



EFEITO DA NANOATRAZINA NO CRESCIMENTO DE BIOINDICADORES AQUÁTICOS ATRAVÉS DA TRANSFERÊNCIA TRÓFICA

Rafaela Monique Fernandes **Dionisio**¹; Rodrigo Fernandes **Castanha**²; José Henrique **Vallim**³;
Vera Lucia S. S. de **Castro**⁴; Claudio Martín **Jonsson**⁵

Nº 22410

RESUMO – *A atrazina é um herbicida que tem se destacado nos últimos anos por ser um dos agrotóxicos mais comercializados no País, sendo utilizada para o controle de ervas daninhas, principalmente em plantações de milho, cana-de-açúcar e sorgo. O nanoencapsulamento deste composto tem sido uma estratégia para combater impactos ambientais na agricultura. O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da nanoatrazina no crescimento de bioindicadores através da transferência trófica, com foco nos efeitos nocivos para espécies presentes em ambientes aquáticos. Os organismos foram expostos aos compostos ATZ-NPZ (atrazina encapsulada em nanopartículas de zeína) e ATZ-PCL (atrazina encapsulada em nanopartículas de poli-épsilon-caprolactona), na presença e ausência de matéria orgânica. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) de todos os tratamentos em relação aos controles, com exceção em ATZ-PCL 0,002 mg/L na ausência de matéria orgânica para *Daphnia magna*. Este microcrustáceo apresentou aumento significativo de 31% na taxa de crescimento em relação ao grupo controle. Nosso estudo mostra não haver efeitos adversos nos desenvolvimentos dos bioindicadores, pois a transferência trófica destes compostos não geraria riscos aos peixes e microcrustáceos. Os resultados indicam aspectos positivos na utilização de nanoatrazina como uma alternativa viável para a agricultura, visando uma diminuição nos impactos ambientais.*

Palavras-chaves: Ecotoxicologia, Nanoatrazina, Toxicidade, Bioindicadores, Transferência trófica.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, UNIP, Campinas-SP; rafaeladionisio0307@gmail.com

2 Colaborador: Técnico, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

3 Colaborador: Analista, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

4 Colaborador: Pesquisadora, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

5 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; claudio.jonsson@embrapa.br



ABSTRACT - *Atrazine is an herbicide that has stood out in recent years for being one of the most commercialized pesticides in the country, being used to control weeds, mainly in corn, sugarcane and sorghum plantations. The nanoencapsulation of this compound has been a strategy to combat environmental impacts in agriculture. The objective of this work is to evaluate the effects of nanoatrazine on the growth of bioindicators through trophic transfer, focusing on the harmful effects for species present in aquatic environments. The organisms were exposed to the compounds ATZ-NPZ (atrazine encapsulated in zeine nanoparticles) and ATZ-PCL (atrazine encapsulated in poli-épsilon-caprolactona nanoparticles) in the presence and absence of organic matter. There was no significant difference ($p > 0.05$) of all treatments compared to controls, with the exception of ATZ-PCL 0.002 mg/L in the absence of organic matter for *Daphnia magna*. This microcrustacean showed a significant increase of 31% in the rate growth in relation to the control group. Our study shows that there are no adverse effects on the development of bioindicators, as the trophic transfer of these compounds would not generate risks to fish and microcrustaceans. The results indicate positive aspects in the use of nanoatrazine as a viable alternative for agriculture, aiming at a reduction in environmental impacts.*

Keywords: Ecotoxicology, Nanoatrazine, Toxicity, Bioindicators, Trophic transfer.

1. INTRODUÇÃO

É notável que o uso de agrotóxicos vem aumentando a produtividade agrícola no Brasil, porém, é evidente a existência de inúmeros efeitos tóxicos indesejáveis dessas substâncias nos ecossistemas, que estão sendo encontradas em quantidades preocupantes em corpos hídricos e subterrâneos.

A atrazina é um herbicida utilizado em grande escala no País. De acordo com o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA, o composto esteve na lista dos dez princípios ativos mais vendidos entre os anos de 2009 e 2016. Nesse período, foram comercializados aproximadamente 160 mil toneladas de princípios ativos., sendo a atrazina o quarto mais vendido no ano de 2016. O boletim anual de agrotóxicos elaborado pelo IBAMA em 2020, revela que nesse ano a venda total de produtos químicos e bioquímicos foi de 685.745,68 toneladas de ingredientes ativos, apresentando a atrazina, novamente, como um dos 10 mais comercializados (DIAS *et al.*, 2018).

Este herbicida, de tipo triazina é usado para o controle de ervas daninhas em plantações de milho, cana-de-açúcar e sorgo. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da fotossíntese em



plantas suscetíveis levando-as a morte. Entretanto, não fica restrita somente a estes organismos alvos, sendo encontrada além da área de sua aplicação devido a seu alto potencial de lixiviação tais como: água da chuva e irrigação, além da contaminação das águas subterrâneas (UNESP, 2022).

A nanotecnologia é um ramo da ciência que estuda e constrói materiais em uma escala muito pequena, a nanométrica, e tem sido uma possibilidade para combater impactos ambientais na agricultura através do encapsulamento de defensivos químicos em nanopartículas (nanopesticidas). Seu objetivo é a liberação lenta e constante do ingrediente ativo, como a atrazina. Dessa forma, o produto é completamente utilizado no controle de pragas e doenças, propiciando o uso de menor quantidade do ingrediente ativo na planta e no solo. (CROPLIFE, 2022)

A zeína é uma proteína extraída de plantas, usada como base para micro encapsulamento de compostos, aumentando sua solubilidade e prolongando sua liberação. A poli-épsilon-caprolactona é um polímero usado em nanoencapsulamento de pesticidas com o objetivo de aumentar sua eficácia devido à sua liberação prolongada. (FREITAS, 2016)

As nanopartículas podem ser bioacumuladas e transferidas de um nível trófico para outro através da cadeia alimentar. Os estudos de transferência trófica permitem diferenciar a importância das diferentes vias de exposição, o que é útil na análise de risco (HOLBROOK *et al.*, 2008). As algas são produtoras primárias de energia como fonte de alimento e quaisquer impactos neste nível podem afetar a saúde dos organismos em níveis tróficos mais altos (LEKAMGE *et al.*, 2019). MCTEER *et al.* (2014) relataram uma redução significativa na alimentação quando dafnídeos foram alimentados com algas contaminadas com nanopartículas de prata em comparação com algas não tratadas, o que sugere efeitos deletérios no crescimento e reprodução.

Organismos bioindicadores têm sido usados como modelos experimentais em testes toxicológicos devido sua alta sensibilidade, tais como *Daphnia magna*. Este é um microcrustáceo encontrado em águas doces, comumente conhecido como pulga d'água. Trata-se de um organismo filtrador que se alimenta de algas, rotíferos e infusórios, e possuem um importante papel na cadeia alimentar. Além disso seu fácil cultivo e rápida reprodução faz com que esse organismo seja viável para experimentos de toxicidade aguda e subcrônica (TKACZYK *et al.* 2021; CROA CLUB DE ACUARISMO, 2022)

Danio rerio, mais conhecido como zebrafish ou paulistinha, é um peixe de água doce com aproximadamente cinco centímetros quando adulto, com embriões transparentes, utilizado em pesquisas principalmente por apresentar um desenvolvimento facilmente observável e testável (TESOLIN *et al.*, 2014).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da nanoatrazina no crescimento de bioindicadores através da transferência trófica, com foco nos efeitos nocivos para espécies presentes em ambientes aquáticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os organismos foram testados em diferentes concentrações de atrazina encapsulada em nanopartículas de zeína (ATZ-NPZ), assim como em nanopartículas de poli-épsilon-caprolactona, (ATZ-PCL) na ausência e presença de NOM (Natural Organic Matter, 10 mg/L), uma matriz orgânica complexa, construída principalmente por ácidos húmicos e fúlvicos presentes no ambiente aquático. Os procedimentos de manejo dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso Animal da Embrapa Meio Ambiente (protocolo nº 006/2019).

Exposição das algas às nanoformulações:

Culturas da microalga cloroficea *Raphidocelis subcapitata* (Figura 1) com concentração algacea do inóculo inicial de 7×10^5 células / mL foram expostas às concentrações subletais de ATZ-NPZ nas concentrações equivalentes a 0,058; 0,0116; e 0,0058 mg/L. Analogamente, culturas foram também expostas a concentrações de 0,02; 0,004; e 0,002 mg/L de ATZ-PCL. Os valores de concentração-teste representaram, respectivamente, a C110-96h (concentração inibitória em 10% do crescimento algaceo por 96 h); 1/5 de C110-96h; e 1/10 de C110-96h, de modo a manter a viabilidade e permitir o crescimento das microalgas com concomitante incorporação do herbicida nestes organismos. As exposições foram realizadas na ausência e presença de NOM (10 mg/L) durante 96h.



Figura 1. Detalhe microscópico de cultura de *Raphidocelis subcapitata*.

Fonte: SAG 61.81 *Raphidocelis*

subcapitata https://sagdb.unigoettingen.de/detailedList.php?str_number=61.81

Após 8 dias de crescimento, tubos tipo Falcon de 50 ml foram autoclavados para concentração das algas de cada erlenmeyers e ressuspensão das mesmas em água reconstituída e meio de embrião (composição para 1L: NaHCO₃ – 35mg; MgSO₄ – 60mg; KCl – 4mg; e CaSO₄·2H₂O – 60mg)

(UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002), para serem utilizados nos ensaios de bioconcentração com *D. magna* (Figura 2) e embriões de *D. rerio* (Figura 3).



Figura 2: Neonato de *Daphnia magna*

Fonte: [https://commons.wikimedia.org/wiki/](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Daphnia_magna_hatchling_from_restingegg.JPG)

File:Daphnia_magna_hatchling_from_restingegg.JPG



Figura 3: Estágio inicial de embrião de *Danio rerio*.

Fonte: *Danio rerio* (zebrafish) embryonic development.

<http://bioimages.vanderbilt.edu/pages/zfish-devel.htm>

Exposição dos organismos-teste através do alimento.

Espécimes de *D. magna* foram mantidos em aquários (40 x 20 x 15 cm), contendo água reconstituída com nutrientes, preparada conforme a metodologia de JONSSON e MAIA (1999). A temperatura e a intensidade da luz foram mantidas em 20°C e 1.000 lux, respectivamente. A microalga *R. subcapitata* foi usada para alimentar as culturas uma vez por dia. Neonatos com menos de 24 horas foram separados das culturas e usados como organismos-teste.

Adultos de *D. rerio* do tipo selvagem foram alojados em um sistema “rack”. Após o acasalamento, os ovos (Figura 3) foram coletados, lavados e selecionados por sua viabilidade através de observação microscópica. Larvas de *D. rerio* (Figura 4) (n=24), eclodidas dos ovos, foram usadas para a valiação da toxicidade.



Figura 4: Estágio larval de *Danio rerio*.

Fonte: acervo do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança.

Os organismos-teste foram alocados em 14 placas de polietireno contendo 24 poços cada, sendo dois para controle e 12 para as concentrações de NPZ 0,058; 0,0116 ; 0,0058 mg/L e PCL 0,02 ;0,004; 0,002 mg/L, e foram alimentadas (30 uL/dia para as Daphnias e somente 1x para o *D. rerio*) com algas previamente expostas às duas nanoformulações em meio ausente de NOM ou na presença deste.

Medidas do comprimento corpóreo de *D. rerio* foram realizadas após 96 h da eclosão dos ovos e até as 192 horas de desenvolvimento larval. No caso de *D. magna*, as medidas foram realizadas desde a coleta dos neonatos até as 96 h de alimentação. As medições foram realizadas através da obtenção de microfotografias utilizando um estereomicroscópio com câmera (Optika Câmera 4083B3, Optika^R) acoplado a um sistema de medição (Optika View Version 7.1.1.5 softwares) em um aumento de 2xx.

Análise de dados

A análise de regressão linear da porcentagem de crescimento em função do tempo foi aplicada, onde o coeficiente angular foi equivalente a taxa de crescimento (BASU; PAL, 2011). O módulo “One Way ANOVA” do programa Statgraphics Centurion XVII foi usado para comparar as taxas de crescimento entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey.

Os dados foram analisados usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (seguido pela análise post – hoc de Bonferroni) quando as taxas de crescimento não satisfizessem a suposição de homogeneidade de variância. Os dados foram considerados estatisticamente significativos em nível de certeza de 95% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As maiores concentrações avaliadas para ATZ-NPZ e ATZ-PCL em que as algas foram expostas às nanoformulações foram 30 e 10 vezes maiores, respectivamente, que a concentração máxima permissível do herbicida para a proteção das comunidades aquáticas segundo a legislação brasileira (0,002 mg/L; CONAMA, 2005).

As curvas de crescimento dos organismos-teste alimentados com algas que foram expostas às duas formulações do nanomaterial, tanto na ausência como na presença de NOM estão apresentadas nas Figuras 5 a 8. As curvas permitiram calcular as taxas específicas de crescimento que foram comparadas pelo teste de Tukey onde se constatou ausência de diferença significativa ($p > 0,05$) em relação aos controles para todos os tratamentos, com exceção em ATZ-PCL 0,002 mg/L na ausência de NOM para *D. magna* (Tabela 1).

Em analogia aos resultados do presente trabalho, ANDRADE *et al.* (2019) relataram que a nanoencapsulação da atrazina protege a biota aquática dos efeitos adversos deste herbicida.

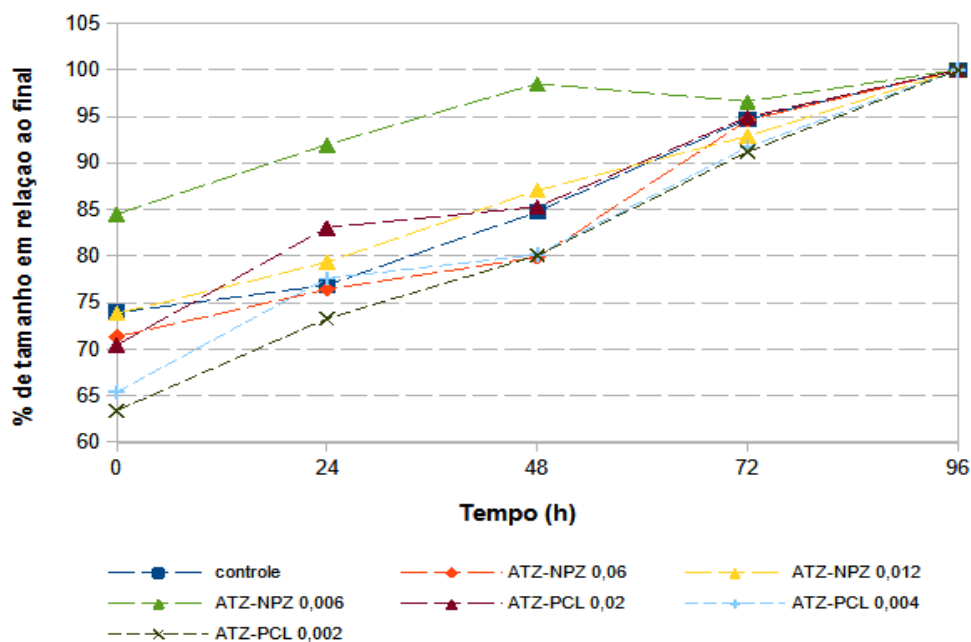


Figura 5: Curvas de crescimento corpóreo de *Daphnia magna* alimentadas com algas (*Raphidocelis subcapitata*) previamente expostas a ATZ-NPZ (atrazina encapsulada em nanopartículas de zeína) e ATZ-PCL (atrazina encapsulada em nanopartículas de poli-épsilon-caprolactona) na ausência de NOM (ácido húmico), sob diferentes concentrações do herbicida (mg/L).

Nesta situação, constatou-se um aumento significativo de 31% na taxa de crescimento do microcrustáceo em relação ao controle. Não existe uma explicação para esse efeito no presente estudo. Porém, de acordo com Marcus e Fiumera (2016), a aceleração do tempo de desenvolvimento de artrópodes em baixas concentrações de atrazina foi observado. Os autores relacionam este efeito a uma possível disfunção endócrina que envolveria a sinalização celular mediada pela insulina.

Em analogia aos resultados do presente trabalho, ANDRADE *et al.* (2019) relataram que a nanoencapsulação da atrazina protege a biota aquática dos efeitos adversos deste herbicida.

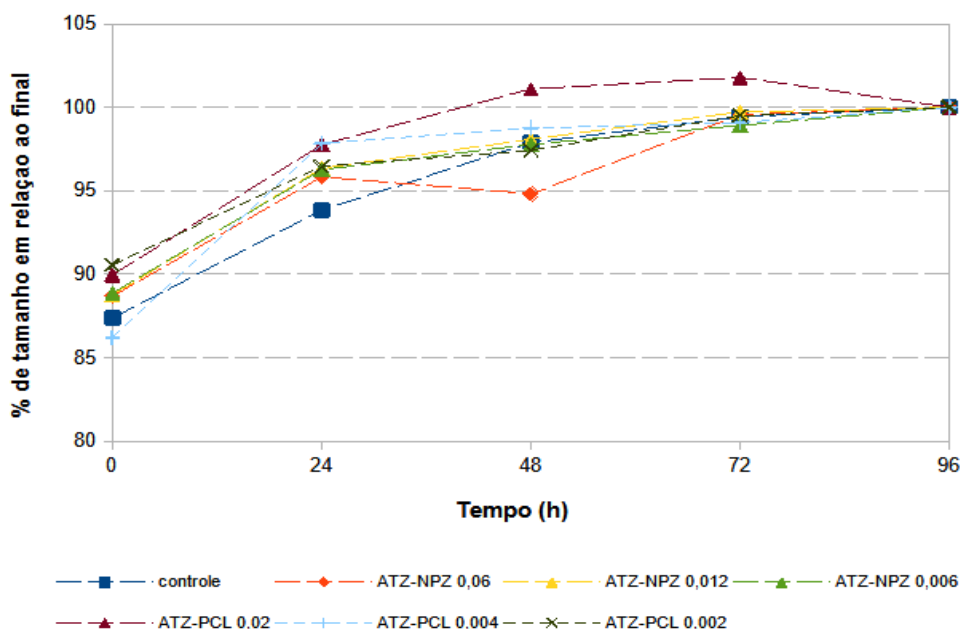


Figura 6: Curvas de crescimento corpóreo de *Daphnia magna* alimentadas com algas (*Raphidocelis subcapitata*) previamente expostas a ATZ-NPZ (atrazina encapsulada em nanopartículas de zeína) e ATZ-PCL (atrazina encapsulada em nanopartículas de poli-épsilon-caprolactona) na presença de NOM (Natural Organic Matter, 10 mg/L), sob diferentes concentrações do herbicida (mg/L).

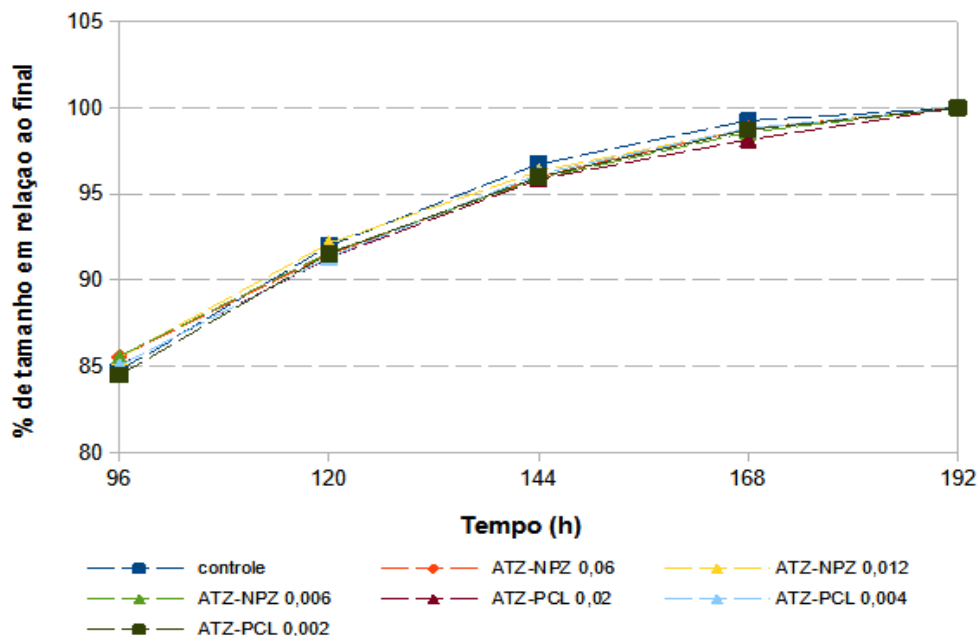


Figura 7: Curvas de crescimento corpóreo de larvas de *Danio rerio* no período de 96 a 192 horas, após eclosão dos ovos, sob alimentação com microalgas (*Raphidocelis subcapitata*) previamente expostas a diferentes concentrações de ATZ-NPZ (atrazina encapsulada em nanopartículas de zeína) e ATZ-PCL (atrazina encapsulada em nanopartículas de poli-épsilon-caprolactona) na ausência de NOM (Natural Organic Matter, 10 mg/L).

4. CONCLUSÃO

Não se constataram efeitos adversos associados ao desenvolvimento dos bioindicadores *D. magna* e *D. rerio* tanto na ausência ou presença de matéria orgânica, sugerindo que a transferência trófica “via algas” da ATZ nas nanoformulações avaliadas não apresentaria risco para peixes e microcrustáceos e, portanto, não representaria um risco em seu uso e comercialização em formulações contendo nanopartículas de NPZ e PCL. Portanto, neste cenário, os resultados obtidos fornecerão importantes informações para o desenvolvimento de novos nanomateriais e as interações destes com material orgânico presente no ambiente. Além disto, fornecerão informações sobre os efeitos e riscos ecológicos da contaminação ambiental por esses agentes, gerando dados que poderão auxiliar no seu manejo para a redução dos impactos na biota aquática. Os dados poderão ser úteis para dar subsídios a legislações ambientais, em níveis nacional e internacional.

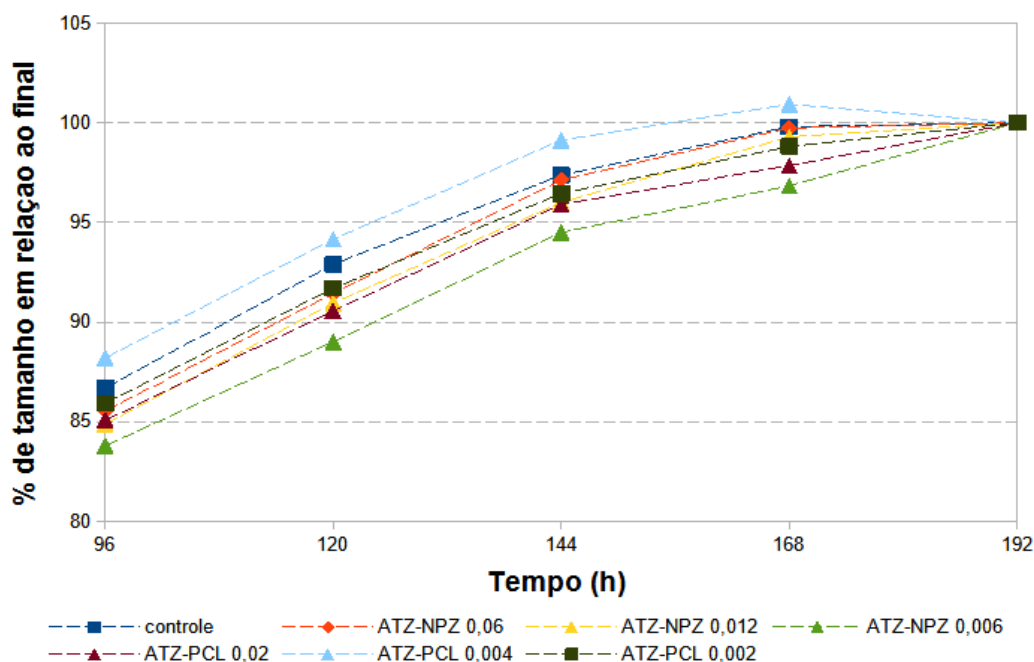


Figura 8: Curvas de crescimento corpóreo de larvas de *Danio rerio* no período de 96 a 192 horas, após eclosão dos ovos, sob alimentação com microalgas (*Raphidocelis subcapitata*) previamente expostas a diferentes concentrações de ATZ-NPZ (atrazina encapsulada em nanopartículas de zeína) e ATZ-PCL (atrazina encapsulada em nanopartículas de poli-épsilon-caprolactona) na presença de NOM (Natural Organic Matter, 10 mg/L).

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica para a primeira autora, à Embrapa Meio Ambiente pela disponibilização de recursos e oportunidade de desenvolvimento da pesquisa e ao Instituto de Ciência e Tecnologia da Unesp (Campus Sorocaba) pelo fornecimento do nanomaterial utilizado nos testes toxicológicos.



TABELA 1: Valores médios (desvio padrão) da taxa de crescimento (% de comprimento/h) dos organismos-teste sob alimentação com microalgas (*R. subcapitata*) previamente expostas a diferentes concentrações de ATZ-NPZ (atrazina encapsulada em nanopartículas de zeína) e ATZ-PCL (atrazina encapsulada em nanopartículas de poli-épsilon-caprolactona) na ausência e presença de NOM (Natural Organic Matter, 10 mg/L).

	Algas em ATZ-NPZ (mg/L)			Algas em ATZ-PCL (mg/L)			
	0,006 (1/10 CI10-96h)	0,016 (1/5 CI10-96h)	0,06 (CI10-96h)	0,002 (1/10 CI10-96h)	0,004 (1/5 CI10-96h)	0,02 (CI10-96h)	
D. magna	Sem NOM						
	0,2915 (0,0941)	0,2143 (0,0975)	0,2742 (0,0793)	0,3145 (0,1088)	0,3795* (0,0335)	0,3471 (0,0327)	0,2958 (0,0344)
	Com NOM						
	0,1413 (0,0560)	0,1081 (0,0562)	0,1154 (0,0409)	0,1098 (0,0521)	0,0969 (0,0433)	0,1146 (0,0483)	0,1023 (0,0148)
	Sem NOM						
	0,1572 (0,0384)	0,14911 (0,0397)	0,1484 (0,0386)	0,1508 (0,0384)	0,1592 (0,0325)	0,1558 (0,0330)	0,1531 (0,0323)
Danio rerio	Com NOM						
	0,1413 (0,0558)	0,1081 (0,0562)	0,1154 (0,0409)	0,1098 (0,0521)	0,0969 (0,0433)	0,1146 (0,0483)	0,1023 (0,0420)

* Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

6. REFERÊNCIAS

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

BASU, P.; PAL, A. Spatio-temporal analysis of development of basal roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 7, p. 982–985. 2011.

CONAMA. Resolução nº 357, 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, DF, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

CROA CLUB DE ACUARISMO. **La Daphnia**: pulga de água. Disponível em: <<https://www.croa.com.ar/la-daphnia-pulga-agua/>>. Acesso em: 01 ago. 2022.

CROPLIFE. **Nanotecnologia potencializa a ação dos defensivos agrícolas**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/noticias/nanotecnologia-potencializa-a-acao-dos-defensivos-agricolas/#:~:text=O%20Brasil%20avan>>. Acesso em: 29 jun. 2022.

DIAS, A. C. L. *et al.* Ocorrência de atrazina em águas no Brasil e remoção no tratamento da água: revisão bibliográfica. **Revista Internacional de Ciências**, v. 8, n. 2, p. 149–168, 2018.

FREITAS, D. Z. **Nanopartículas de zeína e quitosana contendo óleo essencial de *Ocimum gratissimum* l. quimiotipos eugenol e geraniol**. 2016. 157 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

HOLBROOK, R. D. *et al.* Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 6, p. 352-355, 2008.

JONSSON, C. M.; MAIA, A. de H. N. **Protocolo**: avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas: uma proposta para os órgãos federais registrantes: testes toxicopatológicos em organismos não-alvo do ambiente aquático: organismos zooplancônicos, fitoplancônicos e vertebrados. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 33 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 11).

LEKAMGE, S. *et al.* The toxicity of coated silver nanoparticles to *Daphnia carinata* and trophic transfer from alga *Raphidocelis subcapitata*. **PLoS One**, v. 14, n.4, 2019.

MARCUS, S. R.; FIUMERA, A. C. Atrazine exposure affects longevity, development time and body size in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 91-92, p.18-25, 2016.

MCTEER, J. *et al.* Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 3, 305-316, 2014.

TESOLIN, G. A. S. *et al.* Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*). **O Mundo da Saúde (Online)**, v. 38, p. 86-97, 2014.

TKACZYK, A. *et al.* *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: a review. **Science of the Total Environment**, v. 763, p. 143038, 2021.

UNESP. Instituto de Ciência e Tecnologia - Campus de Sorocaba. Unesp. **A atrazina e seu impacto em ambientes aquáticos**: pesquisa expõe impacto da atrazina e indica nanotecnologia como ferramenta para reduzi-lo. Disponível em: <<https://www.sorocaba.unesp.br/#!/noticia/1135/a-atrazina-e-seu-impacto-em-ambientes-aquaticos/>>. Acesso em: 26 jun. 2022.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. 5 ed. Washington: EPA, Oct. 2002. (EPA-821-R-02-012).