

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

DANOS FISIOLÓGICOS EM PLANTAS DE *Eichhornia
crassipes* EXPOSTAS A ATRAZINA SÃO REDUZIDOS NA
PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS DE ZINCO: UMA
ABORDAGEM VISANDO A OTIMIZAÇÃO DA
FITORREMEDIÇÃO

Autora: Natyelle Santos Soares
Orientadora: Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese

Rio Verde – GO

Março – 2023

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

DANOS FISIOLÓGICOS EM PLANTAS DE *Eichhornia
crassipes* EXPOSTAS A ATRAZINA SÃO REDUZIDOS NA
PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS DE ZINCO: UMA
ABORDAGEM VISANDO A OTIMIZAÇÃO DA
FITORREMEDIÇÃO

Autora: Natyelle Santos Soares
Orientadora: Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese

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 Orgânica

Rio Verde – GO
Março – 2023

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

S676d Soares, Natyelle Santos
Danos fisiológicos em plantas de Eichhornia crassipes expostas a atrazina são reduzidos na presença de nanopartículas de zinco: uma abordagem visando a otimização da fitorremediação / Natyelle Santos Soares; orientadora Fernanda dos Santos Farnese; co-orientador Paulo Eduardo de Menezes Silva. -- Rio Verde, 2023.
44 p.

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

1. Aguapé. 2. Bioensaios. 3. Herbicida. 4. Macrófita. 5. Descontaminação ambiental. I. dos Santos Farnese, Fernanda, orient. II. de Menezes Silva, Paulo Eduardo, co-orient. III. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 n°2376

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

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo: _____

Nome completo do autor:

Natyelle Santos Soares

Título do trabalho:

Matrícula:

20211033103I0031

Danos fisiológicos em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a atrazina são reduzidos na presença de nanopartículas de zinco: uma abordagem visando a otimização da fitorremediação

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIIF Goiano: 31 /05 /2023

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 incluídos 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.

Rio Verde

Local

23 /05 /2023

Data

Natyelle Santos Soares

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Fernanda S. Evensen

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

Ata nº 32/2023 - SREPG/CMPR/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
ATA Nº/98
BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e sete dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e três, às 14h00min (quatorze horas), reuniram-se os componentes da banca examinadora em sessão pública realizada no Auditório do Prédio da Pesquisa e Pós-Graduação do Campus Rio Verde do IF Goiano, para procederem a avaliação da defesa de Dissertação, em nível de mestrado, de autoria de **NATYELLE SANTOS SOARES**, discente do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Prof.^a Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora para, em 30 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE (a) NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA**, na área de concentração em Agroquímica, pelo Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGAq da versão definitiva da Dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, a defesa perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60 (sessenta) dias** da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa dissertação em periódicos após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado, e para constar, foi lavrada a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada eletronicamente pelos membros da Banca Examinadora.

Membros da Banca Examinadora

Nome	Instituição	Situação no Programa
Fernanda dos Santos Farnese	IF Goiano - Campus Rio Verde	Presidente
Suzana Maria Loures de Oliveira Marcionilio	IF Goiano - Campus Rio Verde	Membro interno

Fábia Barbosa da Silva

IF Goiano - Campus Rio

Membro externo

Documento assinado eletronicamente por:

- Fabia Barbosa da Silva, 2020202341360019 - Discente, em 27/04/2023 10:44:29.
- Suzana Maria Loures de Oliveira Marcionilio, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 28/03/2023 13:36:57.
- Fernanda dos Santos Farnese, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 27/03/2023 16:17:02.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 24/03/2023. 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: 480455
Código de Autenticação: af3ea5a0fc



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

Dedico toda essência deste trabalho ao meu vovô e às mulheres fortes, poderosas e resistência, que me são exemplos de luta. Vovó, Mamãe e titia Flor, dedico a vocês. “Pés, por que os amaria, se eu tenho asas para voar?” – Frida Kahlo

AGRADECIMENTOS

Por mais que eu tente, nenhum texto será capaz de transmitir toda minha gratidão pela ajuda, apoio e incentivo que recebi durante esses dois anos, eles foram essenciais para a conclusão dessa etapa. Agradeço a minha querida mãe Liana, que mesmo mãe solo, nunca mediu esforços para que eu pudesse estudar, por suas orações e conselhos durante toda essa jornada. Ao meu querido e amado irmão Kaíque, que sempre foi colo e amparo nos momentos de incertezas. A minha vizinha Iracina, que sempre esteve ao meu lado e que mesmo sem entender o significado desta pesquisa, alegrou-se e comemorou comigo cada conquista. A minha tia Flor por todo incentivo, apoio e que sempre acreditou que eu era capaz. As minhas primas Bia, Adiene e ao meu amorzinho Rebeca, por todo carinho em forma de cartinhas, abraços e beijos.

Agradeço a minha companheira de vida, meu amor Camila, pela paciência, por seu cuidado e amor. Por me apoiar de maneira irrestrita e dividir comigo todos os momentos alegres e não tão alegres de todo esse processo.

A minha amiga Samylla, por toda sua ajuda e incentivo.

A minha orientadora Fernanda dos Santos Farnese, por ter me acolhido, pegado em minha mão e caminhado junto comigo. Sou grata por tudo que me ensinou, por sentar comigo e me explicar desde as coisas mais simples e básicas até as mais avançadas, pelos conselhos e puxões de orelha que me ajudaram a melhorar e a evoluir como mulher e pesquisadora. Guardo com muito carinho cada elogio que me deu, pois em diversos momentos eles foram o combustível para que eu continuasse.

Aos membros da banca pela disponibilidade em analisar esse material.

Aos meus coorientadores, Althiéris de Souza Saraiva, Paulo Eduardo de Menezes Silva e Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho, pelos ensinamentos e contribuição para minha formação. Agradeço ao professor Fabiano Guimarães, Alan Carlos Costa e ao Adinan Alves, por cederem o espaço e equipamentos para as análises.

Agradeço o companheirismo de todos do Laboratório de Estudos Aplicados em Fisiologia Vegetal - LEAFv, aos colegas Maria Lúcia, Sabrina, Marina, Letícia, Valdeir, Lucas, e todos que estiveram comigo e me ajudaram durante esse trabalho. Agradeço em especial a Priscila, que se prontificou a me ajudar em todas as etapas de forma admirável.

Agradeço ao meu amigo Alex Cotrim, pelo companheirismo e parceria que tivemos durante todo esse trabalho, o que tornou esse processo mais leve. À Chrys, uma

grande amiga que ganhei através do mestrado, que apesar da distância se fez presente em diversos momentos.

Aos meus amigos, por serem minha dose de alegria e amor.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade de qualificação e crescimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pela concessão da bolsa.

Agradeço a todas as mulheres que lutaram pelo direito de hoje eu poder estudar, a todas minhas professoras e a todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida, de viver todo esse processo, aprender e evoluir.

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre.” - Simone de Beauvoir

BIOGRAFIA DA AUTORA

Natyelle Santos Soares, filha de Liana Souza dos Santos, e filha de coração de Sanção de Souza Pinto (*in memoriam*) e Iracina Moreira dos Santos. Nasceu em 06 de março de 1992 na cidade de São Paulo – SP. Graduiu-se em Licenciatura em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde e em março de 2021, ingressou no curso de pós-graduação *Stricto sensu* em Agroquímica pela mesma instituição, atuando na linha de pesquisa em agroquímica ambiental, com ênfase em fitorremediação de ambientes contaminados com herbicida.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	9
RESUMO	12
ABSTRACT	13
ÍNDICE	11
1 INTRODUÇÃO	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Material Vegetal e Condições Experimentais	22
2.2 Determinação de Pigmentos Fotossintéticos.....	23
2.2.1 Teor de pigmentos por DMSO.....	23
2.3 Avaliações fisiológicas	24
2.4 Avaliação da Ocorrência de Danos às Membranas Celulares.....	25
2.4.1 Avaliação da Peroxidação Lipídica.....	25
2.4.2 Extravasamento de eletrólitos	26
2.5 Determinação da Atividade de Enzimas Antioxidantes.....	26
2.6 Ensaio Ecotoxicológico com a planária <i>G. tigrina</i>	27
2.6.1 Atividade de capacidade regenerativa.....	28
2.7 Análises estatísticas.....	28
3 RESULTADOS.....	28
3.1 Teor de pigmentos fotossintéticos.....	28
3.3 Avaliações fisiológicas	30
3.4 Avaliação da ocorrência de danos às membranas celulares.....	33
3.5 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes.....	34
3.6 Ensaio ecotoxicológico com <i>G. tigrina</i>	35

3.6.1 Atividade de regeneração.....	35
4 DISCUSSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

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 CO_2

CO_2 - Dióxido de carbono

CT - Controle

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

ETR - Taxa aparente de transporte de elétrons

F_0 - Fluorescência Mínima

F_0' - Fluorescência Mínima após aclimação à luz actínica

F_m - Fluorescência Máxima

F_m' - Fluorescência Máxima à luz

F_v - Fluorescência Variável

F_v/F_m - Rendimento quântico potencial do fotossistema II

g - Gramas

g_s - Condutância estomática

h - Horas

H_2O_2 - Peróxido de Hidrogênio

IT - Índice de tolerância

$\ln w_0$ - Logaritmo neperiano de massa seca inicial

ln w1 - Logaritmo neperiano de massa seca final

M - Metro

M² - Metro quadrado

MDA – Malondialdeído

Mg - Miligrama

mgL⁻¹ - Miligrama por litro

mL - Mililitro

mM - Milímol

nm - Nanômetro

NPQ - Quenching não fotoquímico

O₂⁻ - Ânion superóxido

pH - Potencial hidrogeniônico

POX - Peroxidase

qN - Quenching não fotoquímico

qP - Quenching fotoquímico

RN - Respiração noturna

Rw - Taxa de crescimento relativo (fórmula)

Rw* - 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

t1-t0 - Duração do experimento (fórmula)

TBA - Ácido 2 - tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

TCR - Taxa de Crescimento Relativo

$\mu\text{g L}^{-1}$ - microgramas por litro

μL - Microlitro

μM - Micromolar

μmol - Micromol

Φ_{FSII} - Eficiência Fotoquímica Fotossistema II

Φ_{CO_2} - Rendimento quântico de assimilação de carbono

RESUMO

SOARES, NATYELLE SANTOS. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO, março de 2023. **Danos fisiológicos em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a atrazina são reduzidos na presença de nanopartículas de zinco: uma abordagem visando a otimização da fitorremediação.** Orientadora: Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese. Coorientadores: Dr. Paulo Eduardo de Menezes Silva; Dr. Althiéris de Souza Saraiva; Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho.

Os agrotóxicos são amplamente utilizados visando o aumento da produtividade agropecuária, sendo que o Brasil se destaca como um dos maiores consumidores mundiais destes pesticidas. Dentre os pesticidas amplamente utilizados está a atrazina, herbicida empregado no controle de plantas daninhas que acometem culturas agrícolas. A exposição a esses produtos, no entanto, tem desencadeado problemas para os seres humanos e para o meio ambiente devido pela intensa aplicação nas áreas agrícolas, provocando a contaminação dos recursos hídricos e afetando diversos organismos. Diante desses fatores, há grande necessidade em avaliar e monitorar a qualidade da água, principalmente em ecossistemas de água doce adjacentes às áreas de cultivos agrícola. Alternativas para despoluir áreas contaminadas, como a fitorremediação, que consiste no uso de plantas para descontaminar e retirar poluentes, são promissoras. Uma espécie de macrófita que possui propriedade de acumulação e retirada de poluentes de ambientes aquáticos é a *Eichhornia crassipes*. Nanopartículas de óxido de zinco (NP ZnO) podem ser empregadas como substâncias nutritivas e promover benefícios às plantas expostas a compostos tóxicos. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial das NP ZnO para atenuar os danos desencadeados pelo herbicida atrazina em *E. crassipes*. Plantas de *E. crassipes* foram mantidas em casa de vegetação e submetidas a quatro tratamentos com seis repetições cada, a saber: T1 – controle (apenas solução nutritiva); T2 – controle e NP ZnO NP (10 mg L⁻¹); T3 - Atrazina (Atz) (0,025 mg L⁻¹); T4 - Atz + NP ZnO (10 mg L⁻¹). As plantas permaneceram nessas condições pelo período de 15 dias e, logo após, foram realizadas as avaliações dos pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*. A aplicação do herbicida atrazina, sem a nanopartículas, diminuiu os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, sendo esse um resultado já esperado pelo modo de ação do herbicida. Além dessas análises, foi avaliada a autofluorescência da clorofila que apontou para extensa degradação do pigmento fotossintético, porém a adição de NP ZnO foi capaz de restaurar, parcialmente, a autofluorescência da clorofila. Através determinação do teor de MDA foi verificado que a planta não sofreu estresse oxidativo, resultado que também foi confirmado através da análises de extravasamento de eletrólitos, indicando que não houve produção excessiva de EROs nas plantas expostas ao ATZ. A enzima CAT apresentou maior atividade nas plantas no tratamento ATZ+NP em comparação com as plantas expostas, apenas ao herbicida, podendo estar relacionado com outros processos fisiológicos, como a fotorrespiração. Ademais, com o intuito de verificar a capacidade de fitorremediação de *E. crassipes*, um ensaio ecotoxicológico com a planária *G. tigrina* foi realizado e verificou-se que a planta foi capaz de diminuir a toxicidade da solução contaminada pela ATZ em organismos não alvos, conferindo a *E. crassipes* alto potencial fitorremediador.

Palavras-chave: Aguapé; Bioensaios; Herbicida; Macrófita; Descontaminação ambiental.

ABSTRACT

SOARES, NATYELLE SANTOS. Federal Institute of Education, Science and Technology Goiano – Campus Rio Verde – GO, March 2023. **Physiological damage in *Eichhornia crassipes* plants exposed to atrazine is reduced in the presence of zinc nanoparticles: an approach aimed at optimizing phytoremediation.** Advisor: Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese. Co-advisors: Dr. Paulo Eduardo de Menezes Silva; Dr. Althieris de Souza Saraiva; Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho.

Pesticides are widely used to increase agricultural productivity, with Brazil standing out as one of the world's largest consumers of these pesticides. Among the widely used pesticides is atrazine, a herbicide used to control weeds that affect agricultural crops. Exposure to these products, however, has triggered problems for humans and the environment due to the intense application in agricultural areas, causing water resources contamination and affecting various organisms. Given these factors, there is a great need to assess and monitor water quality, especially in freshwater ecosystems adjacent to areas of agricultural cultivation. Alternatives to clean up contaminated areas, such as phytoremediation, which consists of using plants to decontaminate and remove pollutants, are promising. A macrophyte species that has the property of accumulating and removing pollutants from aquatic environments is *Eichhornia crassipes*. Zinc oxide nanoparticles (NP ZnO) can be used as nutritious substances and promote benefits to plants exposed to toxic compounds. Therefore, the objective of this study was to evaluate the potential of zinc oxide nanoparticles to attenuate the damage triggered by the herbicide atrazine in *E. crassipes*. *E. crassipes* plants were kept in a greenhouse and submitted to four treatments with six replications each, namely: T1 – control (nutrient solution only); T2 – control and zinc oxide nanoparticles – ZnO NP (10 mg L⁻¹); T3 - Atrazine (Atz) (0.025 mg L⁻¹); T4 - Atz + ZnO NP (10 mg L⁻¹). The plants remained under these conditions for a period of 15 days and, soon after, the assessment of photosynthetic pigments, gas exchange and chlorophyll a fluorescence were carried out. The atrazine herbicide application, without the nanoparticles, decreased the parameters of gas exchange and fluorescence of chlorophyll a, which is an expected result due to the herbicide action mode. In addition to these analyses, chlorophyll autofluorescence was evaluated, which pointed to extensive degradation of the photosynthetic pigment, however, the NP ZnO addition was able to partially restore chlorophyll autofluorescence. By determining the MDA content it was verified that the plant did not suffer oxidative stress, a result that was also confirmed through the electrolyte leakage analysis, indicating that there was no excessive ROS production in the plants exposed to ATZ. The CAT enzyme showed greater activity in plants in the ATZ+NP treatment compared to plants exposed only to the herbicide, which may be related to other physiological processes, such as photorespiration. Furthermore, to verify the phytoremediation capacity of *E. crassipes*, an ecotoxicological assay with the planarian *G. tigrina* was carried out and it was verified that the plant was able to reduce the toxicity of the solution contaminated by ATZ in non-target organisms, giving *E. crassipes* a high phytoremediation potential.

Keywords: Water hyacinth; Bioassays; Herbicide; Macrophyte; Environmental decontamination.

1 INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos intensificou-se a partir dos anos 1960 e estendeu pelo Brasil pela alta demanda nas produções agrícolas, que cresciam em decorrência do aumento populacional (FROTA *et al.*, 2021). Nesse contexto, o uso de herbicidas, fungicidas, inseticidas e outros agrotóxicos foram inseridos para que as culturas não fossem afetadas pelas pragas e perdessem rendimento, elevando a lucratividade e reduzindo as perdas (PETARLI *et al.*, 2019). Embora o uso de produtos para o controle de pragas apresente vários benefícios, não há como negar que o uso intenso e periódico de agrotóxicos causam vários problemas no meio ambiente, desde a degradação do solo e da água até a contaminação de organismos aquáticos e terrestres, ocasionando a morte de populações afetadas pelo uso destes produtos (LOPES *et al.*, 2021).

Dentre os principais agrotóxicos utilizados no Brasil, destaca-se aqui a Atrazina (ATZ). Desde seu lançamento no mercado, a ATZ tornou-se um herbicida muito popular, sendo um dos principais herbicidas utilizados em países como China, Estados Unidos da América e Brasil, por sua alta eficiência e baixo custo (BARCELLOS *et al.*, 2022). Apesar disso, sua alta toxicidade e elevada persistência ambiental tem levado diversos países a restringirem o seu uso (HE *et al.*, 2019). Ainda assim, ATZ é o herbicida mais comumente encontrado em águas superficiais em todo o mundo (SOUZA *et al.*, 2020). Fato é, que no Brasil, esse herbicida tem sido detectado em diversos locais, como na cidade de Primavera do Leste – MT, em que foi analisado o risco de contaminação por pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na região. A partir dos resultados obtidos, o herbicida ATZ foi detectado com maior frequência nas águas superficiais e subterrâneas e apresentou-se entre os que possuíam maior persistência no solo, com duração de um a seis meses (DORES *et al.*, 2001). O caso de Primavera do Leste não é um fato isolado no Brasil. Com efeito, no estado do Ceará foi constatada através de análises cromatográficas a presença de ATZ em 60% das amostras de águas superficiais coletadas nos dez principais reservatórios do estado, em níveis de até $15,0 \mu\text{g L}^{-1}$, quando o limite máximo de resíduo de ATZ estabelecido pelo Ministério da Saúde é de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ (SOUSA *et al.*, 2016). Outro estudo realizado na região sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, investigou a presença de agrotóxicos em três bacias hidrográficas, e a ATZ foi detectada na concentração de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ uma ou mais vezes em amostras de água superficial coletadas durante o período de safra (BORTOLUZZI *et al.*, 2007). Já em Brasília, no

Distrito Federal, a ATZ foi detectada em todas as amostras coletadas de água potável (SODRÉ *et al.*, 2018).

O consumo de água contaminada com ATZ causa uma série de problemas à saúde humana. Em Ohio (EUA), foi analisada de 2006 a 2008 a relação entre a exposição à ATZ durante a gravidez e os resultados adversos ocorridos no parto em comunidades que utilizam o sistema de abastecimento público de água. Durante esse período, Almberg *et al.* (2018) constataram que houve aumento nas chances de nascimentos de baixo peso dos fetos que foram expostos à ATZ durante toda a gestação. Além do mais, os resultados sugeriram que, quando expostos ao herbicida entre o primeiro e segundo trimestre de gravidez, poderiam ocorrer efeitos tóxicos mais graves ao feto, implicando que o valor atual permitido para atrazina, de acordo com o nível máximo de contaminante (MCL) permitido em água potável nos EUA ($3 \mu\text{g L}^{-1}$), pode não ser protetor contra alguns resultados adversos do nascimento.

Além da saúde humana, alta concentração de ATZ na água também pode comprometer a conservação da biodiversidade. Neste contexto, há estudos que reportam ATZ como potencial desregulador endócrino quando analisado seus efeitos a longo prazo em anfíbios adultos e machos expostos a concentração de $2,5 \text{ mg g}^{-1}$. Esses animais, em decorrência da exposição ao herbicida, foram castrados quimicamente, ocorrendo diminuição da espermatogênese e da fertilidade (BARCELLOS *et al.*, 2022). Da mesma forma, para organismos aquáticos como as microalgas, a ATZ pode agir como agente modificador de crescimento e de processos enzimáticos, além de afetar o processo fotossintético em plantas superiores e induzir o estresse oxidativo (ROSTAMI *et al.*, 2021). Cabe ressaltar, ainda, que mesmo a concentração de ATZ permitida na água pela legislação brasileira causa efeitos letais em organismos aquáticos, de forma que o limite de ATZ permitido pela legislação pode não ser seguro para a conservação da biodiversidade (De Albuquerque *et al.*, 2021). Esse fato ressalta a importância de se analisar o impacto da água contaminada com ATZ em organismos bioindicadores, como é o caso das planárias (*Girardia tigrina*) as quais tem sido apontada em diversos estudos como sendo eficazes para monitorar a qualidade de ecossistemas aquáticos (LÓPEZ *et al.*, 2019; SIMÃO *et al.*, 2022; DORNELAS *et al.*, 2021).

Diante desse quadro, torna-se essencial o desenvolvimento de estratégias e ferramentas que permitam a remoção eficiente da ATZ da água. Atualmente, existem diversos tratamentos químicos e físicos capazes de descontaminar a água e o solo com

ATZ. Pesquisas são realizadas com propostas e métodos mitigadores que promovam a restauração e despoluição destes ambientes. No recente estudo de Inticher *et al.* (2021) foi investigada a eficiência do processo fotoeletro-Fenton baseado no anodo de diamante dopado com boro para degradar uma mistura de pesticidas de diferentes grupos. Embora seja uma alternativa que apresente resultados, torna-se uma técnica de alto custo quando comparada a outros métodos. Métodos mais populares para a degradação da ATZ é através da degradação microbiana (LIN *et al.*, 2008), entretanto sua aplicação precisa ser bem controlada para que o uso dos microrganismos não cause desequilíbrio. Há outros métodos como o uso de fotólise que utiliza a radiação de luz para quebrar diversos pesticidas, e o uso do biochar que é como um método de remediação ambiental que pode absorver poluentes orgânicos (ROSTAMI *et al.*, 2021). Outra técnica muito utilizada é a biorremediação, que consiste na remoção ou conversão de contaminantes nocivos em substâncias menos danosas, empregando biomassa morta ou viva (KAPAHI, 2019). A fitorremediação está inserida dentro da biorremediação e consiste no uso de plantas que degradam e retiram poluentes orgânicos e inorgânicos de ambientes poluídos (LAMEGO *et al.*, 2007). Na fitorremediação as plantas atuam como um sistema de transformação para metabolizar compostos orgânicos, como os agroquímicos, podendo também absorver e bioacumular os contaminantes (KHARAYAT, 2012) (PIRES *et al.*, 2013). Dentre diversas espécies que possuem características de fitorremediação, a *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms é o destaque neste estudo.

A espécie *E. crassipes* (aguapé) pertence à Família Pontederiaceae (DOS SANTOS *et al.*, 2022). É uma espécie nativa da bacia amazônica da América do Sul, mas propagou-se globalmente atingindo continentes como o Africano e Asiático (ILO *et al.*, 2020). Na literatura, essa planta é citada como problemática por seu crescimento rápido em corpos d'água, podendo causar efeitos negativos naquele ambiente (THAMAGA *et al.*, 2018). Porém, estudos apontam esta espécie como potencial fitorremediadora de ambientes contaminados, com capacidade de acumular e remover de forma eficiente agrotóxicos da água (ALENCAR *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2021). Plantas de *E. crassipes* possuem raízes extensas e que são locais preferenciais de acúmulos de poluentes, sendo uma estratégia adotada pela planta para evitar que compostos tóxicos cheguem até a parte aérea, que podem afetar processos importantes como o aparato fotossintético (MENA MENDOZA *et al.*, 2019). Em relação à ATZ, num estudo realizado com a espécie *E. crassipes*, foi evidenciado que a espécie apresentou

mecanismos de fitoextração (a capacidade de compartimentalizar o herbicida dentro de seus tecidos), quando expostas a dosagem máxima de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ, dosagem essa que foi letal a planta aos 28 dias de exposição (DOS SANTOS *et al.*, 2022). Embora confirmado por Dos Santos *et al.* (2020) que a ATZ pode alterar diversos aspectos fisiológicos da planta como o crescimento, promover estresse abiótico, alterar seus parâmetros anatômicos, deve-se considerar que *E. crassipes* é capaz de desenvolver mecanismos de tolerância a esse contaminante, armazenar moléculas do herbicida em suas raízes e promover a fitorremediação do meio contaminado (WANG *et al.*, 2021).

Para que o processo de fitorremediação seja eficiente, além de absorver poluentes, as espécies vegetais também devem ser capazes de tolerar os danos ocasionados pelo composto tóxico (WEI *et al.*, 2021; YAN *et al.*, 2020; ALI *et al.*, 2020). Com efeito, se a planta for muito sensível ao poluente, o processo de fitorremediação fica comprometido, podendo, inclusive, ser completamente interrompido. No caso de ATZ, por exemplo, já foi observado que esse herbicida tem o mecanismo de ação baseado na inibição do Fotossistema II - FSII, que ocorre por intermédio da substituição da ligação da plastoquinona a com a plastoquinona b (Qb), que substitui a forma oxidada da plastoquinona e ocupa o local de ligação específico no acceptor Qb na proteína D1 (RIBEIRO *et al.*, 2019). Dessa maneira, a molécula da ATZ irá bloquear o fluxo de elétrons, inibindo a fotossíntese e aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Dessa forma, embora já tenha sido observado que *E. crassipes* é eficiente na fitoextração de ATZ, o próximo passo para a utilização eficiente e sustentável da planta para a fitorremediação ambiental consiste no desenvolvimento de estratégias capazes de aumentar a tolerância da planta ao herbicida, e evitaria a morte vegetal, permitindo a manutenção dos processos de extração. Uma alternativa interessante nesse sentido consiste na utilização de moléculas que estimulam o metabolismo vegetal, como é o caso das nanopartículas de óxido de zinco.

O zinco (Zn) faz parte dos micronutrientes necessários e fundamentais para o crescimento das plantas, além de desempenhar funções metabólicas importantes, como na síntese e na degradação de macromoléculas e na síntese de clorofila, atuando na regulação dos hormônios de crescimento de plantas (VITOSH *et al.*, 1998; GONDAL *et al.*, 2021; CABOT *et al.*, 2019). Os benefícios desencadeados pelo Zn nas plantas aumentam quando esse elemento é fornecido na forma de nanopartículas, uma vez que a sua nanoencapsulação permite maior absorção do elemento, além de liberação prolongada

ao longo do tempo (ADIL *et al.*, 2022). Em estudos comparativos de aplicação de nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) diretamente no solo e por via foliar foi verificado que a aplicação foliar é mais eficaz em promover alterações no metabolismo vegetal (ŠEBESTA *et al.*, 2021). Além disso, diferentes estudos têm constatado benefícios causados pelo uso das NPs ZnO nas plantas, na ausência ou não de estresses (XU *et al.*, 2018; PRAKASH *et al.*, 2022; GHANI *et al.*, 2022). As NPs ZnO já foram descritas como tendo a capacidade de diminuir o efeito de estresses ambientais nas plantas, tanto por fatores bióticos como abióticos, sendo que, quando em concentrações adequadas, aumentam o crescimento, a atividade de antioxidantes, a produção de proteínas, o teor de clorofila e fotossíntese (PULLAGURALA *et al.*, 2018). No estudo realizado por Prakash *et al.* (2022), por exemplo, os autores observaram que a adição de NPs ZnO reduziu a toxicidade de cromo e aumentou o crescimento em plântulas de arroz. Hussain *et al.* (2021), por sua vez, observaram que o tratamento de *Persicaria hydropiper* com NPs ZnO aumenta a capacidade da planta para fitorremediar ambientes com altas concentrações de chumbo. À vista disso, é possível que a administração de NPs ZnO em plantas submetidas ao poluente ATZ possa amenizar os danos provocados pelo herbicida na planta, embora as informações sobre esse processo sejam raras ou inexistentes.

Tendo como base o impacto que o ATZ causa em corpos hídricos, associado ao potencial fitorremediador de *E. crassipes*, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da aplicação de nanopartículas de óxido de zinco (NP ZnO) e o seu potencial em atenuar os danos causados nos processos fisiológicos de *E. crassipes* quando exposta ao herbicida. Testaram as seguintes hipóteses: *i*) *E. crassipes* tem potencial para fitorremediar a água contaminada com ATZ, tornando esse recurso menos danoso para organismos vivos; e *ii*) a adição de NP ZnO é capaz de atenuar os danos causados pelo herbicida ATZ na fisiologia de *E. crassipes*, com reflexos no processo de fitorremediação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Condições Experimentais

Espécimes de *E. crassipes* foram coletados no lago do Parque Walderes Souza de Oliveira localizado na cidade de Rio Verde – Goiás, Brasil (50° 57' 5.53" S de latitude; 17° 47' 10.41" O de longitude) e esterilizados com hipoclorito de sódio 1% durante 1 min, sendo então lavados em água corrente, seguido de água destilada. A partir de então, essas plantas foram mantidas por 6 meses em casa de vegetação para cultivo e reprodução,

sendo cultivadas em solução nutritiva de Clark (1975), $\frac{1}{4}$ da força iônica, pH 6,5, em casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos e Fisiologia Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, Rio Verde-GO.

Para o experimento foram utilizadas plantas jovens, obtidas pela reprodução das plantas coletadas no lago e, portanto, nunca expostas a poluentes. As plantas foram selecionadas uniformemente pelo peso e tamanho e foram submetidas aos seguintes tratamentos: T1 – solução nutritiva (controle); T2 – solução nutritiva + nanopartículas de óxido de Zinco – NP ZnO (10 mg L⁻¹); T3 – Atrazina (ATZ) (Nor-tox 500 SC[®], Araponga, PR, Brasil) (0,025 mg L⁻¹); T4 - ATZ + NP, com seis repetições. A concentração de ATZ utilizada nos tratamentos foi determinada a partir de um teste inicial de exposição a diferentes doses do herbicida. A exposição das plantas aos tratamentos foi realizada adicionando a solução em frascos com capacidade para 1L de solução, em seguida as plantas foram colocadas nos frascos, individualmente, e a aplicação das NP ZnO foi executada por aspersão via foliar. O pH da solução foi aferido a cada dois dias e, quando necessário, o pH foi corrigido para 6,5 e a solução experimental foi repostada. Um tratamento extra, sem plantas, contendo apenas solução nutritiva + ATZ (0,025 mg L⁻¹) também foi submetido as mesmas condições que os demais tratamentos. Ao 15º dia (final do experimento), foram realizadas as avaliações descritas a seguir. Além disso, foi realizada a coleta de solução contida em cada um dos tratamentos, incluindo o recipiente com solução nutritiva e ATZ (sem passar pelo processo de fitorremediação) para as análises ecotoxicológicas com as planárias *G. tigrina*.

2.2 Determinação de Pigmentos Fotossintéticos

2.2.1 Teor de pigmentos por DMSO

O teor de pigmentos foi determinado por meio da extração com dimetilsulfóxido (DMSO), saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃). Aproximadamente cinco 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, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de ondas: 665 nm para a determinação o teor de clorofila *a*, 649 nm para clorofila *b*, 480 nm para valores de carotenoides. 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, razão clorofila *a/b*, teores de carotenoides e razão clorofila total/carotenoides foram calculados com base nas equações:

$$\text{Clorofila } a = (12,47 \times A665) - (3,62 \times A649);$$

$$\text{Clorofila } b = (25,06 \times A649) - (6,5 \times A665);$$

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

$$\text{Carotenoides} = (1000 \times A480) - (1,29 \times \text{clorofila } a) - (53,78 \times \text{clorofila } b) / 220.$$

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

A concentração dos pigmentos foi calculada empregando as equações propostas por Arnon (1949) e os resultados expressos em mg g^{-1} MF.

2.2.2 Autofluorescência da clorofila

Os estudos de microscopia de fluorescência foram realizados 15 dias após início da exposição, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, Rio Verde, Goiás, 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 instantaneamente fotografadas para evitar a degradação da clorofila.

2.3 Avaliações fisiológicas

A taxa de assimilação líquida do carbono (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a transpiração (E , $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram obtidas utilizando um analisador automático de fotossíntese, IRGA, modelo LI-6400XTR (Licor[®], Nebraska, Estados Unidos) com temperatura do bloco de 24°C e densidade de fluxo de fótons igual a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, entre 08h e 11h usando uma folha da planta totalmente expandida. Foi realizado o cálculo da razão eficiência de carboxilação (A/C_i) e a relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a).

Além disso, também foi averiguado em folhas aclimatadas a luz actínica (1000 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) utilizando o analisador automático de fotossíntese, IRGA, a fluorescência transiente (F_s), seguido por um pulso de luz saturante para estimar a fluorescência máxima à luz (F_m') e, por último, aplicou-se um pulso de luz vermelho-distante, para obter a fluorescência mínima após aclimação à luz actínica (F_0'). Com

esses parâmetros, foram calculados os coeficientes de extinção fotoquímica (qP), a eficiência fotoquímica do transporte de elétrons associado ao fotossistema II (Φ_{FSII}) (MAXWELL *et al.*, 2000), ao passo que o coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) foi calculado segundo Bilger *et al.* (1990).

A respiração noturna (R_N), foi avaliada antes do amanhecer utilizando também com o analisador de gases à infravermelho. Além disso, 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 a partir desses valores, e calculado o rendimento qu\u00e2ntico potencial do fotossistema II (F_v/F_m).

2.4 Avalia\u00e7\u00e3o da Ocorr\u00eancia de Danos \u00e0s Membranas Celulares

2.4.1 Avalia\u00e7\u00e3o da Peroxida\u00e7\u00e3o Lip\u00eddica

O dano oxidativo nas membranas celulares foi estimado pela quantifica\u00e7\u00e3o de subst\u00e2ncias reativas ao \u00e1cido 2-tiobarbit\u00farico (TBA) e expresso na forma de malondealde\u00eddo (MDA) (Cakmak e Horst, 1991). Para isso, macerou-se aproximadamente 0,25g de tecidos foliares com o aux\u00edlio de nitrog\u00eanio l\u00edquido, sendo o tecido homogeneizado em 2ml de solu\u00e7\u00e3o contendo 0,1% (p/v) de \u00e1cido tricloroac\u00e9tico (TCA) em conjunto com 20% de polivinilpirrolidona (PVPP). O homogenato foi ent\u00e3o centrifugado a $15.000 \times g$ por 15 min a 4°C . Uma al\u00edquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 1,5 mL de 0,5% de \u00e1cido 2-tiobarbit\u00farico (TBA) (preparado em 20% de TCA). As amostras foram homogeneizadas e a rea\u00e7\u00e3o colorim\u00e9trica conduzida a 90°C por 20 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a $15000 \times g$ por 15 min a 4°C . A leitura da absorv\u00eancia das amostras foi determinada em espectrofot\u00f4metro a 532 nm e 660 nm. A peroxida\u00e7\u00e3o de lip\u00eddios foi estimada como conte\u00fado total de subst\u00e2ncias reativas ao TBA e expressa como equivalentes de MDA. O coeficiente de extin\u00e7\u00e3o molar do MDA ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi utilizado para os c\u00e1lculos e os resultados expressos como nmol de MDA g^{-1} MF.

2.4.2 Extravasamento de eletrólitos

A fim de estimar a estabilidade das membranas celulares, foram coletados de cada planta dos respectivos tratamentos aproximadamente cinco discos foliares com diâmetro de 5 mm lavados previamente, por duas vezes em água deionizada. A seguir, os referidos discos foram acondicionados em frascos de 30 mL com de água deionizada e mantidas à temperatura ambiente por 24 h. A condutividade inicial foi avaliada com o condutímetro, após esse período. Posteriormente as amostras foram mantidas na estufa a 90°C por 1 h, e em seguida a leitura foi feita novamente a fim de obter o extravasamento máximo.

2.5 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 superóxido dismutases (SOD), peroxidases (POX), e catalases (CAT) (PEIXOTO *et al.*, 1999);

Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 x g por 15 min, a 4°C, para as enzimas SOD, POX e 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-nitro tetrazólio (NBT) 75 µm, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µm, para SOD (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977);

- Tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 2 mM, para POX (PEIXOTO *et al.*, 1999);

- Tampão fosfato de potássio 50 mM e H₂O₂ 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 fotorredução 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, ϵ : 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹), CAT (240 nm, ϵ : 36 M⁻¹ cm⁻¹) (PEIXOTO *et al.*, 1999).

2.6 Ensaio Ecotoxicológico com a planária *G. tigrina*

Para avaliar a qualidade da água que passou por fitorremediação, organismos de *G. tigrina* foram utilizados como potenciais bioindicadores. Para isso, foram utilizadas as soluções que foram fitorremediadas. 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. A cultura foi estabelecida a partir de culturas do Laboratório de Ecotoxicologia do Grupo de Pesquisa em Ecologia Funcional e Aplicada da Universidade Federal de Tocantins – Campus Gurupi. As planárias foram cultivadas em meio de cultura ASTM, alimentadas uma vez por semana com fígado bovino, com troca do meio de cultura nos moldes do protocolo ASTM - American Society for Testing and Materials (ASTM, 1980), temperatura constante de 22 ± 1°C.

A toxicidade subletal das soluções contendo ATZ, que passaram ou não pela fitorremediação, foram avaliadas por meio de testes conduzidos em recipientes de Poli Tereftalato de Etila (PET), contendo 20 mL de solução experimental. Cada tratamento foi composto por três réplicas, cada uma contendo quatro planárias. Foram utilizadas planárias de 1,0 ± 0,2 cm de comprimento total. As planárias foram submetidas às soluções, após 15 dias de tratamento com *E. crassipes*. Dessa forma, as planárias foram expostas a seis condições diferentes, sendo: i) ASTM - American Society for Testing and Materials: Meio de cultivo que as planárias estão ambientadas; ii) CT: Apenas solução nutritiva; iii) CT + NP: Solução nutritiva, cujas plantas foram tratadas com nanopartículas de óxido de zinco; iv) ATZ: Solução nutritiva contendo atrazina, a qual foi fitorremediada por *E. crassipes*; v) ATZ + NP: Solução nutritiva contendo atrazina, a qual foi fitorremediada por *E. crassipes* tratada com nanopartículas de óxido de zinco; vi) Como controle negativo, as planárias também foram submetidas à solução (ATZ CT) contendo ATZ mas que não passaram por fitorremediação.

Ademais, para os ensaios crônicos de 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 ± 1°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 foi avaliada a capacidade regenerativa conforme descrito abaixo.

2.6.1 Atividade de capacidade regenerativa

Ensaio de regeneração foi feito de acordo com Pearl *et al.* (2016) com algumas adaptações. Assim, após sete dias de exposição às respectivas soluções experimentais, 12 planárias por 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 solução experimental. A formação de quimiorreceptores e fotorreceptores foram avaliadas em dias até a sua completa formação, ao passo que anormalidades foram observadas, com auxílio de um microscópio estereoscópio.

2.7 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente ao acaso, com seis repetições. A homogeneidade dos dados foi verificada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo os dados submetidos à ANOVA e as médias calculadas pelo teste SNK (Student Newman Keuls), a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Sisvar e os gráficos foram feitos utilizando o software R.

Para ensaios de regeneração os dados foram analisados por estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Dunns. Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism, versão 7.0, para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 Teor de pigmentos fotossintéticos

A ATZ é um herbicida com potencial para afetar o FSII e prejudicar a planta de diversas formas. Embora seja um herbicida com grande potencial de degradação, em *E. crassipes* é possível analisar que nos carotenoides não foi evidenciado diferença significativa entre os tratamentos CT e ATZ, entretanto, entre os tratamentos CT e ATZ + NP apresentou aumento significativo. Quanto a clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e

a razão entre clorofila a e b não obtiveram alterações dentre os tratamentos, não apresentando diferença significativa comparados ao controle (Fig. 1).

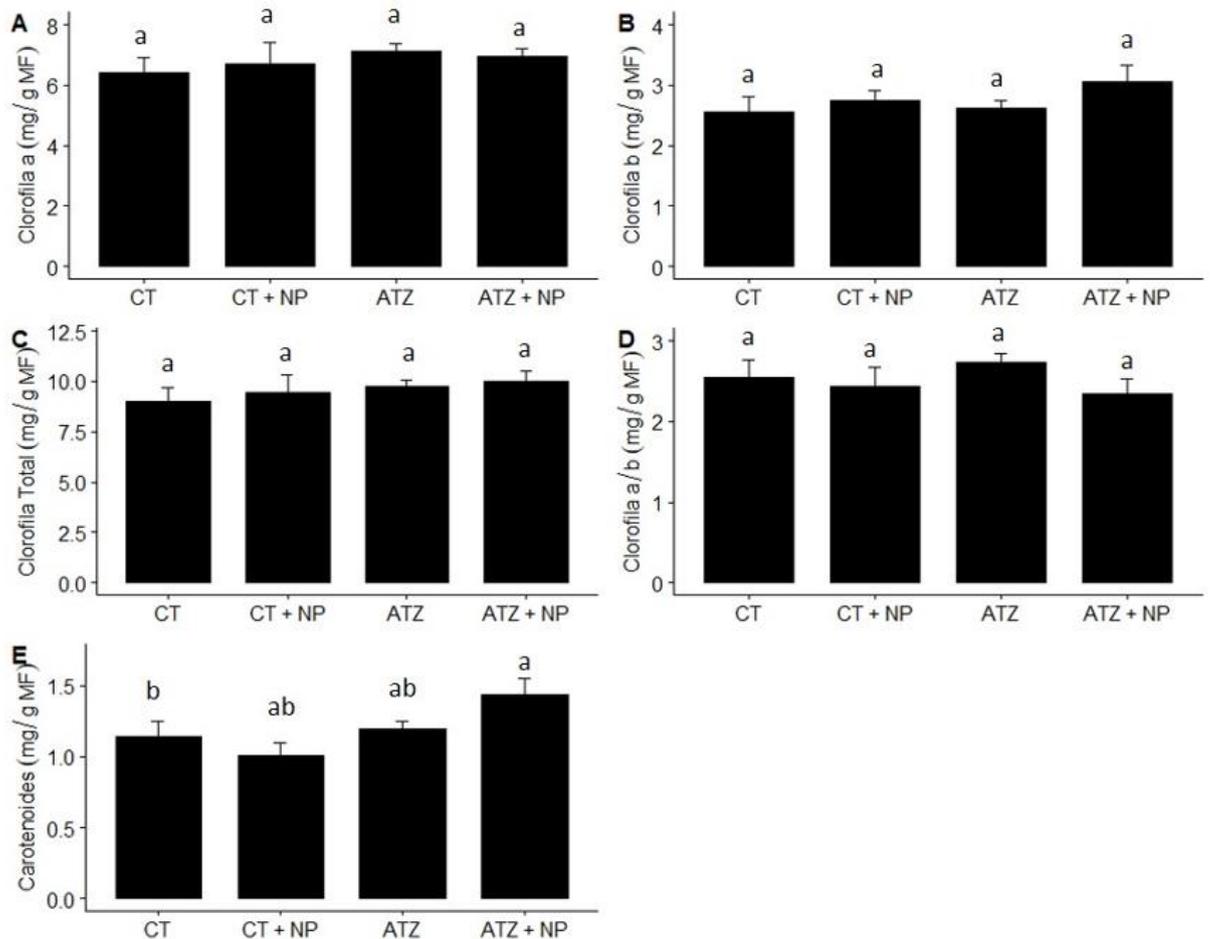


Figura 1: Clorofila a (A), Clorofila b (B), Clorofila total (C), Clorofila a/b (D) e Carotenoides (E), em folhas de *E. crassipes* com e sem a aplicação do herbicida atrazina ($0,025 \text{ mg L}^{-1}$) na presença e ausência de NP ZnO (10 mg L^{-1}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

3.2 Autofluorescência da clorofila

Na Fig. 2 estão representados os resultados de autofluorescência da clorofila obtidos em plantas de aguapé submetidas aos tratamentos. É possível observar que, nas plantas expostas apenas ao herbicida, ocorreu intenso decréscimo na emissão de fluorescência, indicando queda abrupta na concentração de clorofila em comparação com os controles (Fig. 2C). Nas plantas submetidas ao herbicida em combinação com as NPs ZnO a autofluorescência da clorofila não foi tão intensa quanto o observado no controle, mas foi maior do que nas plantas expostas apenas à ATZ (Fig. 2D).

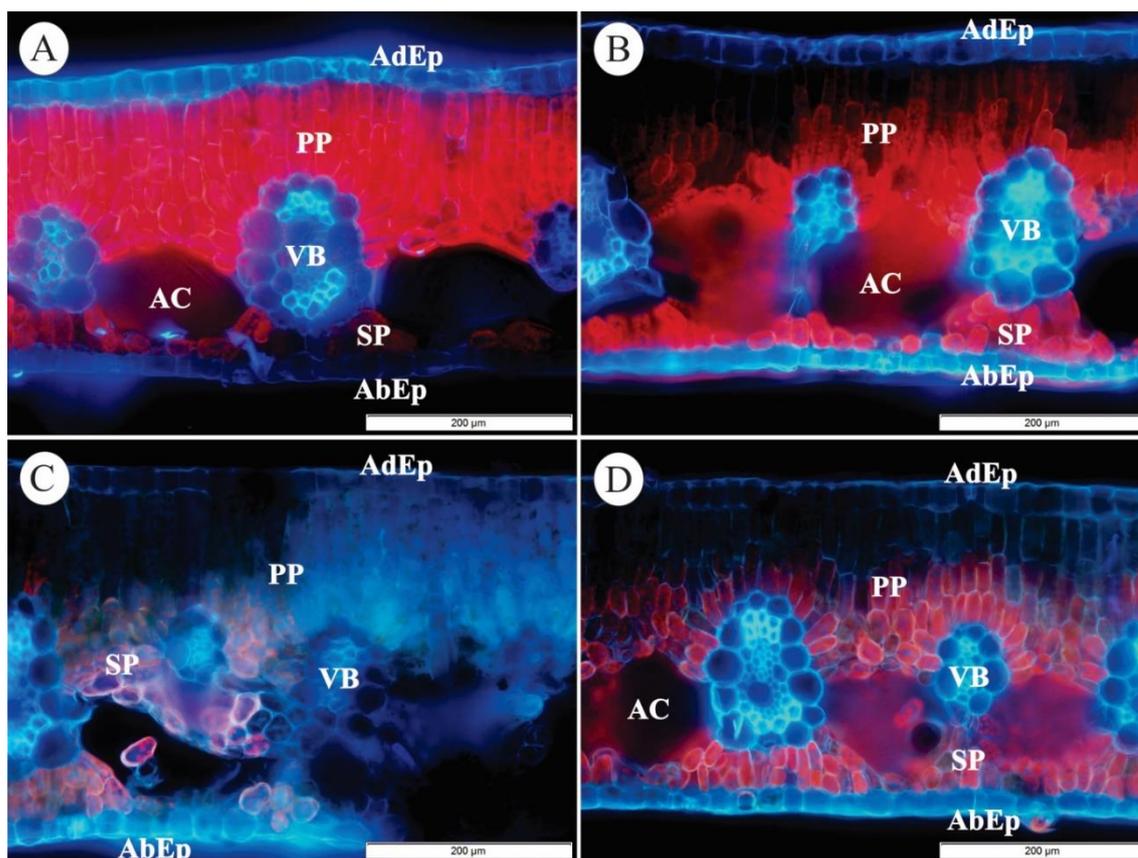


Figura 2: Autofluorescência da clorofila (450-490nm). Cloroplastos do mesofilo (Parênquima paliçádico e esponjoso) emitem fluorescência vermelha típica do pigmento clorofila. (A) Controle, (B) Controle com nanopartículas de óxido de zinco, (C) Tratamento com atrazina ($0,025 \text{ mg L}^{-1}$), (D) Tratamento com atrazina ($0,025 \text{ mg L}^{-1}$) e com adição de NP ZnO (10 mg L^{-1}). Áreas sem a cor vermelha, típica emitida pelos cloroplastos, representam degradação da clorofila. (AdEp) epiderme adaxial. (AbEp) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (VB) feixe vascular. (AC) aerênquima. (SP) parênquima esponjoso. Barras de escala: $200 \mu\text{m}$.

3.3 Avaliações fisiológicas

Os resultados referentes as avaliações fisiológicas demonstram que o poluente não desencadeou alterações no rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m , Fig. 3A), na razão entre a fluorescência mínima e a fluorescência máxima (F_0/F_m , Fig. 3B) e no quenching não fotoquímico (NPQ, Fig. 3C). A aplicação do herbicida ATZ afetou o rendimento quântico efetivo do FSII (Φ_{FSII}) e o quenching fotoquímico (qP) (Fig. 3D-E). Em contrapartida, a aplicação das NPs ZnO manteve esses parâmetros similares ao controle mesmo diante na presença do herbicida.

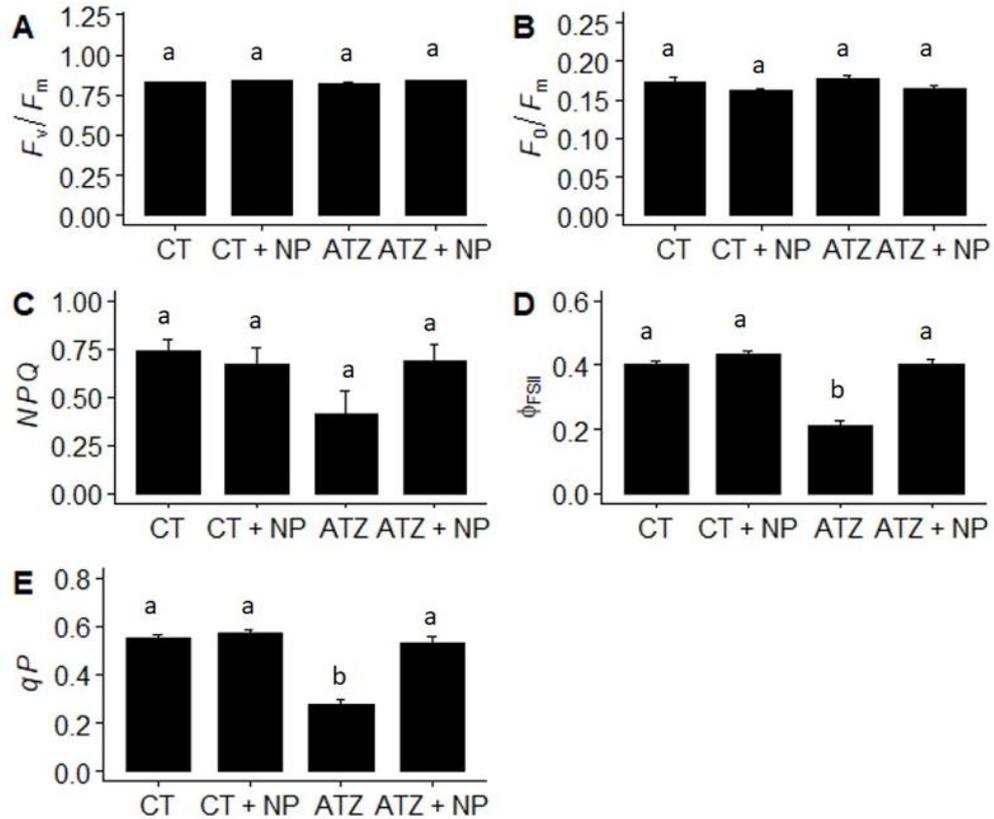


Figura 3: Rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m - A), razão entre a fluorescência mínima e a fluorescência máxima (F_0/F_m - B), coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ - C), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII} - D), quenching fotoquímico (qP - E), em folhas de *E. crassipes* com e sem a aplicação do herbicida atrazina na presença e ausência de np ZnO. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

A exposição da planta ao ATZ também afetou os parâmetros de trocas gasosas, os quais refletem a segunda etapa do processo fotossintético. Decréscimo significativo foi evidente no tratamento contendo apenas ATZ para a assimilação líquida de carbono (A, Fig. 4A). Para as variáveis condutância estomática (g_s , Fig. 4B) e a taxa transpiratória E (Fig. 4C), os valores apresentados pelos tratamentos mantiveram-se iguais ao controle. Quando analisado a relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a , Fig. 4D), maiores valores foram evidentes somente para o tratamento com aplicação da ATZ sem a adição de nanopartículas, enquanto a eficiência de carboxilação (A/C_i , Fig. 4E) diminuiu nesse mesmo tratamento. A aspersão de NPs ZnO nas folhas de *E. crassipes*, no entanto, foi capaz de impedir a ocorrência de danos ao processo fotossintético, sendo que todas as variáveis foram mantidas similares ao controle.

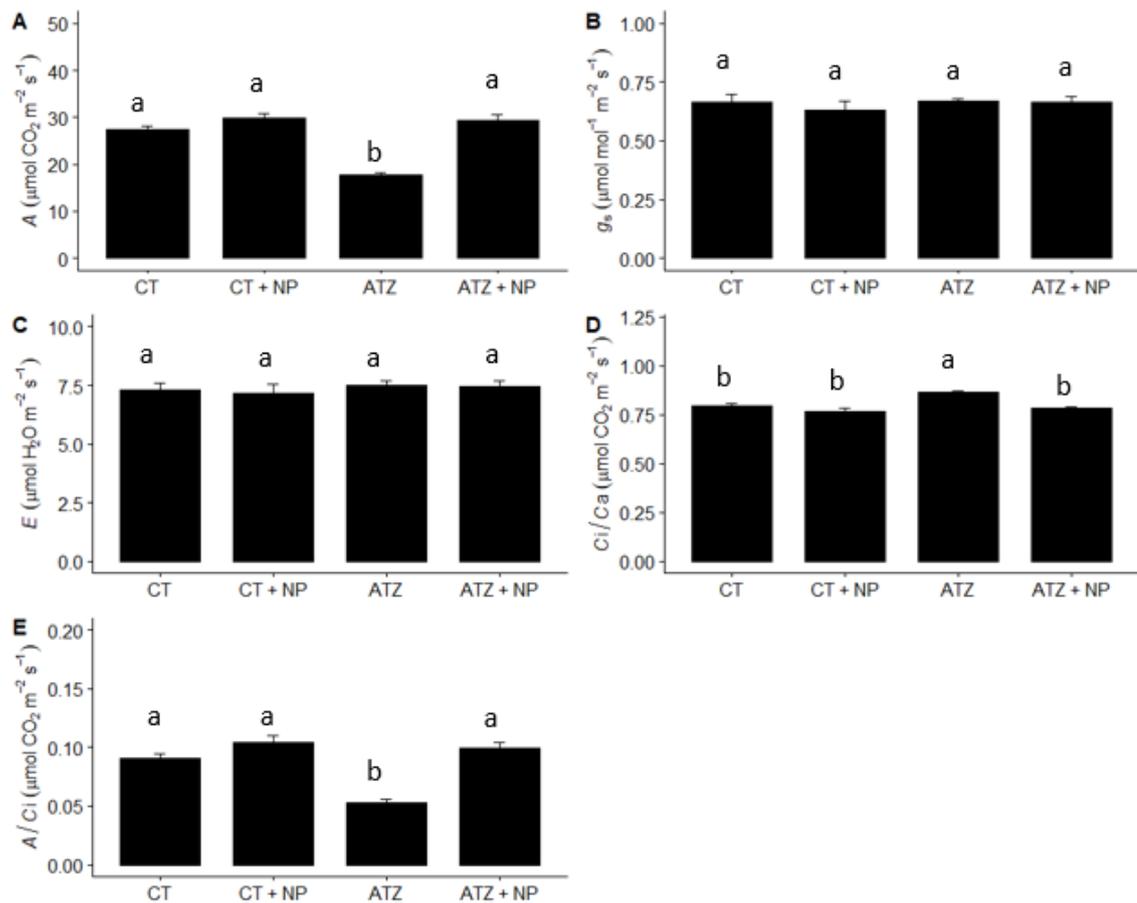


Figura 4: Taxa de assimilação líquida de carbono (A – A), condutância estomática (g_s – B), taxa transpiração (E – C), relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a – D) e eficiência de carboxilação (A/C_i – E), em folhas de *E. crassipes* com e sem a aplicação do herbicida atrazina, na presença e ausência de NP ZnO. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

Em relação à respiração noturna, apresentada na Figura 5, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

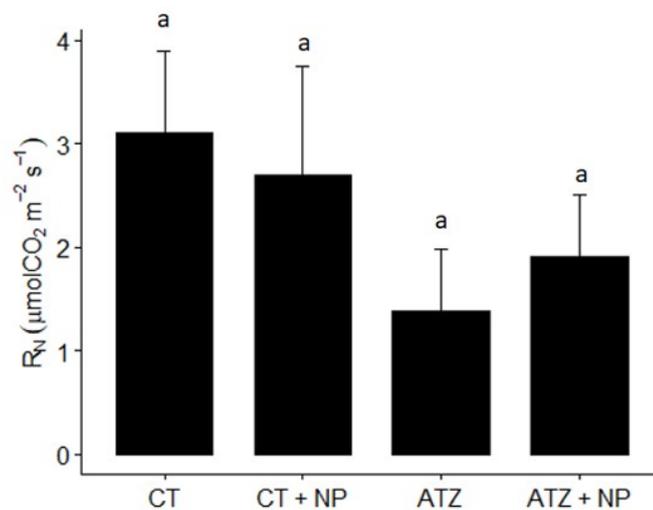


Figura 5: Respiração noturna (R_N) em folhas de *E. crassipes* com e sem a aplicação do herbicida atrazina na presença e ausência de NP ZnO. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

3.4 Avaliação da ocorrência de danos às membranas celulares

A avaliação de peroxidação lipídica é indicador importante que marca os danos oxidativos nas plantas. Entretanto, como evidenciado na Fig. 6 não houve diferença significativa entre os tratamentos. De forma similar ao observado para o MDA, os dados obtidos na análise de extravasamento de eletrólitos não diferiram em nenhum dos tratamentos analisados (Fig. 7).

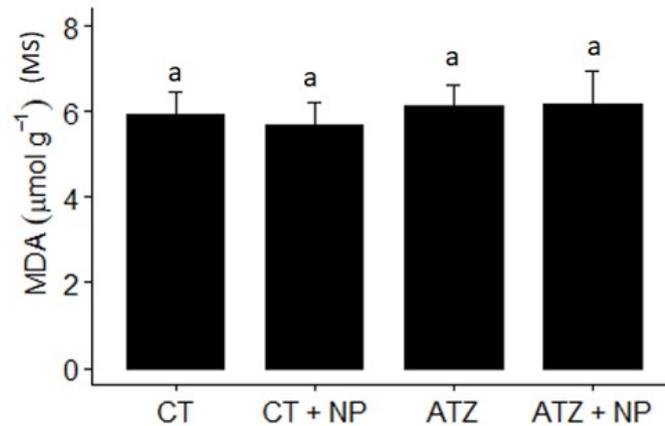


Figura 6: Concentração de aldeído Malônico (MDA) em folhas de *E. crassipes* com e sem a aplicação do herbicida atrazina ($0,025 \text{ mg L}^{-1}$) na presença e ausência de NP ZnO (10 mg L^{-1}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

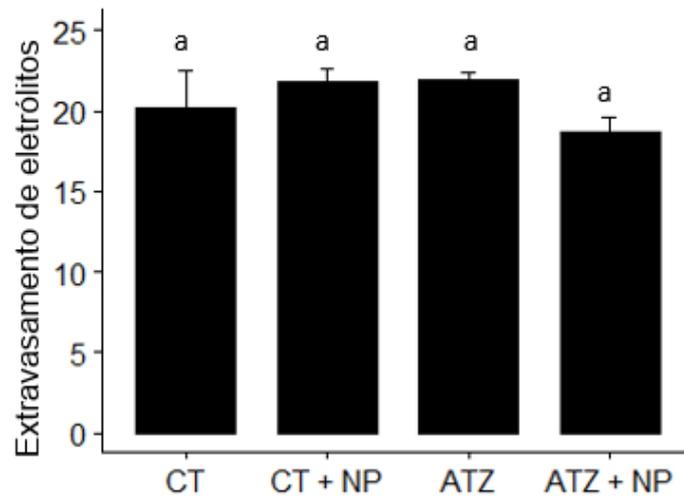


Figura 7: Extravasamento de eletrólitos em folhas de *E. crassipes* com e sem a aplicação do herbicida atrazina ($0,025 \text{ mg L}^{-1}$) na presença e ausência de NP ZnO (10 mg L^{-1}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

3.5 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Em relação às enzimas antioxidantes, observou-se alteração apenas na atividade da enzima CAT (Fig. 8A), que foi maior no tratamento ATZ+NP em comparação com o tratamento contendo apenas o herbicida. As demais enzimas analisadas permaneceram estatisticamente iguais ao controle (Fig. 8B e C).

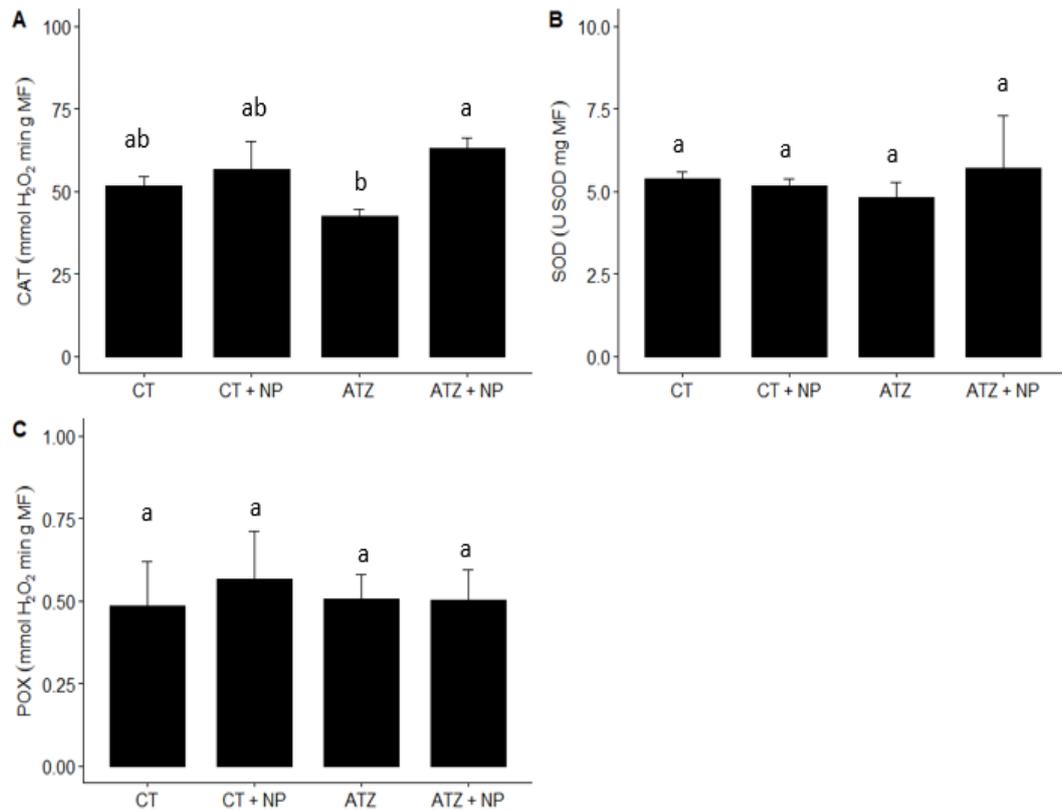


Figura 8: Catalase (CAT) (A), Superóxido Dismutase (SOD) (B), Peroxidase (POX) (C), em folhas de *E. crassipes* com e sem a aplicação do herbicida atrazina ($0,025 \text{ mg L}^{-1}$) na presença e ausência de NP ZnO (10 mg L^{-1}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

3.6 Ensaio ecotoxicológico com *G. tigrina*

3.6.1 Atividade de regeneração

Como resultado dos diferentes tratamentos, as planárias expostas ao herbicida ATZ não sofreram atraso significativo na regeneração dos fotorreceptores (océolos) Fig. 9A em comparação com o tratamento controle (ASTM). Na Fig. 9B a regeneração dos quimiorreceptores (aurículas) foi significativamente retardada no tratamento ATZ*, e a água em que as planárias foram expostas não passou pela fitorremediação com as plantas *E. crassipes*. Não foi observado retardo da capacidade regenerativa de planárias nos demais tratamentos.

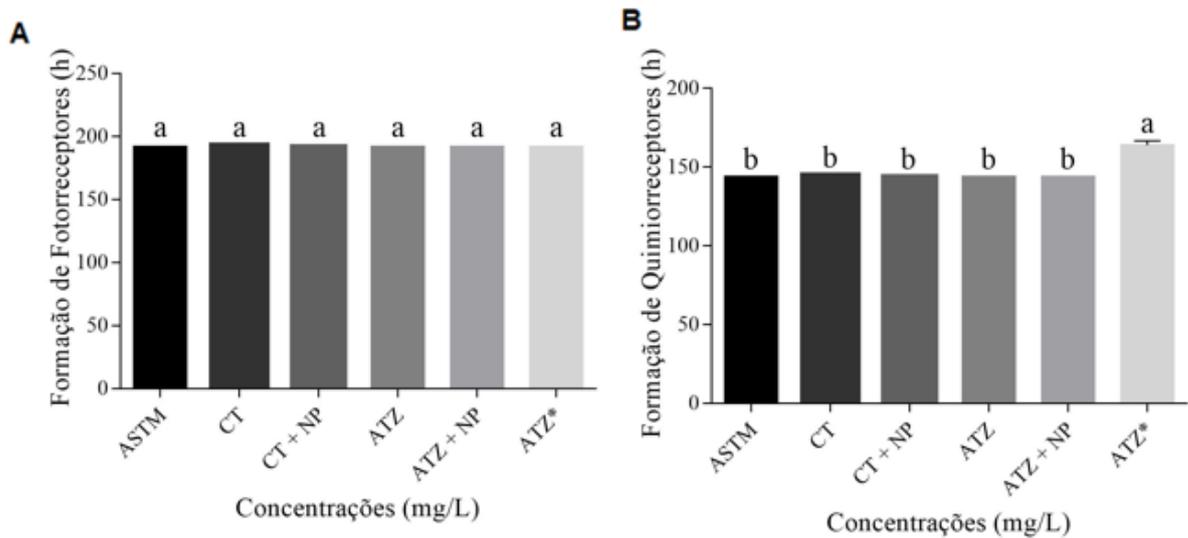


Figura 9: Efeitos de concentrações do herbicida ATZ em tratamento com água fitorremediada e não fitorremediada na regeneração de *G. tigrina*. Regeneração de fotorreceptores (A). Regeneração dos quimiorreceptores (aurículas) (B). As concentrações referem-se as concentrações do herbicida ATZ (0,025 mg L⁻¹) na presença e ausência de NP ZnO (10 mg L⁻¹). O tempo de exposição total foi de 15 dias. Diferenças significativas são observadas em comparação com o tratamento controle ASTM (teste post hoc de Dunns).

4 DISCUSSÃO

A fitorremediação é uma técnica ambientalmente amigável, que consiste na utilização de plantas para descontaminar o solo, ar e/ou água (SALT *et al.*, 1995). Essa técnica ocorre através de processos como a degradação, acumulação, dissipação e imobilização de contaminantes, sendo que mais de um desses mecanismos pode ocorrer, a depender do tipo de contaminante e da espécie vegetal (JADIA *et al.*, 2009). No presente estudo observaram que *Eichornnia crassipes* é capaz de realizar a fitorremediação da água contaminada com ATZ, tornando-a menos tóxica para o organismo bioindicador *Girardia tigrina*. Apesar disso, os processos fisiológicos de *E. crassipes* foram muito afetados pela presença do herbicida, e pode limitar o tempo de emprego das espécies para a fitorremediação. A adição de NP ZnO, no entanto, atenuou os efeitos tóxicos da ATZ, permitindo a essas plantas manter os processos de fixação de CO₂.

Um dos danos desencadeados pela ATZ nas plantas consiste na redução na síntese de clorofila *a* (Mofeed e Mosleha 2013), de forma que decréscimos na concentração desse pigmento são considerados bons indicadores de susceptibilidade ao herbicida (Pavlovic *et al.*, 2006; Kabra *et al.*, 2014). Esse efeito tóxico da ATZ foi observado nas plantas de *E. crassipes* expostas ao poluente, uma vez que as imagens de autofluorescência da clorofila apontaram para extensa degradação do pigmento

fotossintético (Fig. 2). A adição de NP ZnO, no entanto, foi capaz de restaurar, ainda que parcialmente, a autofluorescência da clorofila, indicando que essas nanopartículas foram eficientes em diminuir a toxicidade do poluente. Embora não tenham sido avaliadas nesse estudo, é possível que a adição de NP ZnO tenha aumentado a compartimentalização do poluente, tanto no vacúolo quanto nas paredes celulares, que diminuiria a sua livre circulação pela célula vegetal e diminuiria a ocorrência de danos (Hübner e Haase, 2021). É interessante observar que, embora diferenças tenham sido observadas na autofluorescência, não foram observadas alterações na concentração de clorofilas pelo método da extração com DMSO (Fig. 1), e, provavelmente se deve a diferença de sensibilidade entre as técnicas. De forma similar, Pavlovic *et al.*, (2006) também não observaram correlação entre a concentração de clorofila extraída com solventes químicos (extração com N,N-Dimetilformamida (DMF)) e a autofluorescência.

Foi possível notar o aumento na quantidade de carotenoides produzidos pelas plantas no tratamento ATZ+NP e esse fator pode ser relacionado como estratégia de defesa de *E. crassipes*. Com efeito, os carotenoides podem ser importantes para dissipar o excesso de luz absorvida, impedindo a ocorrência de danos aos fotossistemas, além de serem moléculas antioxidantes (STREIT *et al.*, 2005). Outro ponto importante dos pigmentos acessórios (carotenoides), é que eles são eficientes sequestradores de radicais livres que protegem o centro de reação (BRAIN *et al.*, 2012), e o aumento dos carotenoides no tratamento ATZ + NP pode ter favorecido a proteção da planta ao herbicida ATZ pois estão envolvidos na proteção dos pigmentos fotossintéticos (MARDI *et al.*, 2022).

A fotossíntese é fundamental para as plantas, pois é através dela que a planta obtém energia para seu crescimento e desenvolvimento. Dessa forma, quedas na fotossíntese podem desencadear o comprometimento de diversos outros processos do metabolismo vegetal. Os valores de fluorescência podem determinar o fluxo de transferência de elétrons e os dados de F_v/F_m fornecem uma estimativa da eficiência quântica potencial da atividade fotoquímica do FSII, utilizada para identificar desordens no sistema fotossintético provocadas por algum estresse, dado que a queda desse parâmetro pode indicar inibição da atividade fotoquímica (KONRAD *et al.*, 2005). No presente estudo, os dados de F_v/F_m não se alteraram em nenhum dos tratamentos (Fig. 3). Plantas de *E. crassipes* expostas por sete dias a dose de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ demonstraram resultados de F_v/F_m inferiores ao controle, podendo relacionar esse resultado à capacidade dessas concentrações em reduzir a eficiência de conversão

fotoquímica do FSII e acionar condições de estresse para as plantas (DOS SANTOS *et al.*, 2022). Comparando esses resultados é possível ver que um fator de atenção é a dosagem do herbicida aplicada no tratamento, visto que a dose pode interferir nos resultados de queda ou manutenção de determinados valores dos parâmetros avaliados, mesmo em período razoavelmente curto, de sete dias.

Neste estudo foram observadas alterações nos valores de rendimento quântico efetivo do FSII (Φ_{FSII}) e esse decréscimo acarretou diretamente na diminuição da taxa fotossintética (A) de *E. crassipes* submetidas ao ATZ, visto que, este herbicida age diretamente no FSII (BAI *et al.*, 2015), que também irá refletir em quedas na fixação de CO_2 (DEBLOIS *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2021). A redução de Φ_{FSII} no tratamento com ATZ foi pelo modo de ação deste composto, que se liga ao nicho de ligação Q_B na proteína D1 do FSII, bloqueando a cadeia de transporte de elétrons fotossintética e impedindo a transferência de energia de excitação de FSII para o centro de reação FSII (MAJEWSKA *et al.*, 2018). Também ocorreu queda no quenching fotoquímico (qP) no tratamento ATZ, demonstrando a ação inibitória do herbicida no FSII, aumentando a proporção de centros de reação do PSII fechados, causando a diminuição na proporção da energia de excitação disponível usada para a fase fotoquímica (SHER *et al.*, 2021). A queda no qP demonstra que o estado do primeiro aceptor de elétrons estável do PSII, a plastoquinona Q_A , estava reduzido e pode-se inferir que o centro de reação do FSII se encontrava em estado fechado, justamente pela interrupção no transporte de elétrons após Q_B (SILVA *et al.*, 2006). O aumento desse parâmetro no tratamento ATZ + NP ZnO corrobora com estudos que mostraram a potencialidade das nanopartículas em promover o crescimento da planta e aumento de seus pigmentos fotossintetizantes (PULLAGURALA *et al.*, 2018).

Sobre o parâmetro NPQ não houve alteração após a exposição a ATZ. Em estudos sobre o comportamento de herbicidas que agem no FSII é esperado que haja a redução no transporte de elétrons e que em certos casos seja acompanhado de aumento nos valores de NPQ, que é indicador de dissipação de energia na antena do FSII. Entretanto não foi o que ocorreu neste estudo. Uma possibilidade é que em macrófitas aquáticas, o mecanismo NPQ que dissipa o excesso de energia luminosa parece não ser o principal mecanismo fotoprotetor (MOUSTAKAS *et al.*, 2016).

A fixação de CO_2 também foi afetada pelo ATZ, conforme constatado pelas quedas em A (Fig. 4). Em relação a condutância estomática (g_s) e transpiração (E) não houve diferença significativa entre os tratamentos. Em adição, os menores valores em A também foram impactados pelo aumento da concentração interna e externa de CO_2

(C_i/C_a) e decréscimo na eficiência de carboxilação (A/C_i), podendo estar relacionado com danos causados na enzima Rubisco, ou seja, a ATZ afetou a atividade de carboxilação da Rubisco (ALLA *et al.*, 2007), acarretando o acúmulo de CO_2 . Já no tratamento ATZ+NP esses parâmetros mantiveram-se similares ao controle. O Zn é um micronutriente importante no desenvolvimento das plantas e sua aplicação na forma de nanopartículas tem sido relatada como sendo capaz de aumentar a fotossíntese e o crescimento vegetal (PULLAGURALA *et al.*, 2018). No presente estudo, é provável que os maiores valores de A foram consequência de uma série de processos que agiram em conjunto, como a manutenção da clorofila, a manutenção dos processos de transporte de elétrons e a atenuação de danos sobre a Rubisco, com consequente aumento na eficiência de carboxilação.

A respiração é o processo fisiológico pelo qual as plantas obtêm ATP. Esse parâmetro não se alterou em nenhum dos tratamentos no presente estudo (Fig. 5). Esse resultado contrasta do observado para outras plantas, como a macrófita *Pistia stratiotes*, na qual, verificou-se que o tratamento com ATZ promoveu aumento significativo na taxa respiratória, provocando alteração nas funções fisiológicas da planta (VIEIRA *et al.*, 2021). Cabe ressaltar, no entanto, que *E. crassipes* exposta apenas ao herbicida, sem a adição de NP ZnO, apresentou menor fotossíntese, de forma que a manutenção da taxa respiratória nessas plantas pode resultar em balanço de carbono negativo, que pode impactar o desenvolvimento vegetal em período maior de exposição ao poluente.

A determinação do teor de MDA (malondialdeído) é comumente utilizada para identificar o risco de estresse oxidativo, estimando a formação de peróxidos lipídicos em material biológico (WAHSHA *et al.*, 2012) (Fig. 6). Esses resultados foram confirmados pela taxa de extravasamento de eletrólitos (Fig. 7), indicando que não houve produção excessiva de EROs nas plantas expostas ao herbicida. Esse resultado também pode ser corroborado pelas enzimas antioxidantes, cujas alterações não se alteraram nos tratamentos avaliados. A única exceção foi a enzima catalase, que apresentou maior atividade nas plantas no tratamento ATZ+NP em comparação com as plantas expostas apenas ao herbicida (Fig. 8). O aumento na CAT, no entanto, pode estar relacionado com outros processos fisiológicos, como a fotorrespiração. Com efeito, já foi demonstrado que a ATZ inibe o processo fotorrespiratório (Imbamba e Moss, 1971) e os efeitos atenuantes das NP ZnO podem ter impactado esse processo, explicando a maior atividade enzima da catalase.

Além das análises feitas a partir do comportamento vegetal exposto ao herbicida de estudo, foram realizados estudos a partir da água utilizada em cada um dos tratamentos, a fim de verificar a eficiência da planta em extrair o poluente da água e torná-la menos poluidora no seu retorno ao meio ambiente. Para isso, foram realizados bioensaios com água fitorremediada e água não fitorremediada, empregando-se planárias. As planárias de água doce são organismos promissores para a bioindicação de corpos hídricos contaminados, sendo sensíveis à presença de diversos poluentes (DORNELAS *et al.*, 2021). Além disso, esses organismos são de fácil coleta e manutenção em laboratório, além de apresentarem rápida reprodução, características interessantes em espécies consideradas bioindicadoras (Knakievicz, 2014). Foi possível constatar que *G. tigrina* são eficientes para a bioindicação de água contaminada com ATZ, uma vez que a presença do herbicida prejudicou a capacidade de regeneração das planárias. O processo de regeneração é similar à embriogênese em vertebrados superiores, de forma que o comprometimento desse processo nas planárias fornece evidências sobre o impacto do poluente também sobre os vertebrados (WU *et al.*, 2018). O processo de fitorremediação, no entanto, foi eficiente para eliminar o efeito tóxico da solução sobre as planárias, independente da presença ou não de NP ZnO, indicando a eficácia do processo de remediação da água.

Diante dos resultados apresentados é possível concluir que as NP ZnO são capazes de atenuar o efeito tóxico da ATZ, promovendo incrementos no aparato fotossintético de *E. crassipes*. Além disso, a planta apresenta alta eficiência no processo de fitorremediação, sendo capaz de diminuir a toxicidade da solução contaminada pela ATZ em organismos não alvos, como os invertebrados de água doce, nomeadamente planárias. Convém ressaltar que, embora as NPs ZnO não tenham alterado a capacidade de fitorremediação de *E. crassipes*, a menor ocorrência de danos permite o uso prolongado das espécies, podendo ser importante para projetos de fitorremediação, principalmente em locais em que há a coocorrência de diferentes poluentes e, portanto, os danos ocasionados às plantas podem ser ainda mais intensos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIL, M. et al. Zinc oxide nanoparticles improved chlorophyll contents, physical parameters, and wheat yield under salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

ALENCAR, B. T. B. et al. Use of macrophytes to reduce the contamination of water resources by pesticides. **Ecological Indicators**, v. 109, p. 105785, 2020.

ALI, Shafaqat et al. Application of floating aquatic plants in phytoremediation of heavy metals polluted water: a review. **Sustainability**, v. 12, n. 5, p. 1927, 2020.

ALSCHER, Ruth Grene et al. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ARNON DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, **Plant Physiology**. 24: 1-15. 1949.

BAI, Xiaocui et al. Effects of atrazine on photosynthesis and defense response and the underlying mechanisms in *Phaeodactylum tricornutum*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17499-17507, 2015.

BARCELLOS, P. S. et al. The fate of atrazine in tropical environments: photolysis, acute toxicity and endocrine disruptor potential. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, p. 927-937, 2022.

BILGER, W. et al. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis research**, v. 25, n. 3, p. 173-185, 1990.

BORGES, C. V. et al. Oxidative stress in plants and the biochemical response mechanisms. In: **Plant Stress Mitigators**. Academic Press, 2023. p. 455-468.

BORTOLUZZI, E. C. et al. Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1872-1876, 2007.

BRAIN, R. A. et al. Influence of light intensity on the toxicity of atrazine to the submerged freshwater aquatic macrophyte *Elodea canadensis*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 79, p. 55-61, 2012.

CABOT, C. et al. A role for zinc in plant defense against pathogens and herbivores. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1171, 2019.

CHEN, Q. et al. Soil microbial community toxic response to atrazine and its residues under atrazine and lead contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 996-1007, 2015.

DALTON, Rebecca L. et al. Atrazine contamination at the watershed scale and environmental factors affecting sampling rates of the polar organic chemical integrative sampler (POCIS). **Environmental pollution**, v. 189, p. 134-142, 2014.

DE ALBUQUERQUE, F. et al. An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. **Science of The Total Environment**, v. 700, p. 134868, 2020.

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

- DEBLOIS, C. P. et al. Response to variable light intensity in photoacclimated algae and cyanobacteria exposed to atrazine. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 77-84, 2013.
- DELLA VECHIA, Jaqueline Franciosi et al. Determinação de plantas indicadoras de resíduos de bentazona, atrazina e clomazona no solo. **Ciência e Cultura**, v. 2, p. 7. 2021.
- DONALDSON, Lloyd. Autofluorescência em plantas. **Moléculas**, v. 25, n. 10, pág. 2393, 2020.
- DOS SANTOS, N. M. C. et al. Use of *Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes* for environmental services: Decontamination of aquatic environments with atrazine residues. **Aquatic Botany**, v. 176, p. 103470, 2022.
- DORNELAS, A. S. P. et al. Lethal and sublethal effects of the saline stressor sodium chloride on *Chironomus xanthus* and *Girardia tigrina*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 27, p. 34223-34233, 2020.
- DORNELAS, A. S. P. et al. Effects of two biopesticides and salt on behaviour, regeneration and sexual reproduction of the freshwater planarian *Girardia tigrina*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, p. 124089, 2021.
- DORNELAS, A. S. P. et al. The sexual reproduction of the nontarget planarian *Girardia tigrina* is affected by ecologically relevant concentrations of difenoconazole: new sensitive tools in ecotoxicology. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-9, 2022.
- DORES, E. F. G. de C. et al. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso-Análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, p. 27-36, 2001.
- DOS REIS, E. B. et al. Responses of Freshwater Planarian *Girardia tigrina* to Fipronil-Based Insecticide: Survival, Behavioral and Physiological Endpoints. **Diversity**, v. 14, n. 9, p. 698, 2022.
- FAIZAN, M. et al. Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. **Photosynthetica**, v. 56, n. 2, p. 678-686, 2018.
- FAIZAN, M. et al. Effects of zinc oxide nanoparticles on crop plants: A perspective analysis. In: **Sustainable Agriculture Reviews 41**. Springer, Cham, 2020. p. 83-99.
- FAN, X. et al. Responses of photosynthesis-related parameters and chloroplast ultrastructure to atrazine in alfalfa (*Medicago sativa L.*) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 166, p. 102-108, 2018.
- FARGHALY, F. A. et al. Impacts of zinc oxide nano and bulk particles on redox-enzymes of the *Punica granatum* callus. **Scientific reports** 10, 19722 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76664-4>
- FENG, W. et al. Analysis of utilization technologies for *Eichhornia crassipes* biomass harvested after restoration of wastewater. **Bioresource technology**, v. 223, p. 287-295, 2017.

FERNANDES, A. F. T. et al. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* from a virgin Brazilian Amazon region with potential to degrade atrazine. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 13974-13978, 2014.

FROTA, M. T. B. A. et al. Agrotóxicos: os venenos ocultos na nossa mesa. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, 2021.

GHANI, M. I. et al. Foliar application of zinc oxide nanoparticles: An effective strategy to mitigate drought stress in cucumber seedling by modulating antioxidant defense system and osmolytes accumulation. **Chemosphere**, v. 289, p. 133202, 2022.

GONDAL, A. H. et al. A detailed review study of zinc involvement in animal, plant and human nutrition. **Indian Journal of Pure & Applied Biosciences**, v. 9, n. 2, p. 262-271, 2021.

HAGSTROM, Danielle et al. Freshwater planarians as an alternative animal model for neurotoxicology. **Toxicological Sciences**, v. 147, n. 1, p. 270-285, 2015.

HAGSTROM, Danielle; COCHET-ESCARTIN, Olivier; COLLINS, Eva-Maria S. Planarian brain regeneration as a model system for developmental neurotoxicology. **Regeneration**, v. 3, n. 2, p. 65-77, 2016.

HAMID, Mohsina et al. Potential applications of peroxidases. **Food chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1177-1186, 2009.

HE, H. et al. A review on recent treatment technology for herbicide atrazine in contaminated environment. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 24, p. 5129, 2019.

HU, Yang et al. Impact of atrazine on soil microbial properties: A meta-analysis. **Environmental Pollution**, p. 121337, 2023.

HÜBNER, C. et al. Interactions of zinc-and redox-signaling pathways. **Redox biology**, v. 41, p. 101916, 2021.

HUSSAIN, F. et al. Effects of zinc oxide nanoparticles on antioxidants, chlorophyll contents, and proline in *Persicaria hydropiper L.* and its potential for Pb phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 34697-34713, 2021.

ILO, O. P. et al. The benefits of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for Southern Africa: A review. **Sustainability**, v. 12, n. 21, p. 9222, 2020.

IMBAMBA, S. K. et al. Effect of Atrazine on Physiological Processes in Leaves 1. **Crop Science**, v. 11, n. 6, p. 844-848, 1971.

INTICHER, Jonas J. et al. Advanced treatment of water contaminated with atrazine, difenoconazole and fipronil mixture, its by-products and bio-toxicity levels. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 105883, 2021.

JADIA, C. D. et al. Phytoremediation of heavy metals: recent techniques. **African journal of biotechnology**, v. 8, n. 6, 2009.

JAVARONI, R. de C. A. et al. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 22, p. 58-64, 1999.

KABRA, A. N. et al. Toxicity of atrazine and its bioaccumulation and biodegradation in a green microalga, *Chlamydomonas mexicana*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 12270-12278, 2014.

KAPAHI, M. et al. Bioremediation options for heavy metal pollution. **Journal of health and pollution**, v. 9, n. 24, 2019.

KAWANO, Tomonori. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. **Plant cell reports**, v. 21, n. 9, p. 829-837, 2003.

KHARAYAT, Yogita. Distillery wastewater: bioremediation approaches. **Journal of Integrative Environmental Sciences**, v. 9, n. 2, p. 69-91, 2012.

KNAKIEVICZ, T. Planarians as invertebrate bioindicators in freshwater environmental quality: the biomarkers approach. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2014.

KONRAD, M. L. F. et al. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.3, p.339-347, 2005.

LAMEGO, F. P. et al. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição? Pesticidas: **Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 17, 2007.

LIN, Tao et al. Study of atrazine degradation in subsurface flow constructed wetland under different salinity. **Chemosphere**, v. 72, n. 1, p. 122-128, 2008.

LOPES, C. V. A. et al. Desafios e avanços no controle de resíduos de agrotóxicos no Brasil: 15 anos do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, p. e00116219, 2021.

LÓPEZ, Ana M. Córdova et al. Exposure to Roundup® affects behaviour, head regeneration and reproduction of the freshwater planarian *Girardia tigrina*. **Science of The Total Environment**, v. 675, p. 453-461, 2019.

LÓPEZ, A. M. C. et al. Behavioral Parameters of Planarians (*Girardia tigrina*) as Fast Screening, Integrative and Cumulative Biomarkers of Environmental Contamination: Preliminary Results. **Water**, v. 13, n. 8, p. 1077, 2021.

MADIKIZELA, L. M. et al. Removal of organic pollutants in water using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Journal of Environmental Management**, v. 295, p. 113153, 2021.

MADIKIZELA, L. et al. Uptake of pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions and natural occurring plant species: a review. **Science of the Total Environment**, v. 636, p. 477-486, 2018.

- MARDI, A. et al. Comparative study of growth responses, photosynthetic pigment content, and gene expression pattern in tobacco plants treated with ZnO nano and ZnO bulk particles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 24, n. 10, p. 208, 2022.
- MAXWELL, K. et al. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.
- MAJEWSKA, M. et al. Phytotoxic activity of diclofenac: Evaluation using a model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with atrazine as a reference substance. **Chemosphere**, v. 209, p. 989-997, 2018.
- MOFEED, J. et al. Toxic responses and antioxidative enzymes activity of *Scenedesmus obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine, alone and in mixture. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 95, p. 234-240, 2013.
- MOUSTAKAS, M. et al. Photochemical changes and oxidative damage in the aquatic macrophyte *Cymodocea nodosa* exposed to paraquat-induced oxidative stress. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 126, p. 28-34, 2016.
- PALACIO-MÁRQUEZ, A. et al. Efficiency of foliar application of zinc oxide nanoparticles versus zinc nitrate complexed with chitosan on nitrogen assimilation, photosynthetic activity, and production of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 288, p. 110297, 2021.
- PATEL, S. T., management and envisaged utilizations of aquatic weed *Eichhornia crassipes*: an overview. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 11, n. 3, p. 249-259, 2012.
- PAVLOVIĆ, D. et al. Alterations in amount of chlorophyll as indicator of resistance for *Chenopodium album* L. and *Amaranthus retroflexus* L. to atrazine. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Supplement, p. 131-138, 2006.
- PETARLI, G. B. et al. Exposição ocupacional a agrotóxicos, riscos e práticas de segurança na agricultura familiar em município do estado do Espírito Santo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 44, 2019.
- PIRES, F. R. et al. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta daninha**, v. 21, p. 335-341, 2003.
- PRAKASH, V. et al. Application of zinc oxide nanoparticles as fertilizer boosts growth in rice plant and alleviates chromium stress by regulating genes involved in regulating oxidative stress. **Chemosphere**, p. 134554, 2022.
- PULLAGURALA, V. L. Reddy et al. Finding the conditions for the beneficial use of ZnO nanoparticles towards plants-A review. **Environmental Pollution**, v. 241, p. 1175-1181, 2018.
- RALPH, P. J. Herbicide toxicity of *Halophila ovalis* assessed by chlorophyll a fluorescence. **Aquatic Botany**, v. 66, n. 2, p. 141-152, 2000.

RAMÍREZ-BARRÓN, S. N. et al. Preparation of a Pressure Sensitive Adhesive (PSA) with the ZnO Nanoparticles Incorporation. Study of its Physicochemical and Antimicrobial Properties. **Revista mexicana de ingeniería biomédica**, v. 40, n. 1, 2019.

REZANIA, S. et al. Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater. **Journal of environmental management**, v. 163, p. 125-133, 2015.

ROSTAMI, S. et al. Current methods and technologies for degradation of atrazine in contaminated soil and water: a review. **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, p. 102019, 2021.

SALIH, A.M. et al. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Phoenix dactylifera* and their effect on biomass and phytochemical compounds in *Juniperus procera*. **Scientific reports**, 11, 19136 (2021).

SALT, D. et al. Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. **Nature Biotechnology** 13, 468–474 (1995).

SARAIVA, A. S. et al. Lethal and sub-lethal effects of cyproconazole on freshwater organisms: a case study with *Chironomus riparius* and *Dugesia tigrina*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 12169-12176, 2018.

ŠEBESTA, M. et al. Field application of ZnO and TiO₂ nanoparticles on agricultural plants. **Agronomy**, v. 11, n. 11, p. 2281, 2021.

SEMIDA, W. M. et al. Foliar application of zinc oxide nanoparticles promotes drought stress tolerance in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Plants**, v. 10, n. 2, p. 421, 2021.

SHER, A. et al. The Growth, physiological and biochemical response of foxtail millet to atrazine herbicide. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 11, p. 6471-6479, 2021.

SIDDIQUI, Z. A. et al. A. Effects of graphene oxide and zinc oxide nanoparticles on growth, chlorophyll, carotenoids, proline contents and diseases of carrot. **Scientia Horticulturae**. 249, 374–382 (2019).

SILVA, M. M. P. et al. Eficiência fotoquímica de gramíneas forrageiras tropicais submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 67-74, 2006.

SIMÃO, F. CP et al. Oxidative status of planarians is differently affected by PAHs: 3-5 Benzene ring compounds. **Environmental Advances**, v. 8, p. 100201, 2022.

SODRÉ, F. F. et al. Seasonal and spatial distribution of caffeine, atrazine, atenolol and DEET in surface and drinking waters from the Brazilian Federal District. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 1854-1865, 2018.

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

- SOUSA, A. S. et al. Estimated levels of environmental contamination and health risk assessment for herbicides and insecticides in surface water of Ceará, Brazil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 96, p. 90-95, 2016.
- STEPHENIE, Sarah et al. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103917, 2020.
- STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, p. 748-755, 2005.
- SU, W. et al. The resource utilization of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* [Mart.] Solms) and its challenges. **Resources**, v. 7, n. 3, p. 46, 2018.
- SUN, L. et al. Physiological, transcriptomic, and metabolomic analyses reveal zinc oxide nanoparticles modulate plant growth in tomato. **Environmental Science: Nano**, v. 7, n. 11, p. 3587-3604, 2020.
- SUN, C. et al. To evaluate the toxicity of atrazine on the freshwater microalgae *Chlorella sp.* using sensitive indices indicated by photosynthetic parameters. **Chemosphere**, v. 244, p. 125514, 2020.
- THAMAGA, K. H. et al. Remote sensing of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): A review on applications and challenges. **Remote Sensing Applications: Society and Environment**, v. 10, p. 36-46, 2018.
- TING, W. H. T. et al. Application of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for phytoremediation of ammoniacal nitrogen: A review. **Journal of water process engineering**, v. 22, p. 239-249, 2018.
- TRIPATHI, P. et al. Endophytic bacterium CIMAP-A7 mediated amelioration of atrazine induced phyto-toxicity in *Andrographis paniculata*. **Environmental Pollution**, v. 287, p. 117635, 2021.
- TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical biochemistry**, v. 524, p. 13-30, 2017.
- VITOSH, M. L. et al. Secondary and Micronutrients for. **Bulletin E-486, Michigan State University Extension Service, East Lansing, Michigan**, 1998.
- YAN, A. et al. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 359, 2020.
- WANG, F. et al. Accumulation, distribution and removal of triazine pesticides by *Eichhornia crassipes* in water-sediment microcosm. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 219, p. 112236, 2021.
- WAHSHA, M. et al. Toxicity assessment of contaminated soils from a mining area in Northeast Italy by using lipid peroxidation assay. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 113, p. 112-117, 2012.
- WEI, Z. et al. A review on phytoremediation of contaminants in air, water and soil. **Journal of hazardous materials**, v. 403, p. 123658, 2021.

WU, Jui-Pin; LI, Mei-Hui. The use of freshwater planarians in environmental toxicology studies: advantages and potential. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 161, p. 45-56, 2018.

XU, J. et al. Evaluation of zinc oxide nanoparticles on lettuce (*Lactuca sativa L.*) growth and soil bacterial community. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 6, p. 6026-6035, 2018.

ZHARMUKHAMEDOV, S. K. et al. Chemical inhibitors of photosystem II. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 68, n. 2, p. 212-227, 2021.