

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO  
DE ZINCO NO POTENCIAL DE FITORREMEDIÇÃO DE ÁGUA  
CONTAMINADA POR ATRAZINA**

Mestrando: Alex da Silva Cotrim

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Fernanda dos Santos Farnese

Coorientador: Prof. Dr. Althiéris de Souza Saraiva

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Menezes Silva

RIO VERDE - GO  
Março – 2023

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO  
DE ZINCO NO POTENCIAL DE FITORREMEDIÇÃO DE ÁGUA  
CONTAMINADA POR ATRAZINA**

Mestrando: Alex da Silva Cotrim

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Fernanda dos Santos Farnese

Coorientador: Prof. Dr. Althiéris de Souza Saraiva

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Menezes Silva

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de **MESTRE EM AGROQUÍMICA**, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração Agroquímica Ambiental.

RIO VERDE - GO

Março – 2023

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

C845a Cotrim, Alex da Silva  
Avaliação da influência de nanopartículas de óxido de zinco no potencial de fitorremediação de água contaminada por atrazina / Alex da Silva Cotrim; orientadora Fernanda dos Santos Farnese; co-orientador Althiéris de Souza Saraiva. -- Rio Verde, 2023.  
48 p.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-graduação em Agroquímica) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2023.

1. Conservação . 2. Ecotoxicologia. 3. Macrófitas. 4. Monitoramento ambiental. 5. Triazinas. I. Farnese, Fernanda dos Santos, orient. II. Saraiva, Althiéris de Souza , co-orient. III. Título.

# TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

## IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

Tese (doutorado)

Dissertação (mestrado)

Monografia (especialização)

TCC (graduação)

Artigo científico

Capítulo de livro

Livro

Trabalho apresentado em evento

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Matrícula:

Título do trabalho:

## RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial:      Não      Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano:      /      /

O documento está sujeito a registro de patente?      Sim      Não

O documento pode vir a ser publicado como livro?      Sim      Não

## DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Local      /      /  
Data

  
Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 46/2023 - SREPG/CMPR/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

**AValiaÇÃO DA INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO NO POTENCIAL DE FITORREMEDIAÇÃO DE ÁGUA CONTAMINADAS POR ATRAZINA**

Autor: Alex da Silva Cotrim  
Orientadora: Fernanda dos Santos Farnese

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica - Área de Concentração Agroquímica

APROVADA em 30 de março de 2023.

Prof. Dr. Juraci Alves de Oliveira  
Avaliador externo - Universidade  
Federal de Viçosa

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva  
Avaliador interno - IF Goiano /  
Campus Rio Verde

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda dos Santos Farnese  
Presidente da Banca - IF Goiano / Campus Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Fabiano Guimaraes Silva, DIRETOR(A) GERAL - CD0002 - CMPRV, em 22/05/2023 21:07:23.
- Juraci Alves de Oliveira, Juraci Alves de Oliveira - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal de Viçosa (25944455000196), em 16/05/2023 08:54:36.
- Fernanda dos Santos Farnese, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 10/05/2023 11:04:10.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 28/03/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 481603  
Código de Autenticação: 350171cd95



INSTITUTO FEDERAL GOIANO  
Campus Rio Verde  
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970  
(64) 3624-1000

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor, redenção e as suas inúmeras bênçãos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade de realização deste curso.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pela concessão da bolsa de estudos.

A professora Fernanda dos Santos Farnese, pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos, imprescindíveis para realização deste trabalho.

Aos professores Althiéris de Souza Saraiva e Paulo Eduardo Menezes Silva, pela coorientação, atenção, avaliação crítica e valiosas sugestões, sempre oportunas.

Aos demais professores do programa de Agroquímica, pelos ensinamentos, sugestões, críticas e apoio.

À minha família, especialmente minha mãe Joana Maria da Silva Cotrim, meu pai Gerson Pinheiro de Araújo Cotrim, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

A minha namorada, Lígia Emília, que me ensinou a crer em dias melhores. Sem teu amor e apoio neste curso não teria sobrevivido.

Agradecer imensamente a minha amiga Natyelle Souza, pela parceria e a convivência durante todo esse mestrado.

Agradeço a todos que abriram as portas de seus espaços e laboratórios para mim, como o Grupo de Conservação em Agroecossistema e Ecotoxicologia (Dr. Althiéris Saraiva, Aline Arantes), o Laboratório de Águas e Efluentes (Dra. Suzana Marcionílio) e ao meu Laboratório de Estudos Aplicados em Fisiologia Vegetal (Priscila, Leticia, Daiany, Lucas, Valdeir, Brenner, Kamila, Marina, Maria Lucia, Jeviny, Noemy, Igor, Viviane, Dra. Fernanda Farnese e Dr. Paulo Eduardo).

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Enfim, ao povo brasileiro que, através dos impostos, contribuiu para a concessão de minha bolsa de estudos. Espero honrá-los com esse título.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

ALEX DA SILVA COTRIM, filho de Gerson Pinheiro de Araújo Cotrim e Joana Maria da Silva Cotrim, nasceu em Itanhém, Estado da Bahia, em de julho de 1984. Possui mais 4 irmãos, Erivelton, Weskley, Ozilane e Alécio.

Em agosto de 2009, ingressou na Universidade Federal de Viçosa |UFV| - Campus Rio Paranaíba, no curso de bacharelado em Química, concluindo em março de 2014.

Atuou como professor de química pela Secretaria de Educação da Bahia, no Colégio Estadual Arraial D´ajuda, no período de agosto 2018 a março 2021.

Em março de 2021, iniciou no curso de Mestrado em Agroquímica, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, submetendo-se a defesa de dissertação em março de 2023.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS .....	08
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS .....	10
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	15
2.1 Específicos .....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1 Condições Experimentais – Experimentos I e II.....	17
3.2. EXPERIMENTO I.....	17
3.3. EXPERIMENTO II.....	18
3.3.1. Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos.....	18
3.3.2. Autofluorescência da clorofila e alterações anatômicas .....	19
3.3.3. Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	19
3.3.4. Extravasamento de eletrólitos.....	20
3.3.5. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes.....	20
3.3.6. Taxa de crescimento relativo e índice de tolerância.....	21
3.4. EXPERIMENTO III.....	21
3.4.1 Ensaio ecotoxicológico com <i>G. tigrina</i> .....	21
3.4.2 Atividade locomotora.....	22
3.4.3 Atividade de regeneração.....	22
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	23
4. RESULTADOS .....	24
4.1. EXPERIMENTO I.....	24
4.1.1. Toxicidade da atrazina.....	24
4.2. EXPERIMENTO II.....	24
4.2.1. Concentração de pigmentos fotossintéticos.....	24
4.2.2. Autofluorescência da clorofila <i>a</i> e avaliação anatômica.....	25
4.2.3 Avaliações fisiológicas.....	27
4.2.4 Danos às membrana celulares.....	30

4.2.5 Atividade de enzimas antioxidantes.....	31
4.2.6 Taxa de crescimento relativo e índice de tolerância.....	31
4.3. EXPERIMENTO III.....	32
4.3.1 Ecotoxicidade da água fitorremediada sobre <i>G. tigrina</i> .....	32
5. DISCUSSÃO .....	34
6. CONCLUSÃO .....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*) em *Pistia stratiotes* exposta a doses crescentes de atrazina, na ausência (*A*) ou na presença (*B*) de nanopartículas de óxido de zinco. A linha vertical vermelha indica os valores da concentração de herbicida que inibiu em 50% o processo fotossintético (IC<sub>50</sub>) das plantas.

**Figura 2:** Pigmentos fotossintéticos em plantas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina, isoladamente ou em combinação com nanopartículas de óxido de zinco. Foram avaliadas as concentrações de Clorofila a (*A*), Clorofila b (*B*), Carotenoides (*C*) e Clorofila totais (*D*).

**Figura 3:** Autofluorescência da clorofila (450-490nm). Cloroplastos do mesofilo (Parênquima paliádico e esponjoso) emitem fluorescência vermelha típica. Áreas sem a cor vermelha típica emitida pelos cloroplastos, representam degradação da clorofila em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO- - NP. Barras de escala: 200 µm.

**Figura 4.** Estrutura da lâmina foliar de *Pistia stratiotes* em secção transversal (microscopia de luz) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO - NP. Barras de escala: 200 µm.

**Figura 5.** Parâmetros de fluorescência da clorofila a em plantas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina, isoladamente ou em combinação com nanopartículas de óxido de zinco. Foram avaliados o Rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) (*A*), a razão  $F_0/F_m$  (*B*), o rendimento quântico do fotossistema II ( $\Phi_{FSII}$ ) (*C*), o quenching fotoquímico ( $qP$ ) (*D*) e o coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) (*E*).

**Figura 6:** Taxa de assimilação líquida de carbono (*A*) (*A*), Condutância estomática ( $g_s$ ) (*B*), Transpiração (*E*) (*C*), razão de concentração de CO<sub>2</sub> interno e externa  $C_i/C_a$  (*D*), eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ) (*E*), em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO – NP.

**Figura 7:** Respiração Noturna ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (*A*), Razão de  $A/R$  (*B*), em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO- NP.

**Figura 8:** Extravasamento de eletrólitos (%) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO - NP. de ZnO).

**Figura 9:** Atividade das enzimas antioxidantes Catalase (CAT) (A), Peroxidase (POX) (B), Superóxido Dismutase (SOD) (C), em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO - NP.

**Figura 10:** Taxa de crescimento relativo (A), Índice de tolerância (IT) (B), em plantas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO – NP.

**Figura 11:** Atividade locomotora de *G. tigrina*, contagem do número de linhas de grade cruzadas ao longo de 2 min de exposição aos tratamentos (A); Formação dos Quimiorreceptores (B); Formação de fotorreceptores (C).

**Tabela 1:** Dados da taxa de assimilação de carbono (A) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO – NP. CT (controle); CT + NP (nanopartículas de ZnO); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

**A** - Taxa fotossintética líquida  
**ANOVA** - Análise de Variância  
**APX** - Ascorbato peroxidase  
**ATP** - Energia  
**ATZ** - Atrazina  
**CAT** - Catalase  
 **$C_i$**  - Concentração de  $\text{CO}_2$   
**Cm** - Centímetro  
 **$\text{CO}_2$**  - Dióxido de carbono  
**CT** - Controle  
**DMS**- Diferença mínima significativa  
**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético  
**EROs** - Espécies Reativas de Oxigênio  
**ETR** - Taxa aparente de transporte de elétrons  
 **$F_0$**  - Fluorescência Mínima  
 **$F_{0'}$**  - Fluorescência Mínima após aclimatação à luz actínica  
 **$F_m$**  - Fluorescência Máxima  
 **$F_{m'}$**  - Fluorescência Máxima à luz  
 **$F_s$**  - Fluorescência transiente  
 **$F_v$**  - Fluorescência Variável  
 **$F_v/F_m$**  - Rendimento quântico potencial do fotossistema II  
**g** - Gramas  
 **$g_s$**  - Condutância estomática  
**h** - Horas  
 **$\text{H}_2\text{O}_2$**  - Peróxido de Hidrogênio  
**IT** - Índice de tolerância  
 **$\ln w_0$**  - Logaritmo neperiano de massa seca inicial  
 **$\ln w_1$**  - Logaritmo neperiano de massa seca final  
**M** - Metro  
 **$\text{M}^2$**  - Metro quadrado  
 **$\text{M}^2 \text{Kg}^{-1}$**  - Metro quadrado por quilograma  
**MDA** - Malondialdeído  
**Mg** - Miligrama  
 **$\text{mgL}^{-1}$**  - Miligrama por litro  
**mL** - Mililitro  
**mM** - Milímol  
**NBT** - Azul de p-nitro tetrazólio  
**nm** - Nanômetro  
 **$\text{NO}_3^-$**  - Nitrato  
**NPQ** - Quenching não fotoquímico  
 **$\text{O}^{2-}$** - Ânion superóxido

**p/v** - peso por volume  
**pH** - Potencial hidrogeniônico  
**PMSF** - Fluoreto de finilmetilsulfônico  
**POX** - Peroxidase  
**PVPP** - Polivinilpirrolidona  
**qN** - Quenching não fotoquímico  
**qP** - Quenching fotoquímico  
**R<sub>D</sub>** - Respiração diurna  
**R<sub>N</sub>** - Respiração noturna  
**R<sub>w</sub>** - Taxa de crescimento relativo (fórmula)  
**R<sub>w\*</sub>** - Taxa de crescimento da planta na solução de atrazina (fórmula)  
**SISVAR** - Sistema de Análises Estatísticas e Planejamento de Experimentos  
**SNK** - Student Newman Keuls  
**SOD** - Superóxido dismutase  
**t<sub>1</sub>-t<sub>0</sub>** - Duração do experimento (fórmula)  
**TBA** - Ácido 2 - tiobarbitúrico  
**TCA** - Ácido tricloroacético  
**TCR** - Taxa de Crescimento Relativo  
**ZnO-NP** – Nanopartículas de óxido de zinco  
**μg L<sup>-1</sup>** - microgramas por litro  
**μL** - Microlitro  
**μM** - Micromolar  
**μmol** - Micromol  
**ΦFSII** - Eficiência Fotoquímica Fotossistema II  
**ΦCO<sub>2</sub>** - Rendimento quântico de assimilação de

## RESUMO

Atrazina (Atz) é um herbicida amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas, atuando na proteína D1 do fotossistema II e inibindo a fotossíntese. A alta concentração de atrazina nos ecossistemas aquáticos, aliada à alta toxicidade, torna urgente o desenvolvimento de métodos eficazes para a remoção desse contaminante do meio ambiente. Embora a fitorremediação seja interessante para atingir esse objetivo, as plantas são sensíveis aos danos desencadeados por herbicidas à base de triazinas, sendo necessário metodologias alternativas para minimizar esse efeito. Uma tecnologia importante para limitar os danos causados por poluentes nas plantas é o uso de nanopartículas de óxido de zinco (NP-ZnO). O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de fitorremediação de atrazina - associado a nanopartículas de óxido de zinco - pela espécie aquática de *Pistia stratiotes*. Para isso, espécimes de *P. stratiotes* foram expostos aos seguintes tratamentos: controle, atrazina (0,025 mg/L), óxido de zinco (10 mg/L) e atrazina + óxido de zinco com seis repetições. As plantas permaneceram nessas condições por 15 dias, sendo então avaliados a fisiologia, crescimento e danos celulares. A água fitorremediada pelas plantas foi coletada ao fim dos 15 dias e utilizada para avaliar a velocidade locomotora (pLMV) do invertebrado de água doce tropical *Girardia tigrina*, que tem sido apontado como potencial bioindicador em sistemas de água doce. A aplicação do herbicida diminuiu consideravelmente a taxa fotossintética, a eficiência de carboxilação da Rubisco, o rendimento quântico efetivo do fotossistema II e quenching fotoquímico. A aplicação das nanopartículas, no entanto, conseguiu restaurar esses parâmetros a níveis similares ao controle. Para a condutância estomática não foi observada diferença estatística e para a taxa transpiratória a aplicação de ZnO-NP foi maior do que a Atz. É provável que as ZnO-NP tenham efeito protetor contra os danos causados pelo herbicida. O zinco (Zn) está associado a diversas funções biológicas importantes, como o metabolismo de carboidratos, a integridade da membrana, as proteínas envolvidas na replicação do DNA e a expressão de genes, além de desempenhar função estrutural e catalítica em enzimas como superóxido dismutase, álcool desidrogenase e anidrase carbônica, que previnem danos foto-oxidativos. Assim, os resultados apontam que a adição de ZnO-NP melhoram os efeitos tóxicos da Atz na *Pistia stratiotes*, porém mais estudos futuros são necessários para entender o modo de ação dessas nanopartículas sob plantas a esse poluente. Os resultados dos ensaios dos teste de locomoção em planárias evidenciaram que os organismos tiveram maior sensibilidade no tratamento com atrazina sem a fitorremediação inibindo sua locomoção. Esses resultados irão contribuir para o aprimoramento do processo de fitorremediação e para a reutilização de águas contaminadas na agricultura, e os potenciais impactos para ecossistemas adjacentes, a exemplo de sistemas de água doce, contribuindo para o desenvolvimento rural sustentável e a conservação ambiental.

**Palavras-chave:** Triazinas, Ecotoxicologia, Macrófitas, Monitoramento ambiental, Conservação.

## ABSTRACT

Atrazine (Atz) is a widely used herbicide for weed control, acting on the photosystem II D1 protein and inhibiting photosynthesis. The high atrazine concentration in aquatic ecosystems, combined with its high toxicity, makes it urgent to develop effective methods for removing this contaminant from the environment. Although phytoremediation is interesting to achieve this goal, plants are sensitive to damage triggered by triazine-based herbicides, requiring alternative methodologies to minimize this effect. An important technology to limit the damage caused by pollutants in plants is the use of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NP). The objective of this study was to evaluate the atrazine phytoremediation capacity - associated with zinc oxide nanoparticles - by the aquatic species *Pistia stratiotes*. For this, specimens of *P. stratiotes* were exposed to the following treatments: control, atrazine (0.025 mg/L), zinc oxide (10 mg/L) and atrazine + zinc oxide with six repetitions. The plants remained under these conditions for 15 days, then it was evaluated the physiology, growth and cellular damage. The water phytoremediated by the plants was collected at the end of 15 days and used to evaluate the locomotor speed (pLMV) of the tropical freshwater invertebrate *Girardia tigrina*, which has been pointed out as a potential bioindicator in freshwater systems. The herbicide application considerably decreased the photosynthetic rate, Rubisco carboxylation efficiency, effective quantum yield of photosystem II and photochemical quenching. The nanoparticles application, however, was able to restore these parameters to levels similar to control. For stomatal conductance no statistical difference was observed and for transpiration rate ZnO-NP application was higher than Atz. It is likely that ZnO-NP have a protective effect against the damage caused by the herbicide. Zinc (Zn) is associated with several important biological functions, such as carbohydrate metabolism, membrane integrity, proteins involved in DNA replication and gene expression, in addition to playing a structural and catalytic role in enzymes such as superoxide dismutase, alcohol dehydrogenase and carbonic anhydrase, which prevent photo-oxidative damage. Thus, the results indicate that the ZnO-NP addition improves the toxic effects of Atz on *Pistia stratiotes*, but more future studies are needed to understand the action mode of these nanoparticles on plants to this pollutant. The results of the planarian locomotion tests showed that the organisms were more sensitive in the treatment with atrazine without phytoremediation inhibiting their locomotion. These results will contribute to the improvement of the phytoremediation process and to the contaminated water reuse in agriculture, and the potential impacts for adjacent ecosystems, such as freshwater systems, contributing to sustainable rural development and environmental conservation.

**Keywords:** Triazines, Ecotoxicology, Macrophytes, Environmental monitoring, Conservation.

# 1. INTRODUÇÃO

Na última década, os agrotóxicos foram amplamente utilizados para controlar pragas, incluindo insetos, ervas daninhas, roedores ou organismos indesejáveis na agricultura (Aktar *et al.*, 2009; Alavanja *et al.*, 2013; Furlan e Kreutzweiser, 2015). Estes compostos são substâncias tóxicas, naturais ou sintéticas, utilizadas na prevenção, destruição, repulsão ou mitigação de doenças e pragas que prejudicam, atacam ou transmitem doenças (Londres, 2011; Machado e Martins, 2018). No entanto, as moléculas que compõem o princípio ativo dos agrotóxicos são persistentes no ambiente e podem se mover para longe do local de aplicação, sendo os ecossistemas aquáticos um dos mais relevantes receptores de herbicidas, metais pesados e outros xenobióticos (Bogoni *et al.*, 2014). Uma vez que atinja os corpos hídricos, os agrotóxicos podem ser transportados rapidamente por difusão nas correntes de água ou podem ser incorporados por organismos aquáticos, comprometendo a conservação da biodiversidade, além de causar sérios efeitos à saúde humana (Contreras *et al.*, 2020).

Dentre os agrotóxicos amplamente utilizados na agricultura, o herbicida atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) merece destaque por sua ampla utilização e frequente contaminação de recursos hídricos (Giannini-Kurina *et al.*, 2022). De fato, embora esse herbicida tenha sido banido da Europa (Sass e Colangelo, 2006), ele ainda é utilizado nos Estados Unidos (Ryberg *et al.*, 2020) e na América do Sul (Giannini-Kurina *et al.*, 2022). No Brasil, a atrazina (Atz) é um dos três pesticidas mais comercializados e 72% dos estados brasileiros tem de médio a alto risco ambiental por causa da contaminação com atrazina (Brovini *et al.*, 2021). Em um estudo realizado em 2018, no qual se analisou mais de 35.000 amostras de água potável em todo o Brasil, observou-se a presença de atrazina em 84% das amostras, com concentrações frequentemente acima do limite permitido pela legislação brasileira (Sisagua, 2018).

A alta concentração de atrazina nos ecossistemas aquáticos, aliada à alta toxicidade, demanda o desenvolvimento de métodos eficazes para a remoção desse contaminante do meio ambiente. Nesse contexto, a fitorremediação, técnica que utiliza plantas para conter, remover ou transformar compostos tóxicos presentes no meio ambiente, surge como alternativa promissora para a descontaminação de recursos hídricos. A fitorremediação é uma técnica vantajosa, de fácil manejo, baixo custo e com baixíssimo impacto ambiental (Martins *et al.*, 2008). Dentre espécies promissoras para a fitorremediação, destaca-se aqui as macrófitas aquáticas, como a *Pistia stratiotes*, que

apresenta características interessantes para o processo de remediação ambiental, como fácil cultivo, alta taxa de crescimento e capacidade de absorver e acumular altas concentrações de poluentes (Ribeiro *et al.*, 2018; Barchanska *et al.*, 2019; Vieira *et al.*, 2021).

Uma das principais limitações do processo de fitorremediação de ambientes contaminados com atrazina é a alta sensibilidade das plantas a este poluente. Com efeito, embora já tenha sido demonstrado que *P. stratiotes* é capaz de absorver e acumular altas concentrações de atrazina, esse herbicida impacta fortemente a fisiologia vegetal, como demonstrado por Vieira *et al.* (2021). Dessa forma, são necessárias metodologias alternativas para aumentar a tolerância das plantas ao poluente, que possibilitaria a manutenção dos processos de absorção e a sobrevivência vegetal, maximizando a fitorremediação. O zinco é um elemento mineral crucial para o crescimento e desenvolvimento plantas, que participa da resposta celular a contaminantes (Hassan *et al.*, 2022) e, embora ainda existam poucos estudos sobre o assunto, a associação do zinco com a nanotecnologia tem potencial para maximizar os efeitos do nutriente. Nanopartículas são materiais com pelo menos uma dimensão e tamanho menor que 100 nm e sua utilização tem transformado a agricultura, pois permitem liberação controlada do nutriente ao longo do tempo, rápida absorção pelas plantas e menor risco de contaminação ambiental (Adil *et al.*, 2022). Apesar disso, no entanto, os estudos existentes até o momento têm explorado apenas a capacidade das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) em adsorver compostos tóxicos (Ahktar *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2021), de forma que ainda não se conhece o potencial dessas moléculas para alterar o metabolismo de plantas expostas ao atrazina.

O principal objetivo da fitorremediação é permitir o retorno dos recursos hídricos para os ecossistemas uma vez finalizado o processo de descontaminação. A água é um recurso finito e primordial, de forma que processos que permitam a sua reutilização são fundamentais. Apesar disso, a maioria dos estudos de fitorremediação apenas enfoca a capacidade da planta em acumular poluentes sem, contudo, avaliar a redução na toxicidade da água após o processo de descontaminação (Barchanska *et al.*, 2019; Escoto *et al.*, 2019; De Vasconcelos *et al.*, 2021). Isso é particularmente relevante quando se considera que mesmo a concentração de atrazina permitida na água pela legislação de diversos países, como o Brasil e os EUA, causa efeitos letais em organismos aquáticos (Albuquerque *et al.*, 2021), de forma que, apenas quantificar a quantidade de herbicida remanescente na água pode não ser suficiente para garantir que o retorno ao ecossistema

não acarreta riscos para a biodiversidade. Uma importante forma de avaliar a toxicidade da água, após a fitorremediação, consiste na realização de ensaios ecotoxicológicos, avaliando o efeito da água fitorremediada sobre organismos chave, como é o caso das planárias.

Planárias (*Girardia tigrina* (Girard, 1850)) são invertebrados representativos em ambientes aquáticos que possuem importantes características para serem utilizadas como bioindicadores da qualidade da água, pelo fato de compartilharem um sistema nervoso semelhante ao de mamíferos e serem tanto presa quanto predador, influenciando sobremaneira a cadeia trófica aquática (López *et al.*, 2021). Além disso, existem outras razões para que as planárias sejam adotadas como bioindicadores de amostras ambientais, por apresentarem fácil cultivo, baixo custo e permitirem avaliação rápida e integrativa de amostras de água (López *et al.*, 2021; Benitz *et al.*, 2022), além de apresentar sensibilidade a baixas concentrações de toxinas, como os herbicidas (Nano *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2015).

Tendo como base esses fatos e considerando o grande potencial de *P. stratiotes* para utilização em programas de fitorremediação, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de fitorremediação de água contaminada com atrazina por *P. stratiotes* e o potencial de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NP) na tolerância das plantas a esse poluente. Além disso, o estudo buscou avaliar a eficácia do processo de fitorremediação, caracterizando o efeito da água fitorremediada sobre organismos-teste (planária).

## **2. OBJETIVOS**

Avaliar a capacidade de fitorremediação de água contaminada com atrazina por *P. stratiotes*, bem como o potencial de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NP) para atenuar os danos desencadeados pelo herbicida.

### **2.1 Objetivos específicos:**

- Caracterizar o impacto das ZnO-NP na concentração de atrazina capaz de inibir em 50% o processo fotossintético de *P. stratiotes* L. (IC<sub>50</sub>);
- Verificar o efeito de nanopartículas de óxido de zinco sobre a fisiologia de *P. stratiotes* exposta ao atrazina;

- Determinar a eficácia do tratamento da água com *P. stratiotes* para a redução da toxicidade deste recurso, na presença e na ausência de ZnO-NP, utilizando planárias como potenciais bioindicadores.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Condições Experimentais – Experimentos I e II

Os experimentos I e II, descritos a seguir, foram realizados em casa de vegetação semiclimatizada do Laboratório de Cultura de Tecidos e Fisiologia Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde. Para realização do experimento, espécimes de *Pistia stratiotes* foram coletadas em um lago artificial (Parque Interlagos Rio Verde), no município de Rio Verde, Goiás, Brasil (50° 57' 5.53'' S de latitude; 17° 47' 10.41'' O de longitude) e esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% durante 1 min. As plantas foram então lavadas em água corrente e água destilada. Após esse processo, as plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Clark (1975), ½ da força iônica, pH 6,5 e mantidas em casa de vegetação por seis meses. Durante esse período, as plantas reproduziram-se, e apenas as plantas obtidas por reprodução e nunca submetidas a poluentes foram utilizadas nos experimentos. Para os experimentos I e II, foram selecionadas plantas jovens que foram uniformizadas pela idade e pelo tamanho.

#### 3.2. EXPERIMENTO I

O experimento I foi montado visando identificar qual a influência das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NP) sobre a concentração de atrazina capaz de inibir em 50% (IC<sub>50</sub>) o processo fotossintético de *P. stratiotes*. Após a aclimação, as plantas foram submetidas as seguintes doses de atrazina, com quatro repetições para cada dose: 0,0 (controle); 0,01; 0,025; 0,1 e 0,2 mg L<sup>-1</sup>. Parte das plantas foram submetidas a essas doses em conjunto com ZnO-NP, na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. A concentração ideal de ZnO-NP foi definida previamente, com base em teste de doses (Tabela 1, Material suplementar). As plantas permaneceram nessas condições por quinze dias. Após esse período, a taxa de assimilação líquida de carbono (*A*) foi determinada com o auxílio de um analisador de gases a infravermelho, equipado com fonte de luz azul/vermelho (modelo LI-6800-02B, LI-COR).

### 3.3. EXPERIMENTO II

A fim de aprofundar nas respostas fisiológicas de *P. stratiotes* ao herbicida à base de Atz e às nanopartículas de óxido de zinco, um segundo experimento foi elaborado, no qual as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos, com seis repetições cada: T1 – apenas solução nutritiva (controle); T2 – solução nutritiva + nanopartículas liberadoras de óxido de zinco (NP); T3 – solução nutritiva + Herbicida atrazina (Atz); T4 – Atz + nanopartículas de óxido de zinco (Atz+NP). Nos tratamentos com Atz, as plantas foram expostas a doses de atrazina (Nor-tox 500 SC®, Araponga, PR, Brasil) de 200 g i. a.  $\text{ha}^{-1}$ , que corresponde a aproximadamente 80% da dose comercial recomendada para a cultura do milho. As plantas permaneceram nestas condições por 15 dias. Um recipiente contendo apenas a solução com atrazina, sem plantas, também foi mantido em casa de vegetação, nas mesmas condições e por igual período. Após esse período, foram realizadas análises fisiológicas e bioquímicas nas plantas de *P. stratiotes* expostas a cada um dos tratamentos. Também ocorreu a coleta de solução nutritiva em cada um dos tratamentos, incluindo o recipiente com solução nutritiva e atrazina (mas sem plantas) para a realização de ensaio ecotoxicológico com *Girardia tigrina* (descrito em detalhes no experimento III).

#### 3.3.1. Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos

O teor de pigmentos cloroplastídicos foi determinado por meio da extração com dimetilsulfóxido (DMSO), saturado com carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Aproximadamente 5 discos foliares com diâmetro de 5 mm foram acondicionados em frascos vedados e envolvidos com papel alumínio, contendo 5 mL da solução de DMSO, por um período de 24 horas a 65°C em banho-maria. Posteriormente, a leitura da absorbância realizada nos comprimentos de onda 480, 649.1 e 665.1 nm. Após o período de incubação na temperatura estabelecida, as amostras foram lidas em espectrofotômetro nas absorbâncias de 665 nm para a determinação o teor de clorofila a, 649 nm para clorofila b, 480 nm para valores de carotenoides. A clorofila total foi obtida pela soma das clorofilas a e b. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de duplo feixe (Modelo Hitachi U- 2000 Japão), utilizando cubeta de quartzo. Os teores de clorofila a, b, total, teores de carotenoides foram calculados com base nas equações:

$$\text{Clorofila } a = (12,47 \times A_{665} - (3,62 \times A_{649}));$$

$$\text{Clorofila } b = (25,06 \times A_{649} - (6,5 \times A_{665}));$$

$$\text{Clorofila total} = \text{clorofila } a + \text{clorofila } b;$$

Carotenoides =  $(1000 \times A_{480} - (1,29 \times \text{clorofila } a - (53,78 \times \text{clorofila } b)) / 220$ .

Os resultados foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  MF.

### 3.3.2. Autofluorescência da clorofila e alterações anatômicas

Os estudos de microscopia de fluorescência foram realizados 15 dias após início da exposição aos tratamentos, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, Brasil. As imagens foram obtidas com um microscópio Olympus BX61 ICAL, através da excitação azul (450-490nm), em cortes frescos de folhas, efetuadas com um micrótomo de mesa e imediatamente fotografadas para evitar a degradação da clorofila.

### 3.3.3. Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

A taxa de assimilação líquida do carbono ( $A$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ), a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e a taxa transpiratória ( $E$ ) foram determinadas em sistema aberto, sob luz saturante ( $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e pressão parcial de  $\text{CO}_2$  de 40 Pa. Para tanto, foi utilizado um analisador de gases a infravermelho (LI-6800, Li-Cor Inc., Nebraska, EUA), equipado com uma fonte de luz azul/vermelho (modelo LI-6800-02B, LI-COR). Com o mesmo analisador a respiração noturna ( $R_N$ ), ou taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  noturna, foi avaliada antes do amanhecer. Calculou-se a razão entre a taxa fotossintética e a respiração noturna ( $A/R_N$ ).

Na antemãhã, foi obtida a fluorescência mínima ( $F_0$ ) via excitação dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade ( $0,03 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A fluorescência m\u00e1xima ( $F_m$ ) foi obtida pela aplica\u00e7\u00e3o de um pulso de 0,8 s de luz act\u00ednica saturante ( $8000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel ( $F_v$ ) foi determinada pela diferen\u00e7a entre  $F_0$  e  $F_m$  e o rendimento qu\u00e2ntico potencial do fotossistema II foi calculado a partir desses valores. Para obter a fluoresc\u00eancia transiente ( $F_s$ ), as folhas foram aclimatadas \u00e0 luz act\u00ednica ( $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante 60 s, seguido por um pulso de luz saturante para estimar a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima \u00e0 luz ( $F_m'$ ), e por \u00faltimo, um pulso de luz vermelho-distante foi aplicado para obter a fluoresc\u00eancia m\u00ednima ap\u00f3s aclima\u00e7\u00e3o \u00e0 luz act\u00ednica ( $F_0'$ ). Com esses par\u00e2metros, foram calculados os coeficientes de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica ( $qP$ ), a efici\u00eancia fotoqu\u00edmica do transporte de el\u00e9trons associada ao fotossistema II ( $\phi F_{SII}$ ) e a efici\u00eancia de captura de energia de excita\u00e7\u00e3o pelos centros de rea\u00e7\u00e3o abertos ( $F_v'/F_m'$ ), conforme (Maxwell e Johnson, 2000).

### 3.3.4. Extravasamento de eletrólitos

Para avaliar a estabilidade das membranas celulares, cinco discos foliares foram retirados de cada planta, os quais foram lavados previamente (2 vezes) em água deionizada. A seguir, os discos foram colocados para flutuar em frascos contendo 30 ml de água deionizada. As amostras foram incubadas por 24h, na temperatura ambiente, e a condutividade foi avaliada. A seguir esses frascos foram colocados na estufa a 90°C, e permaneceram por 1h, e após, a leitura foi feita novamente. A condutividade foi expressa em porcentagem da condutividade total (frascos a 90°C) (Whitlow *et al.*, 1992).

### 3.3.5. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Para determinar a atividade enzimática, amostras foliares de aproximadamente 0,3 g foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas nos seguintes meios de extração:

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% para dismutases do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) e catalases (CAT, EC 1.11.1.6) (Peixoto *et al.*, 1999); os homogenatos foram centrifugados a 12.000 x g por 15min, a 4°C, para as enzimas SOD, POX, CAT. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto e as atividades enzimáticas foram determinadas pela adição do extrato aos seguintes meios de reação:
- Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitrotetrazólio (NBT) 75  $\mu$  m, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2  $\mu$  m, para SOD (Giannopolitis e Ries, 1977);
- Tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM, para POX (Peixoto *et al.*, 1999);
- Tampão fosfato de potássio 50 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM, para CAT (Peixoto *et al.*, 1999); Para determinação da atividade da SOD, as amostras foram iluminadas por 5 min e a absorvância foi, então, medida a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% a fotoredução do NBT (Giannopolitis e Ries, 1977). As atividades das enzimas POX e CAT foram estimadas pela leitura da absorvância durante o primeiro minuto de reação. Os seguintes coeficientes de extinção molar foram utilizados: POX (420 nm,  $\epsilon$  : 2,47 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) e CAT (240 nm,  $\epsilon$  : 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (Peixoto *et al.*, 1999).

### 3.3.6. Taxa de crescimento relativo e índice de tolerância ao herbicida

A taxa de crescimento relativo (TCR) foi calculada usando a equação proposta por Hunt (1978), usando o peso fresco e seco das plantas:

$$TCR = (\ln w_1 - \ln w_0) \times 1000 / (t_1 - t_0) ;$$

Sendo que TCR representa a taxa de crescimento relativo;  $\ln w_1$  e  $\ln w_0$  representam o logaritmo neperiano da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente; e  $t_1 - t_0$  representam a duração do experimento, em dias.

A tolerância ao Atz foi estimada pelo cálculo do índice de tolerância (IT) (%), segundo proposto por Wilkins (1978):

$$TI (\%) = (TCR^*/TCR) \times 100;$$

em que TCR\* é a taxa de crescimento da planta na solução com Atz (sozinho ou em conjunto com as nanopartículas) e TCR é a taxa de crescimento da planta na solução controle.

## 3.4. EXPERIMENTO III

### 3.4.1 Ensaio ecotoxicológico com *G. tigrina*.

Para avaliar a qualidade da água que passou por fitorremediação, planárias (*G. tigrina*) foram utilizadas como organismos teste. Para isso, foram utilizadas as soluções que permaneceram com plantas para fitorremediação por 15 dias, de acordo com o descrito no item 3.1.2. Como controle negativo (ATZ CT), também foi analisada uma solução contendo a mesma concentração inicial de atrazina e que permaneceu na mesma condição da casa de vegetação por 15 dias, mas que não foi tratada com plantas para a fitorremediação. Foram utilizadas planárias de culturas já estabelecidas no Laboratório de Águas e Efluentes na sala de Bioensaios do Grupo de Conservação em Agroecossistemas e Ecotoxicologia (CAE), no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde. As planárias foram cultivadas em meio de cultura ASTM - American Society for Testing and Materials, alimentadas uma vez por semana com fígado bovino (*ad libitum*), com troca do meio de cultura nos moldes do protocolo ASTM (ASTM, 1980), temperatura constante de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ .

A toxicidade subletal das soluções contendo atrazina que passou ou não pela fitorremediação, foi avaliada por meio de testes conduzidos em recipientes de Poli Tereftalato de Etila (PET), contendo 20 mL de solução experimental. Cada tratamento consistiu em três réplicas, e quatro planárias por réplica. Para o teste de locomoção

(*p*LMV – Planarian Locomotor Velocity), foram utilizadas planárias de  $1,0 \pm 0,2$  cm de comprimento total. As planárias foram submetidas às soluções obtidas segundo descrito no item 3.1.2, após 15 dias de tratamento com *P. stratiotes*. Dessa forma, as planárias foram expostas a cinco condições diferentes, sendo: *CT*: Apenas solução nutritiva; *CT + NP*: Solução nutritiva, cujas plantas foram tratadas com nanopartículas de óxido de zinco; *ATZ*: Solução nutritiva contendo atrazina, que foi fitorremediada por *P. stratiotes*; *ATZ + NP*: Solução nutritiva contendo atrazina, que foi fitorremediada por *P. stratiotes* tratada com nanopartículas de óxido de zinco. Como controle negativo, as planárias também foram submetidas à solução (*ATZ CT*) contendo atrazina mas que não passaram por fitorremediação. Ressalta-se que, para os ensaios crônicos de locomoção e regeneração, houve também tratamento controle ASTM apenas (meio em que planárias são cultivadas), com vistas a validação de não toxicidade da solução nutritiva. Os testes foram conduzidos a temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob condições escuras e as soluções foram renovadas a cada três dias. As planárias foram privadas de alimento por um período de sete dias, anteriores a implantação do ensaio. Após os sete dias de exposição aos tratamentos foram avaliadas a *p*LMV e a capacidade regenerativa, conforme descrito abaixo.

### 3.4.2 Atividade locomotora

Após sete dias de exposição aos tratamentos, conforme descrito anteriormente, as três repetições contendo quatro planárias cada, perfazendo o total de 12 planárias por tratamento, foram alocadas individualmente (um organismo por réplica) em placas de Petri ( $\varnothing = 7,5$  cm) contendo 100 ml de solução experimental para determinação da *p*LMV (Planarian Locomotor Velocity). A avaliação da *p*LMV foi feita utilizando papel milimetrado (0,5 cm de espaçamento entre as linhas de grade), em recipiente circular, com diâmetro e quantidade de meio cultura (ASTM) ou solução experimental suficiente que permitisse o livre deslocamento da planária. Após alocação e adaptação (1 min), os organismos expostos foram observados em 2 minutos para calcular o deslocamento das planárias em centímetros (Saraiva *et al.*, 2018).

### 3.4.3 Atividade de regeneração

Ensaio de regeneração foi feito de acordo com Pearl *et al.* (2016) com algumas adaptações. Assim, após 8 dias de exposição as respectivas soluções experimentais, 12 planárias por cada tratamento (totalizando 60), foram decapitadas com um único corte atrás das aurículas com lâmina de bisturi previamente esterilizadas. Após a decapitação,

as planárias foram transferidas, individualmente, para placas de Petri com 20 mL de meio ASTM e solução experimental. As formações de Quimiorreceptores e fotorreceptores foram avaliadas em dias, até a completa formação, ao passo que anormalidades foram observadas, com auxílio de um microscópio estereoscópio.

### 3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso. O cálculo de  $IC_{50}$  e o ajuste da curva foram realizados utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os dados fisiológicos de *P. stratiotes*, obtidos no experimento II, foram avaliados quanto à homogeneidade de variâncias usando o testes de Bartlett e quanto a normalidade, através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, os dados foram submetidos à ANOVA e as médias calculadas pelo teste SNK (Student Newman Keuls), a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares estatísticos R (R Core Team, 2014).

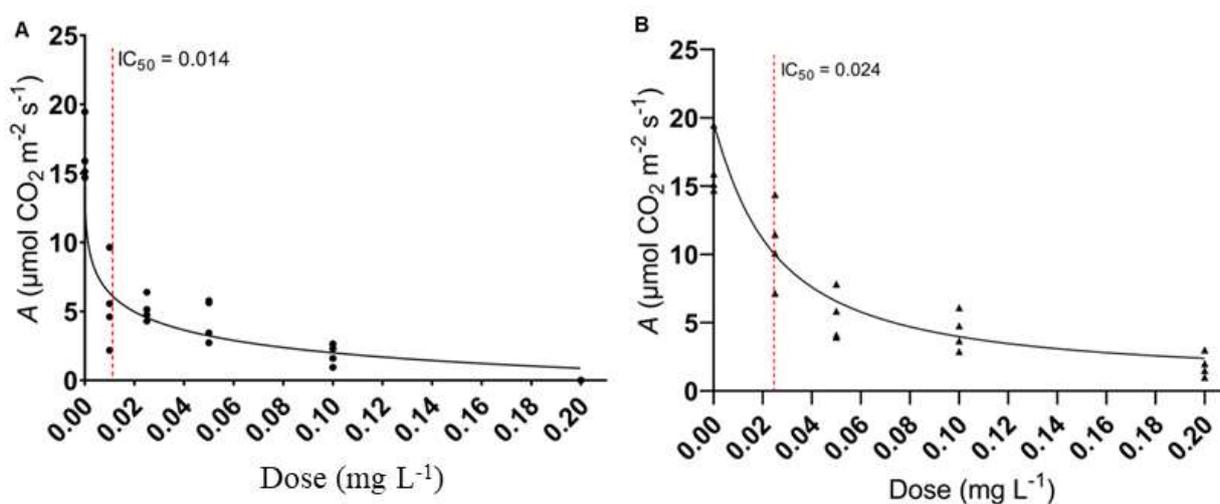
Para ensaios ecotoxicológicos com planárias *G. tigrina*, utilizou-se o software GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os dados de locomoção foram avaliados quanto à homogeneidade de variâncias usando o testes de Bartlett e quanto a normalidade, através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Após, realizou-se a análise de variância (ANOVA), e as médias calculadas pelo teste SNK (Student Newman Keuls), a 5% de probabilidade. Dados de Regeneração de Quimiorreceptores e Fotorreceptores não atenderam aos pressupostos da ANOVA, pelo que se adotou estatística não paramétrica usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Dunn's.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EXPERIMENTO I

#### 4.1.1. Toxicidade da atrazina

A toxicidade da atrazina foi avaliada a partir dos valores  $IC_{50}$ , calculada utilizando a taxa fotossintética ( $A$ ) das plantas expostas a diferentes concentrações do herbicida. Para as plantas expostas ao atrazina isoladamente,  $IC_{50}$  foi de  $0,014 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 1A). A adição de ZnO-NP reduziu fortemente a toxicidade do herbicida sobre o processo fotossintética, aumentando o valor de  $IC_{50}$  para  $0,024 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 1B).



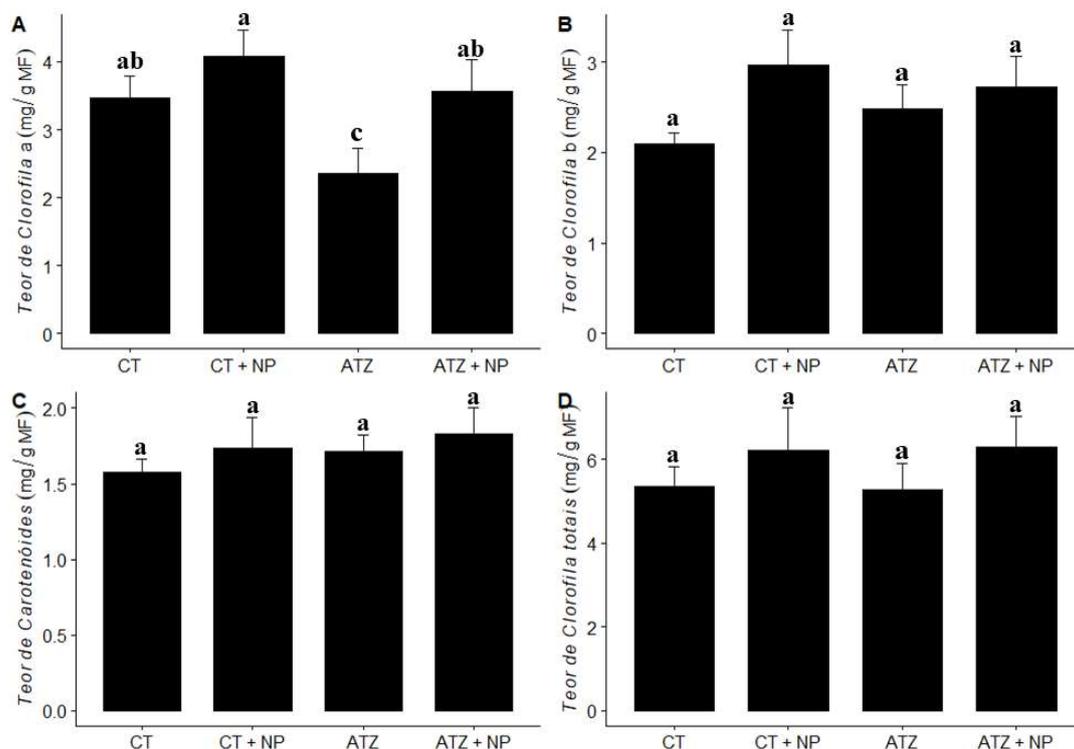
**Figura 1.** Assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) em *Pistia stratiotes* exposta a doses crescentes de atrazina, na ausência (A) ou na presença (B) de nanopartículas de óxido de zinco. A linha vertical vermelha indica os valores da concentração de herbicida que inibiu em 50% o processo fotossintético ( $IC_{50}$ ) das plantas.

### 4.2. EXPERIMENTO II

#### 4.2.1. Concentração de pigmentos fotossintéticos

A influência da atrazina e das ZnO-NP sobre os pigmentos fotossintéticos em plantas expostas ao atrazina é mostrada na Fig. 2. Apenas a concentração de clorofila  $a$  alterou após a exposição aos tratamentos, diminuindo nas plantas expostas ao herbicida (Fig. 2A). No tratamento ATZ+NP, no entanto, não houve diferença neste parâmetro em relação ao controle (CT). Os demais pigmentos, incluindo clorofila  $b$ , carotenoides e

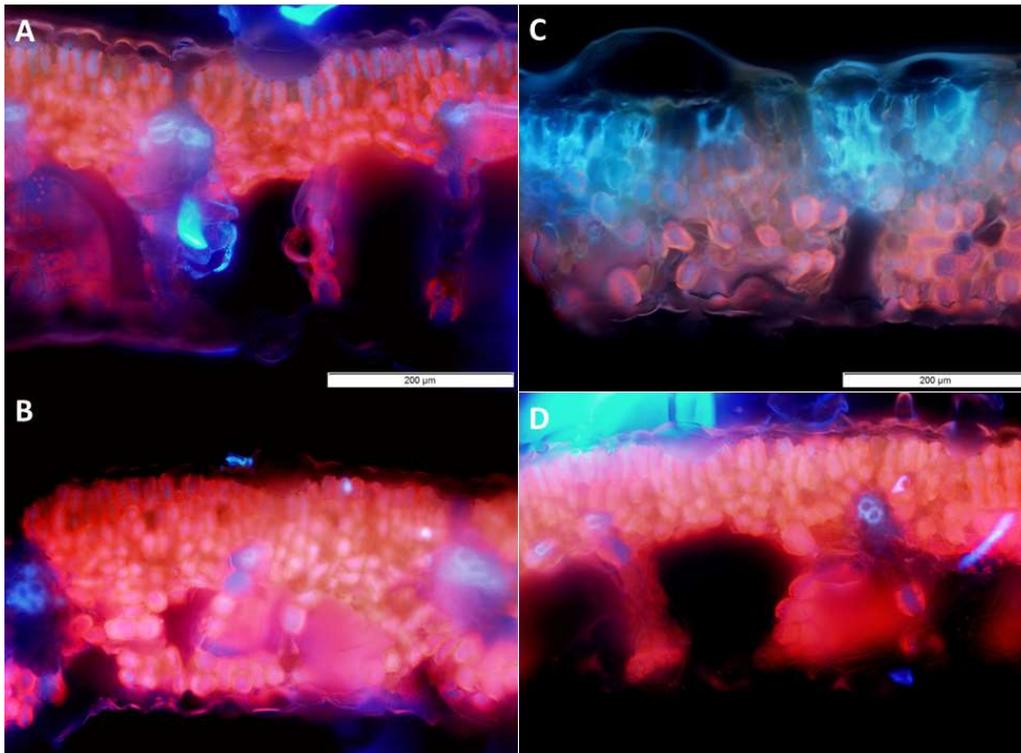
clorofila totais não apresentaram alterações dentre os tratamentos, permanecendo estatisticamente iguais ao controle (Fig. 2B - D).



**Figura 2:** Pigmentos fotossintéticos em plantas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina, isoladamente ou em combinação com nanopartículas de óxido de zinco. Foram avaliadas as concentrações de Clorofila a (A), Clorofila b (B), Carotenoides (C) e Clorofila totais (D). As plantas foram expostas aos seguintes tratamentos:CT (controle); CT + NP (nanopartículas de ZnO); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2. Autofluorescência da clorofila a e avaliação anatômica

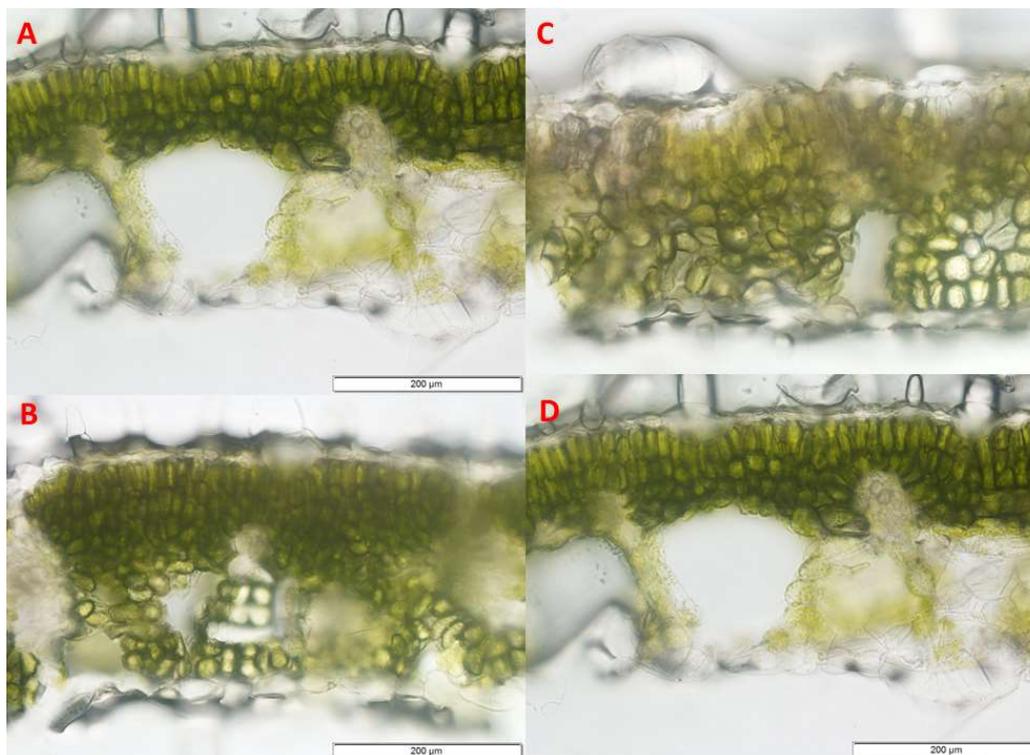
Os dados obtidos para a concentração de clorofilas foram confirmados pela análise de autofluorescência da clorofila a, como pode ser observado na Fig. 3. Nas plantas controle é possível observar emissão de luz vermelha no parênquima clorofiliano (Fig. 3A e B), o que é típico de plantas saudáveis e indica emissão de fluorescência pela clorofila. Nas plantas expostas ao atrazina, no entanto, a baixa emissão de luz vermelha é forte indicador de degradação da clorofila a, enquanto a coloração azul aponta para o acúmulo de compostos fenólicos no parênquima clorofiliano (Fig. 3C). A adição das ZnO-NP foi eficaz na manutenção da emissão de fluorescência pela clorofila (Fig. 3D).



**Figura 3:** Autofluorescência da clorofila (450-490nm). Cloroplastos do mesofilo (Parênquima paliçádico e esponjoso) emitem fluorescência vermelha típica. Áreas sem a cor vermelha, típica emitida pelos cloroplastos, representam degradação da clorofila em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de Zn- NP. CT (controle) (A); CT + NP (nanopartículas de ZnO) (B); ATZ (herbicida atrazina) (C); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO) (D). Barras de escala: 200  $\mu\text{m}$ .

Com a realização dos cortes anatômicos também foi possível observar que o herbicida promoveu alteração na morfologia do parênquima clorofiliano (Fig. 4). As plantas no controle e no tratamento Atz + NP apresentaram parênquima paliçádico organizado, com parênquima lacunoso visível e definido (Fig. 4A - B e D), enquanto nas

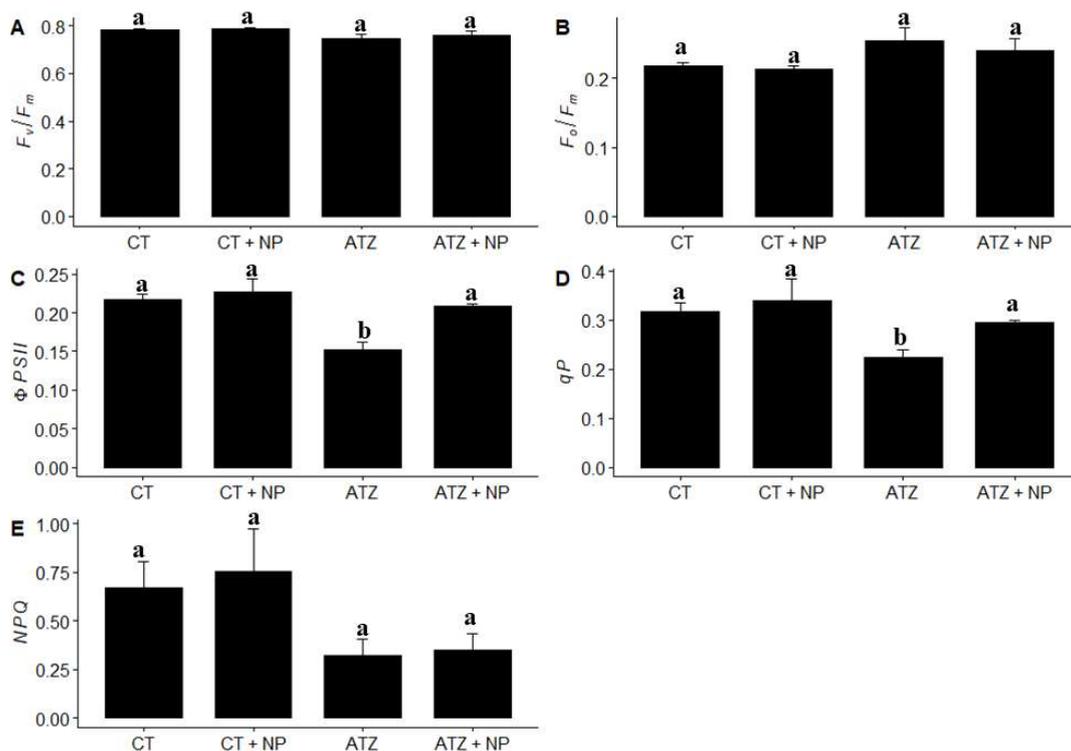
plantas submetidas apenas ao herbicida houve desorganização do parênquima clorofiliano, com células com paredes anticlinais sinuosas (Fig. 4C).



**Figura 4.** Estrutura da lâmina foliar de *Pistia stratiotes* em secção transversal (microscopia de luz) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de Zn - NP. CT (controle) (A); CT + NP (nanopartículas de ZnO) (B); ATZ (herbicida atrazina) (C); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO) (D); Barras de escala: 200 µm.

#### 4.2.3 Avaliações fisiológicas

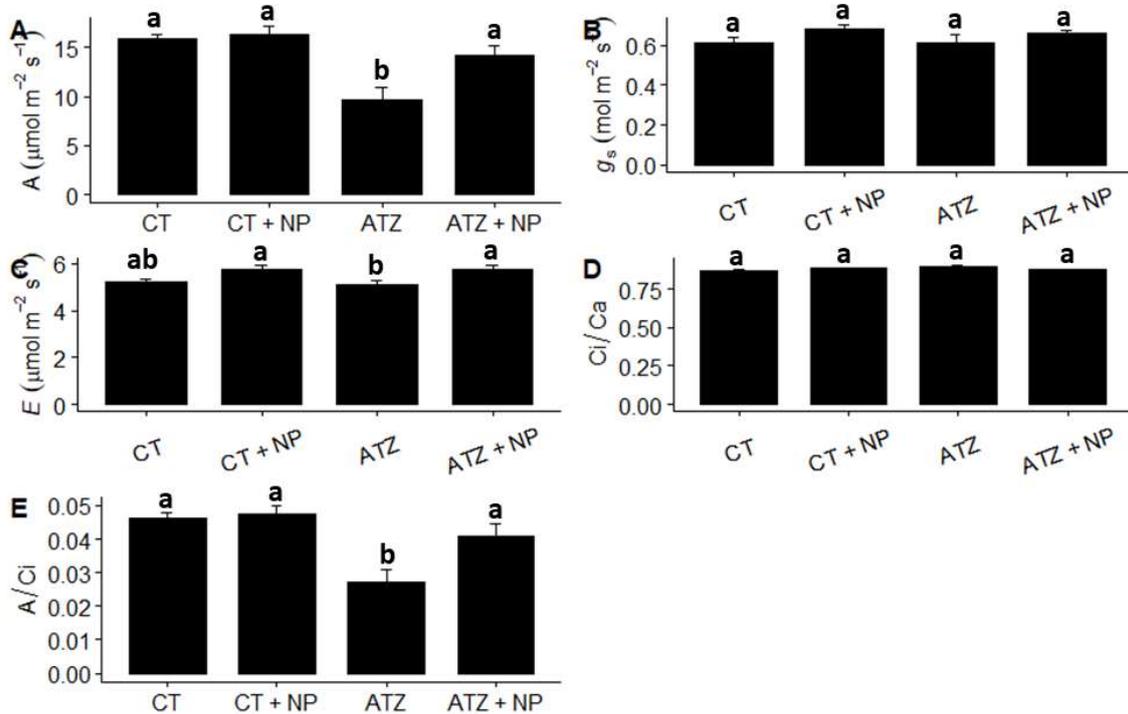
A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada para medir o impacto do herbicida Atz sobre os processos que refletem a primeira etapa da fotossíntese. Na Figura 5, pode-se observar que nas plantas expostas à atrazina não houve alteração no rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) (Fig. 5A) e na razão  $F_0/F_m$  (Fig. 5B), porém ocorreram decréscimos no rendimento quântico efetivo do fotossistema II ( $\Phi_{FII}$ , Fig. 5C) e no quenching fotoquímico ( $qP$ , Fig. 5D). A adição de nanopartículas, por sua vez, evitou a ocorrência dessas alterações, sendo todos os parâmetros mantidos similares ao controle.



**Figura 5.** Parâmetros de fluorescência da clorofila a em plantas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina, isoladamente ou em combinação com nanopartículas de óxido de zinco. Foram avaliados o rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) (A), a razão  $F_0/F_m$  (B), o rendimento quântico do fotossistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) (C), o quenching fotoquímico ( $qP$ ) (D) e o coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) (E). As plantas foram expostas aos seguintes tratamentos: CT (controle); CT + NP (nanopartículas de ZnO); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

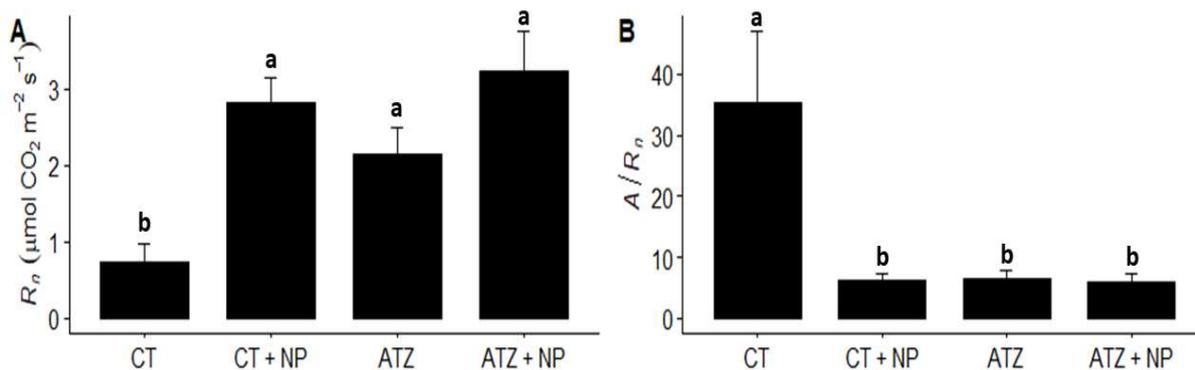
Assim como observado para os parâmetros de fluorescência, a exposição ao herbicida também impactou a segunda etapa do processo fotossintético de *P. stratiotes* (Fig. 6). A fig. 6A representa a assimilação líquida de carbono ( $A$ ), parâmetro central na fisiologia vegetal, e pode-se observar que o valor no tratamento ATZ tem decréscimo em relação ao controle de 38% na fixação de carbono. A aplicação de nanopartículas de ZnO foi capaz de atenuar esse efeito danoso da atrazina, de forma que a planta apresentasse resultado similar ao tratamento controle (CT). Em relação à condutância estomática ( $g_s$ ) e a transpiração ( $E$ ), os valores apresentados pelos tratamentos mantiveram-se estatisticamente iguais ao controle não havendo diferenças entre os tratamentos (Fig. 6B, 6C), com exceção da transpiração no tratamento ATZ+NP. A razão de concentração

interna de CO<sub>2</sub> e concentração externa de CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) (Fig. 6D) não variou dentre os tratamentos, porém, quando analisada a eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ) há redução no tratamento com ATZ (Fig. 6E).



**Figura 6:** Taxa de assimilação líquida de carbono ( $A$ ) (A), Condutância estomática ( $g_s$ ) (B), Transpiração ( $E$ ) (C), razão de concentração de CO<sub>2</sub> interno e externa  $C_i/C_a$  (D), eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ) (E), em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO – NP. CT (controle); CT + NP (nanopartículas de ZnO); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

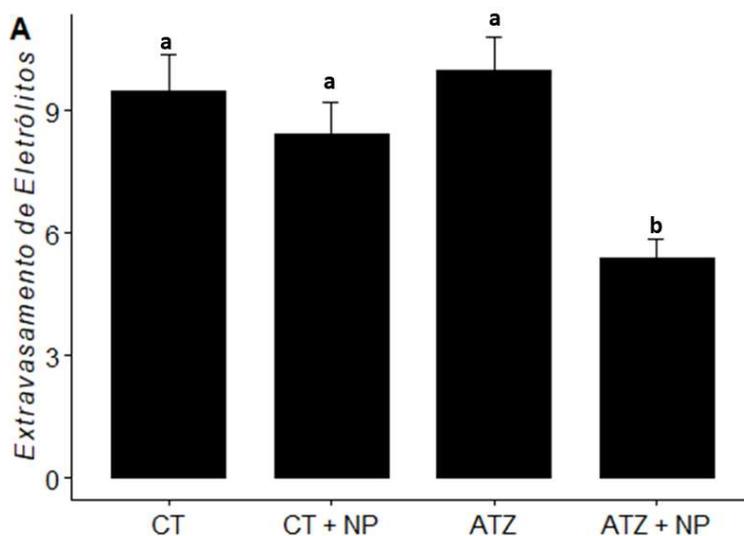
Em relação aos resultados da respiração noturna, observou-se que todos os tratamentos aumentaram esse parâmetro em relação ao controle (Fig.7A), e resultou em quedas na razão  $A/R_n$  (Fig 7B).



**Figura 7:** Respiração Noturna ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (A), Razão de  $A/R_n$  (B), em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO - NP. CT (controle); CT + NP (nanopartículas de ZnO); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2.4 Danos às membrana celulares

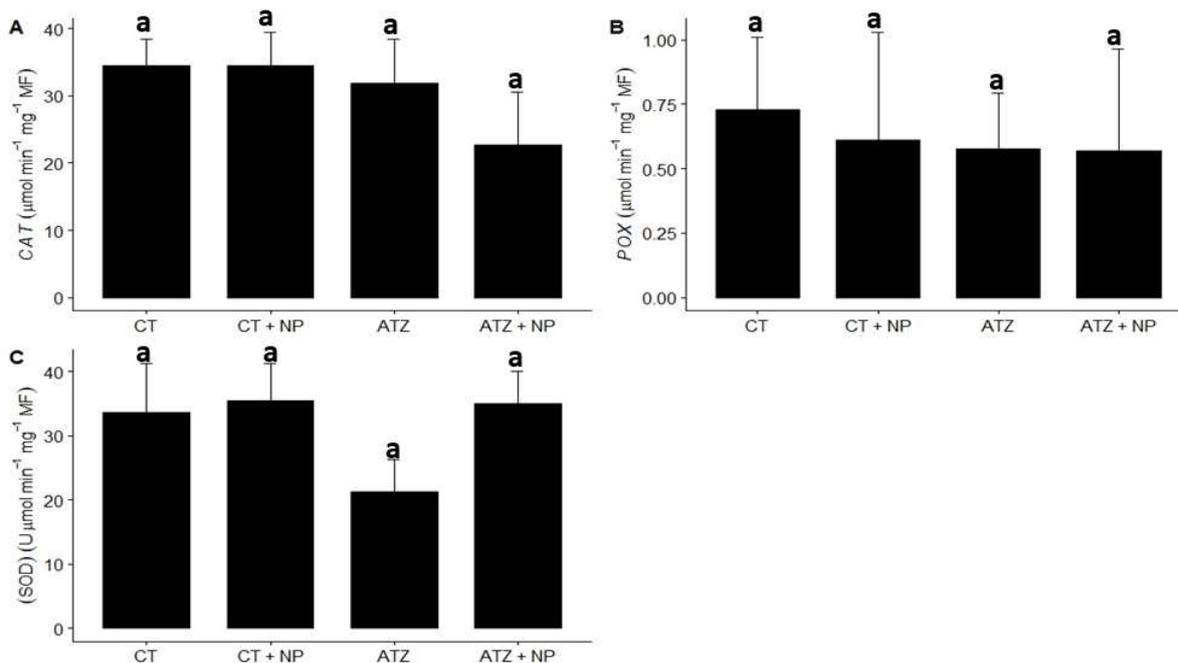
A ocorrência de danos na membrana celular vegetal pela exposição de algum estresse pode ser determinada pela quantificação do extravasamento de eletrólitos. Conforme observado na Fig. 8, apenas o tratamento ATZ+NP obteve condutividade elétrica significativamente menor que tratamento controle.



**Figura 8:** Extravasamento de eletrólitos (%) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO - NP. CT (controle); CT + NP (nanopartículas de ZnO); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2.5 Atividade de enzimas antioxidantes

A fim de verificar o efeito dos tratamentos sobre o sistema antioxidante enzimático, verificou-se a atividade das enzimas Catalases (CAT), peroxidases (POX) e dismutases do superóxido (SOD). No entanto, nenhuma variação foi observada na atividade das enzimas analisadas, (Fig. 9), sendo que todos os tratamentos se mantiveram similares ao controle.

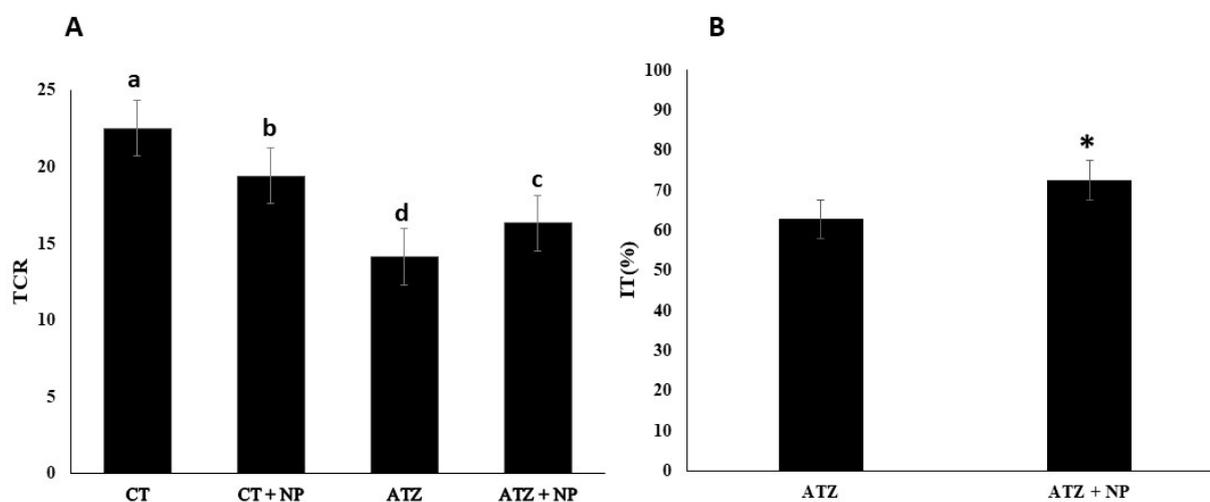


**Figura 9:** Atividade das enzimas antioxidantes Catalase (CAT) (A), Peroxidase (POX) (B), Superóxido Dismutase (SOD) (C), em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO - NP. CT (controle); CT + NP (nanopartículas de ZnO); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2.6 Taxa de crescimento relativo e índice de tolerância

A taxa de crescimento relativo dos tratamentos contendo o herbicida Atz foram menores que a do controle, sendo essa queda mais significativa nas plantas expostas ao herbicida isoladamente (Fig.10A). Em relação ao índice de tolerância, foi possível observar que com relação ao controle, que expressa a razão 100%, o tratamento com

atrazina obteve apenas 62,77%, enquanto o tratamento de atrazina + NP obteve 72,50% evidenciando maior tolerância nas plantas tratadas com NP (Fig. 10B).

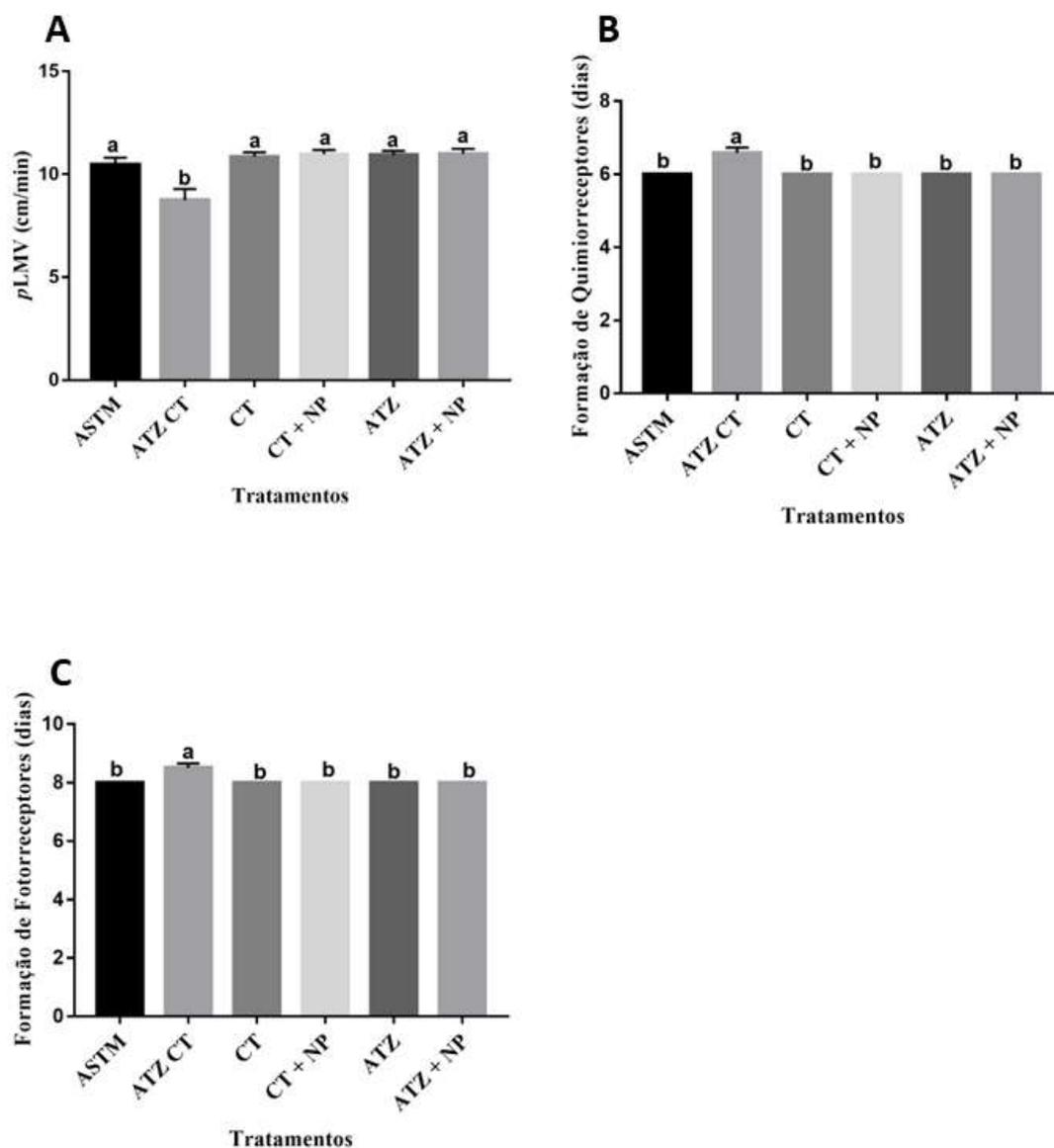


**Figura 10:** Taxa de crescimento relativo (A), Índice de tolerância (IT) (B), em plantas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de ZnO – NP. CT (controle); CT + NP (nanopartículas de ZnO); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ) e médias marcadas com asterisco não diferem entre si pelo teste T.

### 4.3. EXPERIMENTO III

#### 4.3.1 Ecotoxicidade da água fitorremediada sobre *G. tigrina*

A taxa de locomoção das planárias foi igual entre o meio ASTM (controle positivo; representa o meio ideal para realização de bioensaios com organismos aquáticos (ASTM, 1980)) e as soluções que passaram por fitorremediação. No entanto, as planárias que foram expostas à solução de atrazina que não foi fitorremediada (ATZ CT – controle negativo) apresentaram queda na sua capacidade locomotora (Fig. 11A). Em relação à regeneração, observou-se que a exposição à solução com atrazina, sem o processo de fitorremediação, resultou em atraso na formação dos quimiorreceptores e também dos fotorreceptores (Fig. 11B - 11C). O processo de fitorremediação, por sua vez, foi eficiente para reduzir a toxicidade da solução, mantendo os processos de regeneração similares aos observados nas planárias em meio ASTM.



**Figura 11:** Atividade locomotora de *G. tigrina*, contagem do número de linhas de grade cruzadas ao longo de 2 min de exposição aos tratamentos (A): Os dados são apresentados com média SEM, n=12. CT (controle); CT + NP (nanopartículas de ZnO); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO); *ATZ CT*(herbicida atrazina sem fitorremediação). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ). Formação dos Quimiorreceptores (B); Formação de fotorreceptores (C): Os dados são apresentados com média SEM, n=12. CT (controle); CT + NP (nanopartículas de ZnO); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+ NP (Atrazina + nanopartículas de ZnO); *ATZ CT*(herbicida atrazina sem fitorremediação). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis ( $P \leq 0,0001$ ).

## 5. DISCUSSÃO

O herbicida atrazina é amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas em culturas agrícolas como milho, sorgo e cana-de-açúcar. No entanto, as moléculas que compõem o princípio ativo deste agrotóxico podem se mover para longe do local de aplicação e atingir o ecossistema aquático, causando danos a organismos não alvo, comprometendo a conservação da biodiversidade, além de causar sérios efeitos à saúde humana (Contreras *et al.*, 2020). No presente estudo observou-se que o tratamento da água por 15 dias com *Pistia stratiotes* é eficiente para reduzir a toxicidade da atrazina sobre organismos não alvo e que a adição de ZnO-NP é uma estratégia eficiente para aumentar a tolerância da planta ao herbicida.

### **Toxicidade da atrazina em *Pistia stratiotes*: qual o impacto das nanopartículas de óxido de zinco?**

A exposição de *P. stratiotes* à Atz desencadeou uma série de alterações que comprometeram a anatomia, fisiologia e, em última instância, o crescimento e a tolerância das plantas. Esse herbicida foi especialmente desenvolvido para inibir o processo de fotossíntese e a redução na concentração de pigmentos fotossintéticos é frequentemente usada como indicador desta fitotoxicidade (Zhao *et al.*, 2013). No presente estudo, pôde-se observar que o teor de clorofila *a* foi afetado pela exposição à atrazina, e foi acompanhado por desorganização da estrutura do mesofilo (Fig. 2 e 3). Altas concentrações de atrazina inibem a produção de pigmentos fotossintéticos por retardar a formação de protoporfirina IX, molécula precursora da síntese de clorofila (Kabra *et al.*, 2014). A desorganização do mesofilo, por sua vez, tem sido observada em plantas expostas a outros compostos tóxicos, como o cádmio, e tem sido associada com alterações nas paredes celulares, com a diminuição da espessura dessas estruturas (Thongchai *et al.*, 2021). É interessante observar que, no presente estudo, as ZnO-NP foram capazes de garantir a manutenção da estrutura do mesofilo. Molnár *et al.* (2020) observaram que essas nanopartículas são capazes de induzir a remodelagem da parede celular, com aumentos nas concentrações de pectina e lignina (Molnár *et al.*, 2020). Dessa forma, é possível que, ao aumentar a concentração de lignina, que confere resistência às paredes celulares, e de pectina, importante componente da lamela média que contribui para a adesão entre as células, as ZnO-NP tenham promovido a manutenção da estrutura anatômica da folha. Além disso, a adição de ZnO-NP ao meio contendo ATZ aumentou a concentração de clorofilas, em particular a clorofila *a*. De acordo com Samreen *et al.*

(2017), a exposição ao Zn é capaz de melhorar os teores de clorofila, proteína e minerais em plantas de feijão-mungo (*Vigna radiata*) cultivadas hidropônicamente. O mecanismo subjacente no aumento do teor de clorofila pode estar ligado ao papel do Zn como um nutriente vital na biossíntese deste pigmento (Pullagurala *et al.*, 2018; Faizan e Hayat, 2019).

No processo fotossintético, a Atz age bloqueando a cadeia de transporte de elétrons no fotossistema II (Zhu *et al.*, 2009). Esse bloqueio ocorre porque a Atz se liga ao sítio de ligação da plastoquinona QB (acceptor de elétrons), interrompendo o fluxo de elétrons entre o fotossistema II e o fotossistema I (de Albuquerque *et al.*, 2020). Os dados de fluorescência da clorofila a permitem determinar de forma indireta o fluxo de transferência de elétrons e, assim, avaliar o impacto do herbicida nessa etapa (Tropaldi *et al.*, 2015). Em *P. stratiotes* o herbicida aparentemente agiu realmente apenas no bloqueio do transporte de elétrons, sem danificar proteínas e componentes do FSII, já que  $F_v/F_m$  manteve-se constante (Fig. 5A) (Tikkanen *et al.*, 2014). É possível que a própria diminuição na concentração de pigmentos fotossintéticos seja um mecanismo de defesa da planta, evitando o excesso de energia de excitação que poderia resultar em danos aos fotossistemas (Wang *et al.*, 2018). A redução em  $\Phi_{FSII}$  (Fig. 5C), por sua vez, indica o decréscimo no transporte de elétrons, e, é justamente o principal mecanismo de ação do Atz (Aguiar *et al.*, 2020). De forma similar, o  $qP$  reflete o estado reduzido do primeiro acceptor de elétrons estável do PSII, a QA, e os decréscimos nessa variável indicam o estado altamente reduzido da cadeia de elétrons pelos bloqueios ocasionados pelo herbicida (Fig. 5D) (Pimentel *et al.*, 2011).

Similarmente ao que foi observado para a concentração de clorofila, a aplicação de nanopartículas de ZnO-NP também foi capaz de atenuar os danos desencadeados pela atrazina nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, confirmando o papel de ZnO-NP em ajustes metabólicos. As ZnO-NP, inclusive, já foram apontadas como sendo capazes de interagir com elementos de vias de sinalização celular com consequentes acréscimos na capacidade fotossintética (Faizan *et al.*, 2021a). Além desse papel das ZnO-NP no aumento da fotossíntese em plantas submetidas a estresses abióticos, que já foi relatada por outros autores (Pullagurala *et al.*, 2018; Faizan *et al.*, 2021b; Faizan *et al.*, 2021c), é possível que as nanopartículas tenham aumentado a adsorção da atrazina às paredes celulares, limitando sua entrada no citosol, e contribuiria para diminuir a toxicidade do herbicida. Com efeito, conforme citado anteriormente, as ZnO-NP influenciam a constituição das paredes celulares, aumentando o conteúdo de lignina (Molnár *et al.*,

2020); uma vez que a atrazina se liga à lignina (Consolin-Filho *et al.*, 2000), é possível que, ao aumentar o conteúdo de lignina, as nanopartículas também aumentaram a compartimentalização do poluente em um componente estrutural externo ao citosol.

A exposição a Atz levou à queda na taxa de assimilação líquida de carbono ( $A$ ) e na eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ) em relação ao controle (CT) (Fig. 6A e B). Esse decréscimo de assimilação líquida de carbono é reflexo da menor eficiência do FSII, uma vez que não foram observadas alterações em  $g_s$  e em  $C_i/C_a$ . O decréscimo em  $A/C_i$  também pode ter sido ocasionado por danos na enzima Rubisco, uma vez que a Atz diminui a expressão de algumas proteínas associadas à Rubisco (Zhu *et al.*, 2009). A aplicação de ZnO - NP atenuou os efeitos tóxicos da atrazina no tratamento Atz + NP. Além de restaurar os parâmetros fotoquímicos, as nanopartículas também podem ter estimulado a ocorrência do Ciclo de Calvin, já tendo sido relatado que ZnO-NP são capazes de aumentar a atividade da Rubisco, influenciando a capacidade de fixação de carbono (Rico *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017).

Todos os tratamentos com nanopartículas e todos os tratamentos com atrazina resultaram em aumento na taxa respiratória (Fig. 7A). A respiração é o principal processo fisiológico por meio do qual as plantas obtêm energia (ATP), de forma que incrementos em condições de estresse são comumente observados e geralmente estão associados com gasto extra de energia pela ativação mecanismos de reparo e/ou defesa (Vieira *et al.*, 2020). Além disso, embora uma relação entre o Zn e o metabolismo respiratório nas plantas ainda não tenha sido demonstrado, é possível que as ZnO-NP participem da ativação desse processo, uma vez que a respiração noturna foi maior mesmo nas plantas submetidas às nanopartículas sem exposição ao herbicida.

Embora o Atz seja comumente associado com a ocorrência de estresse oxidativo nas plantas, como demonstrado em plantas de arroz (*Oryza sativa*) exposto à atrazina gerando EROS, como peróxido de hidrogênio e ânions superóxido (Zhang *et al.*, 2014) e na macrófitas *Typha latifolia*, L. (Pérez *et al.*, 2022), em *P. stratiotes* não foi observado nenhum dano às membranas, assim como não foi observada ativação do mecanismo antioxidante. De forma similar, Vieira *et al.* (2020) também não observou alteração nas enzimas antioxidantes de *P. stratiotes* tratada com esse mesmo herbicida, de forma que, essa parece ser uma resposta típica da espécie. Todavia, as ZnO-NP atenuaram os danos desencadeados pela ATZ ao mesmo tempo que mantiveram o potencial fitorremediador da espécie, indicando que outras vias de defesa foram ativadas. Além da possível ligação do poluente nas paredes celulares, anteriormente citada neste estudo, tem sido relatado

que as ZnO-NP participam de vias de sinalização que culminam com aumento da atividade da enzima glutathione-S-transferase, que é essencial para a compartimentalização da atrazina no vacúolo (Voloshina *et al.*, 2022). Embora essas hipóteses ainda precisem ser testadas, a compartimentalização da atrazina consiste em uma forma eficiente para a redução da toxicidade do herbicida.

A menor taxa fotossintética reduziu em menor crescimento nas plantas tratadas com Atz e, conseqüentemente, em menor índice de tolerância (Fig. 10). Ao atenuar o efeito do herbicida sobre o processo fotossintético, as ZnO-NP permitiram às plantas a manutenção de maior taxa de crescimento, ainda que em ritmo menor do que o observado no controle. Dessa forma, as nanopartículas foram efetivas no aumento da tolerância das plantas à Atz, e, também foi observada pela maior IC<sub>50</sub> nas plantas tratadas com ZnO-NP. Com efeito, ainda que a curva de IC<sub>50</sub> não tenha apresentado o formato sigmoidal típico (Gadagkar e Call *et al.*, 2014), provavelmente como consequência do forte impacto da Atz sobre o processo fotossintético, a adição das nanopartículas quase dobrou a concentração de herbicida necessária para inibir em 50% o processo fotossintético (Fig. 1).

### **Fitorremediação e a diminuição da toxicidade da água**

Os organismos aquáticos são particularmente sensíveis à Atz e mesmo concentrações abaixo da permitida pela legislação brasileira tem se mostrado letais (de Albuquerque *et al.*, 2020), de forma que a contaminação dos recursos hídricos pode comprometer severamente a biodiversidade desses ecossistemas. As planárias, além de fazerem parte da cadeia alimentar aquática tanto como presa quanto como predador, são bons modelos para se estimar o efeito de poluentes em outros animais, inclusive vertebrados. O processo de regeneração das planárias, por exemplo, é similar à embriogênese em vertebrados superiores (Wu *et al.*, 2018). Esses organismos se mostraram promissores para bioensaios com água contaminada com atrazina, uma vez que a exposição ao herbicida afetou todos os parâmetros aqui avaliados (atividade locomotora, formação de quimiorreceptores e de fotorreceptores (Fig. 11). Embora a planária seja capaz de metabolizar a atrazina, a presença de cloro no composto pode causar danos ao organismo, afetando o sistema nervoso, o sistema endócrino, e causando danos ao DNA, podendo levar a problemas de locomoção e de desenvolvimento (Lushchak *et al.*, 2018; Cleary *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2021). De acordo com Kosala (2001), as planárias estão sempre em movimento, seja para caça de alimento, seja na

busca por parceiros sexuais ou para sua fuga e proteção, de forma que a diminuição na locomoção pode impactar a sobrevivência desses organismos o que, por sua vez, irá impactar diversos níveis da cadeia trófica dos ambientes aquáticos. Essa alteração da atividade de locomoção pela exposição de herbicidas foi relatada em para uma série de organismos aquáticos, por exemplo, herbicidas à base de glifosato demonstraram alterar a atividade de *D. magna* e induzir alterações comportamentais no camarão de água doce *Caridina nilótica* (Hansen e Roslev, 2016; Mensah *et al.*, 2011). O retardo na regeneração, por sua vez, implica em prejuízos no sistema sensorial dificultando, a sua capacidade de detectar a presença de presa ou comida (Inoue *et al.*, 2015).

As alterações na locomoção e nos padrões de regeneração das planárias, no entanto, só foram observadas na solução contendo atrazina sem a presença de plantas, evidenciando, que o tratamento com *P. stratiotes* é eficaz para reduzir a toxicidade da água, objetivo primordial de qualquer processo de fitorremediação. É importante destacar que as práticas de reutilização de águas residuárias têm aumentado significativamente, e muitas destas formas de reuso são direcionadas para irrigação ou outras atividades diretamente vinculadas à exposição da flora e fauna a esses herbicidas, de forma que os resultados apresentados aqui possuem forte impacto ecotoxicológicos.

## 6. CONCLUSÃO

As plantas de *P. stratiotes* que foram expostas ao herbicida atrazina desencadeou vários danos, principalmente no aparato fotossintético, inibindo a transferência de elétrons, bem como decréscimo nos parâmetros de rendimento quântico do fotossistema II ( $\Phi_{FSII}$ ) e no quenching fotoquímico ( $qP$ ) - refletido no baixo crescimento e baixo índice de tolerância ao poluente.

Contudo houve atenuação destes danos quando foram aplicadas as ZnO-NP às plantas, aumentando a taxa de crescimento da planta sua tolerância. Os resultados obtidos reportam ainda que as plantas objeto de estudo, provavelmente realizaram a fitorremediação da água, uma vez que a locomoção e regeneração das planárias só foi impactada no tratamento que não passou pelo processo de fitorremediação. Embora não tenha sido possível verificar diferenças significativas na locomoção e regeneração de planárias em tratamentos com água fitorremediada com ou sem a doação de nanopartículas para as plantas, cabe ressaltar que a adição dessas moléculas aumentou o ganho de biomassa e a tolerância de *P. stratiotes*. Com efeito, dessa forma, a adição das nanopartículas torna a fitorremediação mais eficiente no longo prazo, uma vez que irá

umentar a sobrevivência das plantas e irá permitir a manutenção da absorção do poluente por período maior. É necessário, no entanto, que mais estudos sejam realizados a fim de avaliar a efetiva remoção do herbicida da água, ao passo que estudos adicionais de reprodução são sugeridos com *G. tigrina*, para além de ensaios com outros invertebrados de água doce para avaliação de comportamento, desenvolvimento e fisiologia – a considerar sensibilidade de diferentes organismos aos poluentes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIL, M.; SAFDAR, B.; SAQIB, B.; ZUBAIR, A.; NIAZ, A.; TASADDAQ, Y.; AMMAR, A.R.M.; JAWAHER, A.; YHENI, D.; MOHAMED, E., 2022. Zinc oxide nanoparticles improved chlorophyll contents, physical parameters, and wheat yield under salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v.13.

AGUIAR, L.M.; SANTOS, J.B.; BARROSO, G. M.; FERREIRA, E. A.; CABRAL, C. M.; COSTA, M.R.; VIEIRA, E. R. D.; ZANUNCIO, J. C., 2020. Phytoremediation by *Eremanthus crotonoides* and *Inga striata* decay atrazine and clomazone residues in the soil, **International Journal of Phytoremediation**. V. 22, p 827-833.

AKHTAR, N.; KHAN, S.; REHMAN, S.U.; REHMAN, Z.U.; KHATOON, A.; RHA, E.S.; JAMIL, M. 2021. Synergistic Effects of Zinc Oxide Nanoparticles and Bacteria Reduce Heavy Metals Toxicity in Rice (*Oryza sativa* L.) Plant. **Toxics**, v. 9, p.113.

AKTAR, M.W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdiscipl. Toxicol.** v. 2, p. 1-12.

ALAVANJA, M.C.; ROSS, M.K.; BONNER, M.R., 2013. Increased cancer burden among pesticide applicator and others due to pesticide exposure. **CA Cancer J. Clin.** v.63, p. 120-142.

ASTM, 1980 - Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Report E -729-80. **American Standards for Testing and Materials**, Philadelphia, P.A.

BARCHANSKA, H.; PLONKA, J.; JAROS, A.; OSTROWSKA, A., 2019. Potential application of *Pistia stratiotes* for the phytoremediation of mesotrione and its degradation products from water, **International Journal of Phytoremediation**, v. 21, p. 1090-1097.

BENITZ, T.; DE OLIVEIRA, M. S.; LOPES, K. A. R.; SOARES, C. P.; MORAIS, F. V.; VELHO, N. M. R. DE C., 2022. Estimation of the DNA damage in *Girardia tigrina* (Girard, 1850) after exposure to radiation under extreme conditions. **Brazilian Journal of Development**, v.8, p.12159-12177.

BROVINI, E. M.; de DEUS, B. C. T.; VILAS-BOAS, J. A.; QUADRA, G. R.; CARVALHO, L.; MENDONÇA, R. F.; CARDOSO, S. J., 2021. Three-bestseller

pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of The Total Environment**, v.771, p.144754.

BOGONI, J.A.; ARMILIATO, N.; ARALDI-FAVASSA, C.T.; TECHIO, V.H., 2014. Genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Twospot *Astyanax*) exposed to the waters of Engano River (Brazil) as determined by micronucleus tests in erythrocytes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v.66, p.441–449.

CLEARY, J.A. ; TILLITT, D.E.; VOM SAAL, F.S.; NICKS, D.K.; CLAUNCH, R.A.; BHANDARI, R.K., 2019. Atrazine induced transgenerational reproductive effects in medaka (*Oryzias latipes*) **Environ. Pollut.**, 251 , p. 639-650.

COMISSÃO EUROPEIA, 2004. Decisão da Comissão de 10 de março de 2004 relativa à não inclusão da atrazina no Anexo I da Directiva do Conselho 91/414/CEE e à retirada das autorizações de produtos fitofarmacêuticos que contenham esta substância activa, 2004/248/CE. *JOUE* , 78 , pp.53-55.

CONSOLIN FILHO, N.; CARLOS M.P.; VAZ, LADISLAU MARTIN-NETO, LUIZ H.C. MATTOSO, 2000. Estudo de adsorção dos herbicidas imazaquin e atrazina em polímeros. **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS**, v.14, São Pedro – SP.

CONTRERAS, M.B.C.; CAMACHO, J.V.; FERNANDEZ-MORALES, F.J.; CAÑIZARES, P.C.; RODRIGO, M.A.R., 2020. Biodegradability improvement and toxicity reduction of soil washing effluents polluted with atrazine by means of electrochemical pre-treatment: influence of the anode material. **Jornal Environment manager**, v. 255, p.109895.

DE ALBUQUERQUE, F.P.; DE OLIVEIRA, J.L.; MARCHINI-CARLOS, V.; FRACETO, L.F., 2020. An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. **Sci.Total Environment**. v. 700, p. 134-868.

DE VASCONCELOS, V.M.; DE MORAIS, E.R.C.; FAUSTINO, S.J.B.; HERNANDEZ, M. C. R.; GAUDÊNCIO, H. R.S. MELO, C.; JUNIOR, R. R.; A. P. B., 2021. Floating aquatic macrophytes for the treatment of aquaculture effluents. **Environ Sci Pollut Res** v. 28, p. 2600–2607.

ESCOTO, D. F.; GAYER, M. C.; BIANCHINI, M. C.; PEREIRA, G. C.; ROEHRS, R.; DENARDIN, E. L.G., 2019. Use of *Pistia stratiotes* for phytoremediation of water resources contaminated by clomazone. **Chemosphere**, v. 227, p. 299-304.

FAIZAN, M.; BHAT, J.A.; CHEN, MOHAMMED NASSER ALYEMENI, LEONARD WIJAYA, PARVAIZ AHMAD, FANGYUAN YU, 2021. Zinc oxide nanoparticles

(ZnO-NPs) induce salt tolerance by improving the antioxidant system and photosynthetic machinery in tomato, **Plant Physiology and Biochemistry**, v.161, p.122-130.

FAIZAN, M. ; HAYAT, S., 2019. Effect of foliar spray of ZnO-NPs on the physiological parameters and antioxidant systems of *Lycopersicon esculentum*. **Polish J. Natural Sci.** v.34, p.87–105.

FURLAN, L., KREUTZWEISER, D., 2015. Alternatives to neonicotinoid insecticides for pest control: case studies in agriculture and forestry. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 22, p. 135-147.

GADAGKAR, S.; CALL, G., 2014. Computational tools for fitting the Hill equation to dose–response curves. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v.71.

GIANNINI-KURINA, F.; BORELLO, J.; CAÑAS, I.; HANG, S.; BALZARINI, M.,2022. Mapping atrazine persistence in soils of central Argentina using INLA, **Soil and Tillage Research**, v. 219, p.105320.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K., 1977. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants, **Plant Physiology**, v.59 p.309–314.

HANSEN, L.; ROSLEV, P., 2016. Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to Glyphosate and Glyphosate-Copper Complexes. **Aquatic Toxicology**, v.179, p.36-43

HASSAN M.U.; NAWAZ, M.; MAHMOOD, A.; SHAH, A.A.; SHAH, A.N.; MUHAMMAD, F.; BATOOL, M.; RASHEED, A.; JAREMKO, M.; ABDELSALAM, N.R.; HASAN, M.E.; QARI, S.H., 2022. The role of zinc to mitigate heavy metals toxicity in crops. *Front. Environ. Sci.* v. 10, p.990223.

INOUE, T., HOSHINO, H., YAMASHITA, T., SHIMOYAMA, S., AGATA, K., 2015. Planarian shows decision-making behavior in response to multiple stimuli by integrative brain function. **Zool. Lett.** v.1, p.1–15.

KOLASA, J., 2001. FLATWORMS: TURBELLARIA AND NEMERTEA IN: **Ecology and classification of north American freshwater invertebrates**. 2nd Ed. AP, United States of America: Academic press, p.155–180.

LONDRES, F., 2011. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. In: Londres, F., Monteiro, D. (Eds.), **AS-PTA e Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa**, Rio de Janeiro, p. 190.

LÓPEZ, A.M.C.; SARAIVA,A.S.; CARLOS GRAVATO, AMADEU, M.V.M. SOARES, RENATO Almeida Sarmiento. 2021. “Behavioral Parameters of Planarians (*Girardia Tigrina*) as Fast Screening, Integrative and Cumulative Biomarkers of Environmental Contamination: Preliminary Results.” **Water (Switzerland)** v.13.

LOPEZ, B.; OLLIVER, P.; TOGOLA, A.; BARAN, N.; GHESTEM, J.P.; 2015. Screening of French groundwater for regulated and emerging contaminants. **Sci. Tot. Environment.** v. 518/519, p. 526-573.

LUSHCHAK, V.I. ; MATVIISHYN, T.M.; HUSAK, V.V.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B., 2018. Pesticide toxicity: a mechanistic approach, **EXCLI J.**, v. 17 , p. 1101-1136.

MACHADO, S.C., MARTINS, I., 2018. Risk assessment of occupational pesticide exposure: use of endpoints and surrogates. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v.98, p. 276-283.

MARTINS, D.; CARBONARI, C.A.; TERRA, M.A.; MARCHI, S.R., 2009. Ação de adjuvantes na absorção e translocação de Glyphosate em plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 1, p. 155-163.

MAXWELL, K.; GILES, N. J., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide , **Journal of Experimental Botany** , v.51, p.659–668.

MENSAH, K.; MULLER, W.J. ; PALMER, C.G., 2011. Acute toxicity of roundup® herbicide to three life stages of the freshwater shrimp *Caridina nilotica* (Decapoda: Atyidae). **Phys. Chem. Earth A/B/C**, v.36, p. 905-909.

MOLNÁR Á, RÓNAVÁRI A, BÉLTEKY P, SZÓLLÓSI R, VALYON E, OLÁH D, RÁZGA Z, ÖRDÖG A, KÓNYA Z, KOLBERT Z., 2020. ZnO nanoparticles induce cell wall remodeling and modify ROS/ RNS signalling in roots of Brassica seedlings. **Ecotoxicol Environ Saf.** v.15, p. 206.

NANO, G. M. et al., 2002. In vitro tests to evaluate potential biological activity in natural substances. **Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 140–146.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A., 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** v.11 p.137-143.

PÉREZ, D. J. ; DOUCETTE, W. J.; MOORE, M. T., 2022. Atrazine uptake, translocation, bioaccumulation and biodegradation in cattail (*Typha latifolia*) as a function of exposure time. **Chemosphere**, v.287, p.132104.

PIMENTEL, C.; OLIVEIRA, R. F.; RIBEIRO, R. V.; SANTOS, M. G.; MACHADO, E. C., 2011. Características fotossintéticas de *Phaseolus vulgaris* L. **Roehnea**, v.2, n.38, p.273-279.

PULLAGURALA, V.L.R.; ADISA, I.O.; RAWAT, S.; KALAGARA, S.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J.A.; PERALTA-VIDEA, J.R.; GARDEA-TORRESDEY, J.L., 2018. ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (*Coriandrum sativum*), **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 132, p.120-127.

RIBEIRO, V.H.V.; ALENCAR, B.T.B.; SANTOS, N.M.C.; COSTA, V.A.M.; SANTOS, J.B.; FRANCINO, D.M.T.; SOUZA, M.F.; SILVA, D.V., 2018. Sensitivity of the macrophytes *Pistia stratiotes* and *Eichhornia crassipes* to hexazinone and dissipation of this pesticide in aquatic ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 168, n. 1, p. 177-183.

RICO, C.M.; PERALTA-VIDEA, J.R.; GARDEA-TORRESDEY, J.L., 2015. Chemistry, biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants. **Nanotechnology and Plant Sciences**, Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp. 1-17.

RYBERG, K.R.; STONE, W.W.; BAKER, N.T., 2020. Causal factors for pesticide trends in streams of the United States: Atrazine and deethylatrazine. **J. Environ. Qual.** v.49, p.152– 162.

RODRIGUES, A. C. M et al., 2015 Sub-lethal toxicity of environmentally relevant concentrations of esfenvalerate to *Chironomus riparius*. **Environmental Pollution**, v. 207, p. 273–279.

SAMREEN, T.; H.U. SHAH, S. ULLAH, M. JAVID, M.. 2017. Zinc effect on growth rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hydroponically grown mungbeans plant (*vigna radiata*) Arab. **J. Chem.**, v. 10, p. 1802-1807.

SASS, J.B., COLANGELO, A., 2006. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. **Int. J. Occup. Environment Health**, v. 12, p. 260-267.

SISAGUA - Detecção e concentração de agrotóxicos de 2014 a 2017 de acordo com dados de Controle do Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), do Ministério da Saúde. O mapa foi construído a partir de dados obtidos em abril de 2018 e não reflete atualizações feitas desde então. Baixe aqui a base completa enviada pelo Sisagua em abril de 2018.

VIEIRA, L. R.; CORRÊA, E. S.; MORAES, B. S.; ROSSATO, M. V.; VESTENA, 2015. S. Toxicidade de cádmio em plantas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v.19 n.2 p. 1574-1588.

VIEIRA, A.J.L.; ALVES, R.D.F.B.; SILVA, P.E.M.; MENDONÇA, M.A.C.; SILVA, M.L.F.; SILVA, M.C.A.P.; SOUSA, L.F.; LOURENÇO, L.L.; SILVA, A.A.; COSTA, A.C.; SILVA, F.G.; FARNESE, F.S., 2021. Water contamination with atrazine: is nitric oxide able to improve *Pistia stratiotes* phytoremediation capacity?, **Environmental Pollution**, v. 272.

VOLOSHINA, M.; RAJPUT, V.D.; MINKINA, T.; VECHKANOV, E.; MANDZHIEVA, S.; MAZARJI, M.; CHURYUKINA, E.; PLOTNIKOV, A.; KREPAKOVA, M.; WONG, M.H., 2022. Zinc Oxide Nanoparticles: Physiological and Biochemical Responses in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plants*, v.11, p.2759.

WANG, Y.; YU, J.; ZHOU, B.; SAPKOTA, S.; WEI, F.; WANG, Z., 2018. Atrazine and Mesotrione-Induced Oxidative Stress and Impact on Antioxidant Enzymes and Chlorophyll Contents in Bermudagrass. **Planta Daninha**, v.36, e018172227.

WHITLOW, T.H.; BASSUK, N.L.; RANNEY, T.G.; REICHERT, D.L., 1992. An improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant tissues. **Plant Physiology**, v.98, p.198-205.

TROPALDI, L.; VELINI, E. D.; CARBONARI, C. A.; ARALDI, R.; CORNIANI, N.; GIROTTO, M.; DE FREITAS, I. P., 2015. Detecção da tolerância de diferentes espécies de capim-colchão a herbicidas inibidores do fotossistema II utilizando a técnica da fluorescência. **Ciência Rural**, v.45, p.767-773..

TIKKANEN, M.; MEKALA, N.R.; ARO, E.M., 2014. Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v.1837, p.210-215.

THONGCHAI, A., MEEINKUIRT, W., TAEPRAYOON, P. ET AL., 2021. Effects of soil amendments on leaf anatomical characteristics of marigolds cultivated in cadmium-spiked soils. **Sci Rep.** v.11, p.15909.

YAN, S. ; WU, F. ; ZHOU, S. et al., 2021. Zinc oxide nanoparticles alleviate the arsenic toxicity and decrease the accumulation of arsenic in rice (*Oryza sativa L.*). **BMC Plant Biol**, v. 21, p.150.

YANG, C.; LIM, W.; SONG, G., 2021. Reproductive toxicity due to herbicide exposure in freshwater organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, v. 248, p.109103.

Zhang, J.J. ; Lu, Y.C. ; Yang, H., 2014. Chemical modification and degradation of atrazine in *Medicago sativa* through multiple pathways. **J. Agric. Food Chem.**,v. 62, pp. 9657-9668.

ZHAO, L.; SUN, Y.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J.A.; SERVIN, A.D.; HONG, J.; NIU, G.; PERALTA-VIDEA, J.R.; DUARTE-GARDEA, M.; GARDEA-TORRESDEY, J.L.; 2013. Influence of CeO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: a life cycle study. **J. Agric. Food Chem.** V.61, p.11945–11951.

ZHAO, G.; XU, H.; ZHANG, P.; SU, X.; ZHAO , H.; 2017. Effects of 2, 4-epibrassinolide on photosynthesis and Rubisco activase gene expression in *Triticum aestivum L.* seedlings under a combination of drought and heat stress. **Plant Growth Regul.**, v.81, pp. 377.

ZHU, J.; PATZOLDT, W.L.; RADWAN, O.; TRANEL, P.J.; CLOUGH, S.J., 2009. Effects of photosystem-II-interfering herbicides atrazine and bentazon on the soybean transcriptome. **Plant Genome**, v.2, p.191–205.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela 1:** Taxa de assimilação líquida de carbono ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) em *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina (ATZ,  $\text{mg L}^{-1}$ ), na presença e na ausência de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NP). Foram avaliadas as concentrações de 10 e 15  $\text{mg L}^{-1}$  de ZnO NP. As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: CT

(controle, apenas solução nutritiva); CT + NP (solução nutritiva + ZnO NP); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+ NP (Atrazina + ZnO NP).

<b>Tratamentos</b>	<b>ATZ</b>	<b>ZnO NP</b>	<b>A</b>
<b>CT</b>	0	0	16,29 a
<b>CT + NP I</b>	0	10	16,90 a
<b>CT + NP II</b>	0	15	13,79 a
<b>ATZ</b>	0,025	0	6,15 b
<b>ATZ + NP I</b>	0,025	10	11,98 a
<b>ATZ + NP II</b>	0,025	15	12,03 a

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).