loaded polymeric nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, 2021, 418, 126350. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126350
- USMAN, M.; FAROOQB, M.; WAKEEL, A.; NAWAZ, A.; CHEEMA, S.A.; REHMAN, H.; ASHRAF, I.; SANAUULLAH, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the Total Environment**, 2020, 721, 137778. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137778
- WALKER, G. W.; KOOKANA, R. S.; SMITH, N. E.; KAH, M.; DOOLETTE, C. L.;

- REEVES, P. T.; LOVELL, W.; ANDERSON, D. J.; TURNEY, T. W.; NAVARRO, D. A. Ecological Risk Assessment of Nano-enabled Pesticides: A Perspective on Problem Formulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2018, 66, 6480–6486. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b02373
- WANG, D.; SALEH, N. B.; BYRO, A. ZEEP, R.; SAHLE-DEMESSIE, E.; LUXTON, T. P.; HO, K. T.; BURGESS, R. M.; FLURY, M.; WHITE, J. C.; SU, C. Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security. **Nature Nanotechnology**, 2022, 17, 347–360. DOI: 10.1038/s41565-022-01082-8
- WU, J.; ZHAI, Y.; MONIKH, F. A.; ARENAS-LAGO, D.; GRILLO, R.; VIJVER, M. G.; PEIJNENBURG, W. J. G. M. The Differences between the Effects of a Nanoformulation and a Conventional Form of Atrazine to Lettuce: Physiological Responses, Defense Mechanisms, and Nutrient Displacement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2021, 69, 12527–12540. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c01382
- YU, M.; YAO, J.; LIANG, J.; ZENG, Z.; CUI, B.; ZHAO, X.; SUN, C.; WANG, Y.; LIU, G.; CUI, H. Development of functionalized abamectin poly(lactic acid) nanoparticles with regulatable adhesion to enhance foliar retention. **RSC Advances**, 2017, 7 (19), 11271–11280. DOI: 10.1039/c6ra27345a
- ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, 2015, 2 (3), 204–226. DOI: 10.1002/cben.201400025
- ZHANG Y.; FU, L.; LI, S.; YAN, J.; SUN, M.; GIRALDO, J.P.; MATYJASZEWSKI, K.; TILTON, R. D.; LOWRY, G.V. Star Polymer Size, Charge Content, and Hydrophobicity Affect their Leaf Uptake and Translocation in Plants. **Environmental Science and Technology**, 2021, 55, 10758–10768. DOI: 10.1021/acs.est.1c01065
- ZHANG, Q.; YING, Y.; PING, J. Recent Advances in Plant Nanoscience. **Advanced Science**, 2021, 9 (2), 2103414. DOI: 10.1002/adv.202103414

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de herbicidas para o controle químico de plantas daninhas ainda é uma importante prática dentro do manejo integrado. O uso dessas moléculas químicas deve ser realizado com prudência, a fim de preservar a eficiência no controle das plantas e de evitar o agravamento da contaminação ambiental. A atrazina é uma importante molécula química utilizada em grande escala (dose e área de aplicação) durante o cultivo de milho. Os métodos de aplicação destas moléculas que visem redução de dose e aumento de eficiência são essenciais.

As plantas de milho apresentaram-se tolerantes as formulações de nanoatrazina encapsuladas por PCL, PCL com revestimento de quitosana ou zeína, bem como aos polímeros que constituem as formulações. A aplicação das formulações de nanoatrazina resultaram em maiores respostas de defesa contra o estresse oxidativo causado pela inibição da atividade do FSII, diferente das plantas aplicadas com ATZ, que apresentaram maiores respostas detoxificantes de combate a atividade do ingrediente ativo e menor nível de estresse oxidativo.

Tanto a nanoatrazina encapsulada por PCL quanto por zeína potencializaram a atividade do ingrediente ativo em pós-emergência no controle das plantas daninhas das espécies *B. pilosa* e *R. sativus*. A maior ação herbicida esteve relacionada à maior geração de estresse oxidativo, havendo diferenças no modo de ação da formulação em cada uma das espécies avaliadas. A aplicação de nanoatrazina nas plantas de *B. pilosa* (suscetíveis) resultou em maiores porcentagens de inibição da atividade do FSII, desencadeou maior estímulo a atividade das enzimas de ação antioxidante e a mais rápida expressão de sintomas visuais da ação do herbicida que nas plantas de *R. sativus* (tolerantes).

O revestimento das nanocápsulas de PCL+ATZ por quitosana foi obtido com êxito. O nanossistema de nanocápsulas PCL/CS+ATZ potencializou a atividade herbicida pós-emergente de atrazina contra as plantas de *B. pilosa*, superando as formulações PCL+ATZ e ATZ em inibição do FSII e controle de plantas. Quando em hidroponia, o revestimento com quitosana foi prejudicial à absorção radicial, onde foi encontrada maior interação das nanocápsulas com a epiderme das raízes de *B. pilosa*. O revestimento das nanocápsulas mostrou-se uma alternativa estratégica para alteração do pontencial zeta de nanocápsulas de sistemas já

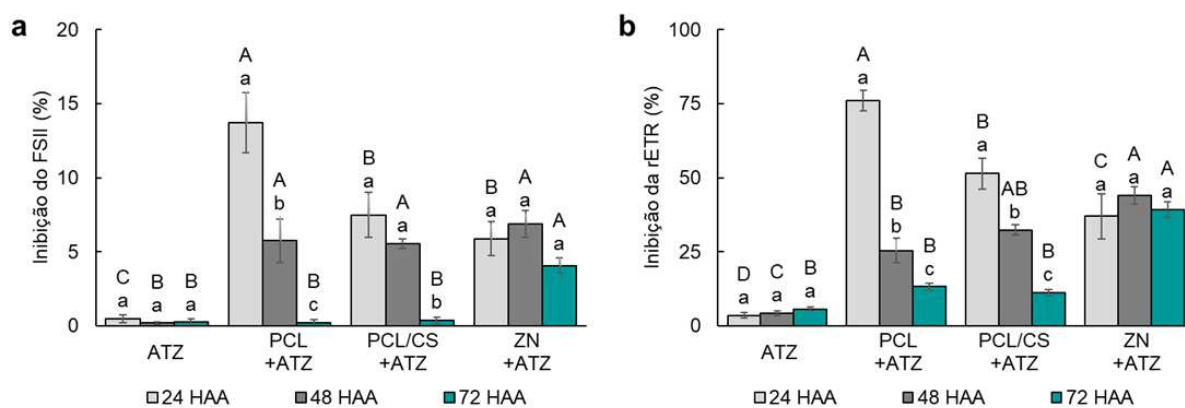
estabelecidos, melhorando a sua interação com as superfícies externas das plantas e aprimorando a entrega do ingrediente ativo na aplicação foliar.

A nanoatrazina mostra-se como um modelo promissor de estudo dos benefícios da incorporação da nanotecnologia à agricultura. A incorporação das moléculas herbicida no interior de nanocápsulas poliméricas ou proteicas é capaz de aprimorar a eficiência herbicida, propiciando a redução das doses de ingrediente ativo dispensadas nas lavouras e no meio ambiente. A partir dos três nanossistemas carreadores de atrazina desenvolvidos, surgem novas demandas de estudos da aplicação destes nanossistemas, seja em outras espécies de plantas daninhas, diferentes formas de aplicação, ambientes, ou em mistura com outras formulações herbicidas.

APÊNDICE A

MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO I

Figura S1. (a) Inibição da eficiência máxima do fotossistema II (FSII) e **(b)** Inibição da taxa relativa do transporte de elétrons (rETR) de plantas de milho (*Zea mays*) nos tempos de 24, 48 e 72 horas após aplicação (HAA) de atrazina nas formulações convencional (ATZ) e nanoencapsulada por poli(épsilon-caprolactona) (PCL+ATZ), poli(épsilon-caprolactona) com revestimento de quitosana (PCL/CS+ATZ) ou zeína (ZN+ATZ), na dose de 2000 g i.a. ha⁻¹.



Fonte: O próprio autor.

APÊNDICE B
MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO III

Table S1. Final concentration of salts in the nutrient solution used in the experiment with black-jack (*Bidens pilosa*) in hydroponics.

Salt	Concentration
KH ₂ PO ₄	1 mM
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4 mM
K ₂ SO ₄	2 mM
NH ₄ NO ₃	4 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 mM
H ₃ BO ₃	92,5 µM
MnCl ₂ .4H ₂ O	18 µM
ZnCl ₂	1,5 µM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,56 µM
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,66 µM
FeSO ₄	100 µM

Figure S2. Infrared spectra for chitosan (CS) and fluorescein isocyanate-labeled chitosan (CS-FITC).

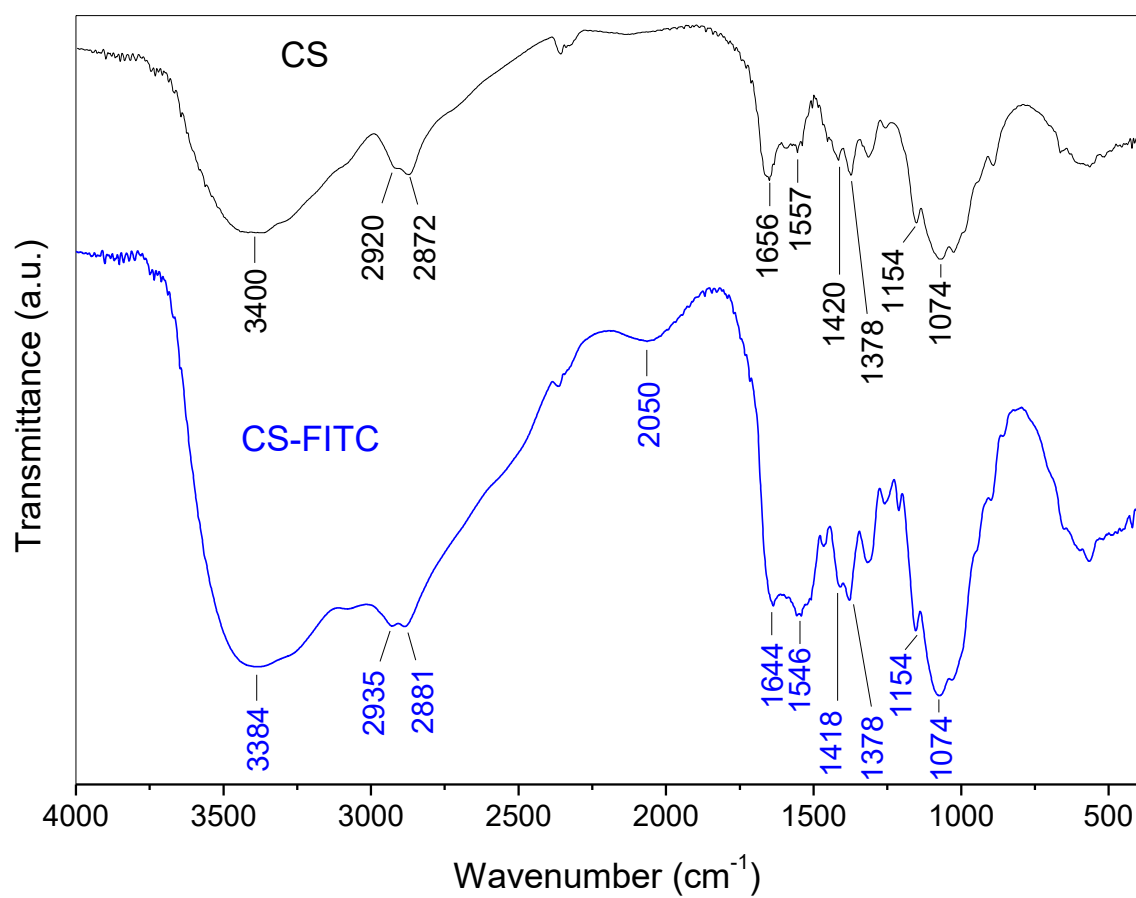


Table S2. Assignments of the absorption bands of the infrared spectrum for chitosan (CS) and chitosan labeled with fluorescein isocyanate (CS-FITC).

Functional group assignment	Absorption bands, wavenumber (cm ⁻¹)	
	CS	CS-FITC
Axial stretching of O-H and N-H bonds	3400	3384
Axial stretching of C-H bonds	2920 - 2872	2935 - 2881
Stretching of N=C=O bonds		2050
Axial stretching of C=O bonds	1656	1644
Angular deformation of N-H bonds of the amine groups	1557	1546
Coupling of C-N axial stretching and N-H angular deformation	1420 - 1378	1418 - 1378
Stretching of C-O glycosidic bonds	1154	1154
Stretching of C-O-C glycosidic bonds	1074	1074

Figure S3. Particle size distribution PCL/CSf+ATZ obtained by nanoparticle tracking technique (NTA).

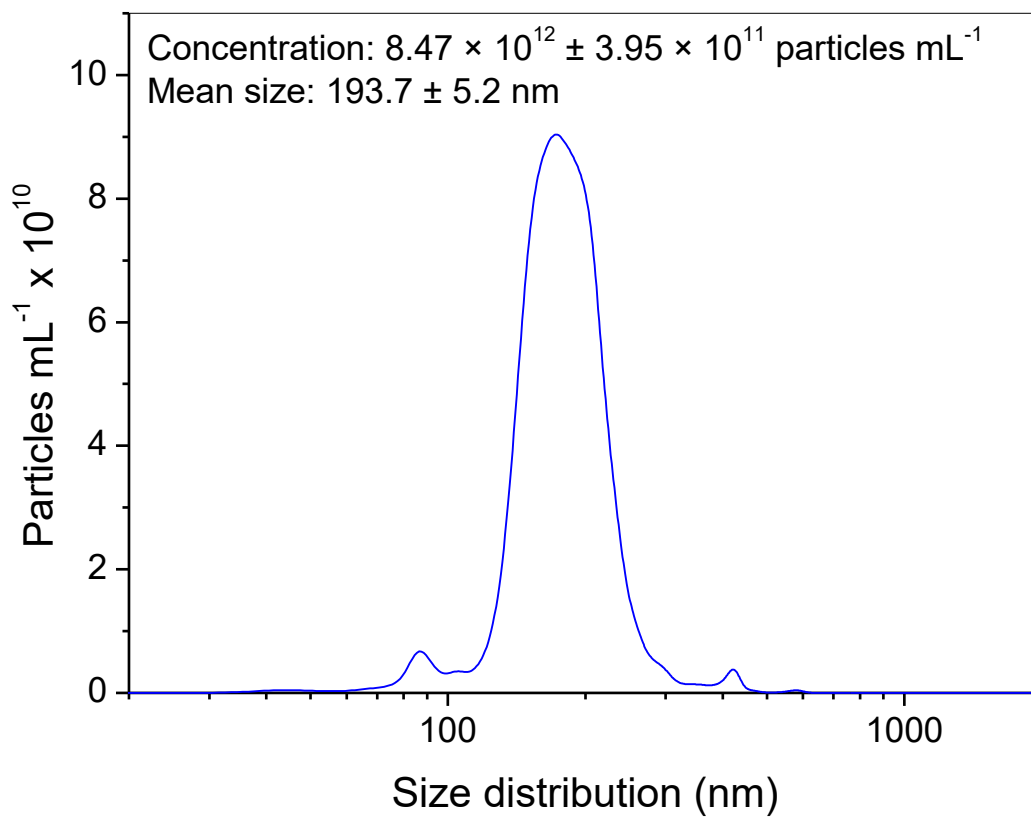


Figure S4. Representative confocal microscopy images of PCL nanoparticles coated with chitosan containing atrazine and labeled with FITC in *B. pilosa* tissues as a function of exposure time in the hydroponic system (1, 2, 4, 12, 24 and 36 h after exposure). The figure shows representative images of the leaf, root in the maturation zone and root in the branching zone. Images were obtained at 20x magnification. Bars = 50 μm

