



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Marlon Luiz Neves da Silva

Identificação dos efeitos toxicológicos da coexposição de nanopartículas de prata e glifosato para o microcrustáceo *Daphnia magna*

Florianópolis
2020

Marlon Luiz Neves da Silva

Identificação dos efeitos toxicológicos da coexposição de nanopartículas de prata e glifosato para o microcrustáceo *Daphnia magna*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. William Gerson Matias

Coorientadora: Profa. Dra. Cristiane Funghetto Fuzinato

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Silva, Marlon Luiz Neves

Identificação dos efeitos toxicológicos da coexposição de nanopartículas de prata e glifosato para o microcrustáceo *Daphnia magna* / Marlon Luiz Neves da Silva ; orientador, William Gerson Matias, coorientador, Cristiane Funghetto Fuzinato, 2020.

120 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Toxicologia. 3. Mistura. 4. *D. magna*. 5. Agrotóxicos. I. Gerson Matias, William. II. Funghetto Fuzinato, Cristiane. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Marlon Luiz Neves da Silva

Identificação dos efeitos toxicológicos da coexposição de nanopartículas de prata e glifosato para o microcrustáceo *Daphnia magna*

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Maria Elisa Magri, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Paulo Roger Lopes Alves, Dr.
Universidade Federal da Fronteira Sul

Profa. Sílvia Pedroso Melegari, Dra.
Universidade Federal do Paraná

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Engenharia Ambiental.

Profa. Dra. Maria Eliza Nagel Hassemer
Coordenadora do Programa

Prof. Dr. William Gerson Matias
Orientador

Florianópolis, 28 de maio de 2020.

Dedico este trabalho aos meus pais, Alice e José Luiz, e à
minha esposa Bruna.

AGRADECIMENTOS

Nesta jornada, foram anos de muito trabalho e aprendizado, milhares de quilômetros em viagens de Chapecó para Florianópolis, amizades feitas e crescimento pessoal, tudo isso resultou nesta tese. Fico feliz com a participação de todos aqueles que me proporcionaram todo suporte necessário, e assim, gostaria de agradecer a cada um, que representa um pedacinho deste trabalho.

Primeiramente, à Deus, por ter me guiado nestas viagens com segurança e saúde, sempre me abençoando muito;

Deixo um agradecimento especial à minha querida esposa Bruna, pelo apoio, paciência, conforto nas horas difíceis e incentivo, sempre ao meu lado. A ti também, todo meu amor;

Agradeço grandemente à minha mãe Alice, ao meu pai José Luiz e à minha irmã Blainny, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim, nos caminhos que percorri e nas escolhas que fiz. Vocês são essenciais em minha vida;

Ao meu orientador, professor Dr. William Gerson Matias, pela oportunidade e confiança concedidas, por todo conhecimento repassado, pelo suporte fornecido, pela paciência, pelos puxões de orelha; mas, sobretudo, por aceitar e entender minhas particularidades. Muito obrigado, chefe!

À minha coorientadora, professora Dra. Cristiane Funghetto Fuzinato, pela ajuda e oportunidade a mim dada na realização de testes em seu laboratório na Universidade Federal da Fronteira Sul, em Erechim;

Ao meu grande amigo Diego, pela parceria e ajuda em todas as horas. Sem você, este trabalho não teria um resultado tão positivo. Valeu, Minas Gerais;

Agradeço também à Denice, por todo conhecimento, auxílio e ensinamentos repassados, muito obrigado;

Aos demais colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental, Jéssica, Vitor, Naiara, Bianca, Cris, Rodrigo, Miriam e Ana Letícia;

Aos professores que aceitaram o convite para participar da avaliação deste trabalho, professora Dra. Maria Elisa Magri, professor Dr. Paulo Roger Lopes Alves e professora Dra. Sílvia Pedroso Melegari;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Federal de Santa Catarina, por oportunizar o ingresso e desenvolvimento de meu doutorado.

À Universidade Federal da Fronteira da Sul, por me oferecer afastamento de minhas atividades para a realização deste Doutorado;

À UNIEDU/FUMDES, pelo suporte financeiro;

Enfim, também àqueles que, embora não estejam mencionados nestes agradecimentos, colaboraram indireta ou diretamente para a confecção deste trabalho. A ajuda e o apoio de todos foram fundamentais!

Muito obrigado!

“Demore o tempo que for para decidir
o que você quer da vida, e depois que
decidir não recue ante nenhum
pretexto, porque o mundo tentará te
dissuadir.” (Friedrich Nietzsche)

RESUMO

O glifosato (Gly) e as nanopartículas metálicas estão coexistindo no ambiente devido à sua demanda e uso na agricultura e nas indústrias. No entanto, os efeitos dessas combinações no ambiente e na biota não são totalmente compreendidos. O objetivo deste trabalho foi identificar os possíveis efeitos toxicológicos em níveis agudos, bem como, em níveis crônicos multigeracionais da mistura binária (MR) de nanopartículas de prata (AgNP) com glifosato (Gly) em *D. magna*. A metodologia de Abbott foi utilizada na análise das possíveis interações agudas. O estresse oxidativo induzido pela MR de AgNP/Gly, em termos de Unidade Tóxica (UT), foi avaliado para o nível de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e MDA. Foi avaliada também a atividade das enzimas antioxidantes Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione (GSH) em 0, 1,5, 1 e 1,75 UT. Nos testes crônicos foram avaliados, após 21 dias, os parâmetros de sobrevivência, crescimento, reprodução e idade da primeira ninhada, para os indivíduos parentais, e descendentes expostos (F1E) e não expostos (recuperação) (F1NE). Já para os indivíduos tratados com a MR, os contaminantes testados individualmente foram utilizados em suas maiores e menores concentrações dos crônicos individuais. A MR de AgNP/Gly, em nível agudo, apresentou efeito antagônico em 1, 1,5 e 1,75 UT e efeito aditivo em 0,25, 0,50 e 2 UT, resultados possivelmente associados à complexação da AgNP pelo Gly. Houve desregulação dos biomarcadores bioquímicos relacionados ao sistema de defesa antioxidante nas *D. magna* expostas aos tratamentos, cujas enzimas antioxidantes avaliadas CAT, SOD e GSH não foram capazes de modular a produção de EROs, resultando em estresse oxidativo e danos por peroxidação lipídica. Efeitos crônicos multigeracionais referentes aos parâmetros reprodução e idade da primeira ninhada foram observados nos descendentes dos compostos individuais, não havendo recuperação para F1E e F1NE. Nos organismos expostos a MR, ocorreu alteração relevante na idade da primeira ninhada, com atraso em todos os tratamentos para F1E e F1NE. Houve alteração significativa ($p < 0,05$) no parâmetro reprodução, com forte redução para os parentais, F1E e F1NE, indicando uma maior toxicidade do que os compostos isoladamente, sendo cumulativa e prejudicial ao equilíbrio ambiental com o tempo. Embora os resultados nos ensaios agudos não tenham fornecido evidências claras acerca da interação entre AgNP e Gly, os ensaios crônicos multigeracionais com MR resultaram em uma toxicidade combinada inesperada em relação aos tratamentos individuais, o que gera uma preocupação para esta coexposição em outros cenários. Portanto, apesar do tempo de exposição e dose serem variáveis a serem consideradas, o modo de ação das misturas nos organismos ainda carece de respostas. Contudo, este estudo traz resultados relevantes para futuras pesquisas.

Palavras-chave: Multigeracional. Mistura. *D. magna*. AgNP. Glifosato. Toxicidade.

ABSTRACT

Glyphosate (Gly) and metallic nanoparticles are coexisting in the environment due to their demand and use in agriculture and industry. However, the effects of these combinations on the environment and biota are not fully understood. This work aims to identify the possible toxicological effects at acute levels, as well as at chronic multigenerational levels of the binary mixture (MR) of silver nanoparticles (AgNP) with glyphosate (Gly) in *D. magna*. We used Abbott's method to analyze possible acute interactions. The oxidative stress induced by the AgNP/Gly binary mixture, regarding the Toxic Unit (TU), it was evaluated for the level of Reactive Oxygen Species (ROS) and MDA. We also evaluated the activity of the antioxidant enzymes named Catalase (CAT), Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione (GSH) at 0, 1.5, 1 and 1.75 UT. In the chronic tests, we evaluated, after 21 days, the parameters of survival, growth, reproduction and age of the first brood for parental individuals, and exposed (F1E) and unexposed (recovery) (F1NE). For individuals fed with MR, the contaminants tested individually were used in their highest and lowest concentrations of the individual chronic ones. The binary AgNP/Gly mixture, at an acute level, presented an antagonistic effect in 1, 1.5 and 1.75 TU and an additive effect in 0.25, 0.50 and 2 TU, results possibly associated to the complexation of AgNP by Gly. There was deregulation of the biochemical biomarkers related to the antioxidant defense system in *D. magna* exposed to treatments, whose antioxidant enzymes evaluated CAT, SOD and GSH were not able to modulate the production of ROS, resulting in oxidative stress and damage by lipid peroxidation. We observed the chronic multigenerational effects related to the parameters of reproduction and age of the first brood in the descendants of the individual compounds, with no recovery for F1E and F1NE. There was a relevant change in the age of the first litter in organisms exposed to MR, with delay in all treatments for F1E and F1NE. There was a significant change ($p < 0.05$) in the reproduction parameter, with a strong reduction for the parental F1E and F1NE, which indicates more toxicity than the compounds alone, being cumulative and harmful to the environmental balance over time. Although the results in the acute tests did not provide clear evidence about the interaction between AgNP and Gly, chronic multigenerational tests with MR resulted in unexpected combined toxicity compared to individual treatments. This raises a concern for this coexposure in other settings. Therefore, although exposure time and dose are variables to be considered, the action mode of mixtures in organisms still needs answers. However, this study brings relevant results for future researches.

Keywords: Multigenerational. Mixture. *D.magna*. AgNP. Glyphosate. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Forças repulsivas geradas pela adsorção de borohidreto separando as AgNP	33
Figura 2 - Efeitos das AgNP em organismos	36
Figura 3 - Estrutura química da molécula de glifosato	40
Figura 4 - Representação de um esquema ilustrativo do composto formado pela complexação entre glifosato e prata	42
Figura 5 - Equilíbrios e constantes de dissociação do herbicida glifosato	43
Figura 6 - Imagem de um indivíduo adulto de <i>D. magna</i> cultivado em laboratório.....	51
Figura 7 - Esquema das etapas de desenvolvimento da pesquisa.	58
Figura 8 - Espectro no UV-Vis de AgNP	69
Figura 9 - Micrografias de MET para AgNP (inserção) e histograma da curva Gaussiana (n = 100 partículas). Barra de escala, 50 nm	71
Figura 10 - Espectro de FTIR demonstrando bandas características do Gly.	72
Figura 11 - Curva de toxicidade aguda (CE ₅₀) de nanopartículas de prata (AgNP) .	73
Figura 12 - Curva de toxicidade aguda (CE ₅₀) de glifosato (Gly).	74
Figura 13 - Mortalidade induzida por nanopartículas de prata (AgNP), glifosato (Gly) e sua mistura (AgNP/Gly) em <i>D. magna</i>	75

Figura 14 - Biomarcadores bioquímicos após exposição a MR de AgNP e Gly, em D. magna, para 0,5, 1 e 1,75 UT.....	78
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Demais bandas observadas no FTIR do Gly e seus referentes modos vibracionais	72
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados das medidas de PZ, DE e pH nos meios H ₂ O OR, ISO e M4	70
Tabela 2 - Concentração e unidade tóxica (UT) de AgNP e glifosato usadas na avaliação tóxica dos compostos individuais e da mistura binária.	75
Tabela 3 - Modelo de Abbott representando o tipo de interação entre AgNP e Gly em uma mistura binária sob diferentes exposições de UT	76
Tabela 4 - Resultados dos testes de sensibilidade para neonatos utilizados nos testes crônicos, utilizando como substância de referência o K ₂ Cr ₂ O ₇	80
Tabela 5 - Resultados para os testes de toxicidade crônica, CEO e CENO para parâmetros de longevidade, crescimento, reprodução e de <i>D. magna</i> expostos ao Gly e não expostos.....	81
Tabela 6 - Resultados para os testes de toxicidade crônica, CEO e CENO para parâmetros de longevidade, crescimento, reprodução e de <i>D. magna</i> expostos a AgNP	83
Tabela 7 - Resultados para os testes de toxicidade crônica para parâmetros de longevidade, crescimento, reprodução e de <i>D. magna</i> expostos à mistura binária (MR) de AgNP e Gly e não expostos	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AC	Adição de concentração
AChE	Acetilcolinesterase
AgNP	Nanopartícula de prata
AI	Ação independente
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
CE50	Concentração média efetiva
CL50	Concentração letal média
CEO	Concentração de efeito observado
CENO	Concentração de efeito não observado
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DDX	4,4'-dicloro-difenil-dicloroetileno
DE	Diâmetro efetivo
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRf	Dose de referência
DTNB	5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzOico)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvishiquimato-3-fosfato sintetase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
F1E	Primeira geração com exposição
F1NE	Primeira geração sem exposição
Gly	Glifosato
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione

GSSG	Dissulfeto de glutathione
GST	Glutathione-S-transferase
H ₂ DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
IDA	ingestão diária aceitável
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malondialdeído
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MR	Mistura binária
NADPH	Fosfato de dinucleótido de adenina de β-nicotinamida
NM	Nanomaterial
NP	Nanopartícula
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Osmose reversa
PALS	Dispersão de Luz de Fase Alternativa
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Poli (N-vinilpirrolidona)
PZ	Potencial zeta
RI	Razão de inibição
RNA	Ácido Ribonucleico
SOD	Superóxido Dismutase
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TBA	4,6-Dihidroxipirimidina-2-tiol
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
Tesp	Toxicidade esperada
Tobs	Toxicidade observada
Tris-HCl	Cloridrato de 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UP	Água Ultrapura
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UT	Unidade Tóxica

LISTA DE SÍMBOLOS

® Produto Registrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	HIPÓTESES.....	26
1.2	OBJETIVOS	27
1.2.1	Objetivo Geral	27
1.2.2	Objetivos Específicos	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1	NANOTECNOLOGIA.....	28
2.2	NANOPARTÍCULAS DE PRATA	30
2.2.1	Síntese e aplicações de AgNP	30
2.2.2	AgNP e impactos ao meio ambiente	35
2.3	AGROTÓXICOS.....	37
2.4	GLIFOSATO.....	39
2.4.1	Gly e suas implicações	44
2.5	MISTURAS.....	46
2.6	TESTES DE TOXICIDADE.....	49
2.7	MICROCRUSTÁCEO <i>D. magna</i>	50
2.8	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs).....	52
2.9	BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	53
2.9.1	Catalase (CAT)	55
2.9.2	Glutathiona (GSH).....	55
2.9.3	Superóxido Dismutase (SOD).....	56
2.9.4	Peroxidação lipídica (LPO)	56
3	MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1	Delineamento Experimental.....	58
3.2	MATERIAIS	58
3.3	MÉTODOS	59

3.3.1	Síntese das Nanopartículas de Prata (AgNP)	59
3.3.2	Caracterização das AgNP	60
3.3.3	Caracterização do Glifosato	61
3.3.4	Ensaio Toxicológicos.....	61
3.3.5	Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo.....	65
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE PRATA.....	69
4.1.1	Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis)	69
4.1.2	Medidas de Potencial Zeta e Diâmetro efetivo	69
4.1.3	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	70
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO GLIFOSATO	71
4.2.1	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	71
4.3	ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA	72
4.3.1	Toxicidade Aguda para o AgNP	72
4.3.2	Toxicidade aguda para o Gly	73
4.3.3	Interação entre AgNP e Gly usando o método de Abbott.....	74
4.3.4	Biomarcadores Bioquímicos	77
4.3.5	Toxicidade crônica multigeracional com <i>D. magna</i>	79
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
6	CONCLUSÕES	88
7	RECOMENDAÇÕES	89
	REFERÊNCIAS	90
	ANEXO A – Artigos publicados em coautoria.....	118
	ANEXO B – Artigos publicados em coautoria.....	119
	ANEXO C – Artigos publicados em coautoria.....	120

1 INTRODUÇÃO

A expansão da tecnologia nos produtos consumidos nas mais diferentes áreas traz não só benefícios, como também preocupação acerca dos possíveis danos para saúde humana e os impactos biológicos sobre animais e plantas, causados pelo uso desordenado e consequente descarte ao meio ambiente dos variados produtos no cotidiano.

Um exemplo desta expansão tecnológica que pode ser observada nas últimas décadas é a ocorrência de um incremento extensivo da tecnologia em nanoescala, a tal ponto que os nanomateriais (NM) se tornaram constituintes de uma ampla gama de produtos comerciais e domésticos (WALTERS; POOL; SOMERSET, 2014). NM podem ser definidos, segundo a ISO/TS 80004-1 (2015), como material com qualquer dimensão externa em nanoescala (faixa de comprimento aproximadamente de 1 nm a 100 nm), com estrutura interna ou estrutura de superfície em nanoescala. Dentro desta definição se encontram as chamadas Nanopartículas (NP), que são definidas como nano-objetos com todas as dimensões externas na nanoescala, cujos comprimentos dos eixos mais longo e mais curto não diferem significativamente (ISO/TS 80004-1, 2015).

Estas NP possuem propriedades físicas e químicas únicas devido à sua grande área superficial e tamanho reduzido, e incluem subespécies com fulerenos, bem como NP cerâmicas, poliméricas, metálicas, entre outras (KHAN; SAEED; KHAN, 2017). Exemplos de nanopartículas metálicas amplamente utilizadas são as nanopartículas de prata (AgNP), que recentemente ganharam popularidade devido ao seu bom e amplo espectro de atividade antimicrobiana (WEI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016; CUI; CHAE; AN, 2017; PALLAVICINI *et al.*, 2017).

A utilização de AgNP em produtos comerciais está aumentando de forma rápida, representando a NP de maior uso na base de dados do site The Project on Emerging Nanotechnologies, em que, dos 1833 produtos cadastrados contendo alguma NP, 443 foram registrados com AgNP em sua composição (THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2020). Vários são os exemplos destes usos, como em cosméticos, embalagens para alimentos, dispositivos médicos, desodorantes, tratamento de água, produtos têxteis, superfícies funcionalizadas, entre outros (CUI; CHAE; AN, 2017; ALE *et al.*, 2019). Produtos de higiene pessoal, como

sabonetes, xampus e cremes dentais, geralmente contêm menos de 10 µg Ag/g de produto, enquanto tecidos antibacterianos, empregados em diversos artigos de vestuário, contêm entre 30 a 45 µg Ag/g do produto. Máscaras e roupas médicas contêm os níveis mais altos de Ag, variando de 270.000 até 230.000 µg Ag/g, respectivamente (ALE *et al.*, 2019).

A produção anual de AgNP, em nível mundial, está estimada em torno de 320 a 420 toneladas (TORTELLA *et al.*, 2020). Isto pode resultar em um aumento na liberação destas nanopartículas nos variados efluentes domésticos e industriais, acarretando em uma preocupação ambiental crescente para órgãos de controle ambiental e pesquisadores, devido às suas características químicas, físicas e à toxicidade para organismos (MCGILLICUDDY *et al.*, 2017), como algas (ANGEL *et al.*, 2013), peixes (RIBEIRO *et al.*, 2014), microcrustáceos (KIM *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2017), bactérias (KALWAR; SHAN, 2018), moluscos (ALE *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2014; MCGILLICUDDY *et al.*, 2017; ALE *et al.*, 2019) e plantas (LALAU *et al.*, 2020).

Quando os AgNPs entram em ambientes naturais, eles são expostos a várias transformações, como agregação, oxidação, dissolução, sulfetação e cloração. A liberação de íons de prata no ambiente pode ser favorecida ou limitada se espécies oxidantes (oxidação por oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio), cloro ou enxofre estiverem presentes (PULIT-PROCIAK; BANACH, 2016). Entretanto, mesmo com a possibilidade de sofrer modificações, as AgNP podem ser encontradas com variadas concentrações no meio ambiente, na faixa de ng/L até µg/L, a depender da urbanização e industrialização da área (WANG *et al.*, 2018).

Outro componente constante no dia a dia, são os agrotóxicos. De modo geral, o manejo de pragas na agricultura abrange principalmente uso destes. Devido a sua toxicidade relacionada a organismos não-alvos, os agrotóxicos podem representar uma ameaça em múltiplos ecossistemas (MERTENS *et al.*, 2018; VAN BRUGGEN *et al.*, 2018). Em específico, a ocorrência de pesticidas no meio ambiente pode estar ligada à contaminação difusa ou pontual. Esta última vem a incluir a contaminação proveniente de vazamentos ou manipulação inadequada de equipamentos de aplicação de agrotóxicos, descarte incorreto de resíduos, lavagem de equipamentos e até o uso indiscriminado de quantidades excessivas desses produtos (HUETE-SOTO *et al.*, 2017).

Os herbicidas representam mais de 40% da totalidade de pesticidas utilizados em todo o mundo. Entre eles, merece particular atenção os que são à base de glifosato (Gly) (N-(fosfonometil)glicina), que consiste numa substância não seletiva e de uso pós-emergente que interfere diretamente no crescimento das plantas (DE AGUIAR *et al.*, 2016). Cabe salientar que o Gly é utilizado como princípio ativo em mais de 750 diferentes formulações comerciais (KWIATKOWSKA *et al.*, 2017). Estas formulações à base de Gly estão entre as mais empregadas para usos múltiplos como na agricultura, silvicultura, horticultura e usos domésticos (LE *et al.*, 2010; BENBROOK, 2016; CLEMENTS *et al.*, 2017). Além disso, a introdução de culturas geneticamente modificadas, resistentes ao glifosato fez crescer a área e a quantidade utilizada em todo o mundo nos últimos anos, atingindo 56% do uso global de Gly (BENBROOK, 2016).

O principal modo de ação herbicida do glifosato é a inibição de uma enzima importante das plantas, a 5-enolpiruvishiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) (VANNINI *et al.*, 2016). Ela é essencial para a síntese de aminoácidos aromáticos que conduzem múltiplos processos metabólicos essenciais em plantas, fungos e algumas bactérias (MYERS *et al.*, 2016). Como este processo conduzido por EPSPS não existe nas células vertebradas, alguns cientistas e muitos órgãos reguladores assumiram que o glifosato representaria riscos mínimos para o meio ambiente (MYERS *et al.*, 2016; RICHMOND, 2018). Entretanto, estudos demonstram que efeitos negativos do Gly em variadas espécies de peixes (ROY *et al.*, 2016; ROY; CARNEIRO; OCHS, 2016; SULUKAN *et al.*, 2017), moluscos (MOTTIER *et al.*, 2015), mamíferos (CASSAULT-MEYER *et al.*, 2014; DAI *et al.*, 2016), répteis (SCHAUMBURG *et al.*, 2016), insetos (DE AGUIAR *et al.*, 2016), microcrustáceos (LE *et al.*, 2010), bactérias (ZHANG *et al.*, 2018).

Portanto, por conta do aumento do uso mundial de Gly, é natural que ocorra, em dado momento, algum tipo de liberação para o meio ambiente, como o escoamento superficial ou transporte vertical através do solo demonstrado por Lupi *et al.* (2019). Os autores observaram em seus experimentos que em torno de 88,1% do Gly aplicado foi depositado na faixa superficial do solo, até 9 cm de profundidade.

Sendo assim, Gly representa o composto de maior utilização em nível mundial. O Brasil ostenta o título de maior consumidor de agrotóxicos no mundo, e o Gly representa a média de 62,4% dos pesticidas comercializados no país (SÁNCHEZ

et al., 2017), atingindo a marca de 173.150,75 toneladas comercializadas no ano de 2017, três vezes mais que o segundo colocado da lista, o 2-4D (ácido diclorofenoxiacético), segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017).

Cabe ressaltar que em 27 de agosto de 2019 houve a publicação no Diário Oficial da União do ATO nº 58, onde o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento autorizou alterações das classificações toxicológicas e 93 produtos formulados à base de glifosato tiveram a classificação de toxicidade reduzida; destes, 24 produtos eram considerados como “Extremamente Tóxico”, não existindo agora qualquer produto que se enquadre na categoria máxima de toxicidade (BRASIL, 2019), o que pode refletir na intensificação do uso indiscriminado.

Para as AgNP, uma rota de contaminação seria o descarte de águas residuárias relacionadas com o uso diário de produtos comerciais contendo AgNP, como, por exemplo, a lavagem de tecidos tratados, tornando o composto biodisponível (MOHAN *et al.*, 2019).

Em termos de pesquisa, nota-se que grande parte dos trabalhos de mensuração dos impactos ambientais dos poluentes tem enfoque usual na avaliação de produtos químicos individualizados (PAPCHENKOVA; GOLOVANOV; USHAKOVA, 2009; VÖLKER *et al.*, 2013). No entanto, organismos habitam em ambientes geralmente contaminados por misturas de produtos químicos, sendo expostos a potenciais efeitos adversos a partir das interações entre estes produtos, em que a influência mútua pode vir a causar um aumento ou até mesmo atenuação dos efeitos tóxicos (Di POI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018).

Estudos dos impactos toxicológicos sobre misturas estão sendo realizados utilizando diferentes contaminantes emergentes, como NPs, fármacos, agrotóxicos, entre outros, devido à preocupação crescente dos possíveis efeitos ao meio ambiente (WEN *et al.*, 2016; NAASZ; ALTENBURGER; KÜHNEL, 2018; MARTÍN-DE-LUCÍA *et al.*, 2019). Isto se deve à possibilidade de que o contato aos quais os organismos ou os seres humanos estão expostos se constituem geralmente por misturas. Tem-se, então, uma vasta seara de estudos a serem realizados nesta linha, pois muitas das respostas necessárias ainda não estão claras (HU *et al.*, 2018).

Diante da problemática ambiental relacionada à possível coexposição de Gly com AgNP, nota-se a importância de conhecer as possíveis formas de interação nos efeitos em organismos, avaliar impactos nos sistemas de defesa antioxidantes, bem

como estudar o impacto da mistura binária sobre toxicidade aguda e crônica em duas gerações do organismo teste *D. magna*, analisando sua sobrevivência, reprodução e crescimento, bem como testes sobre uma possível recuperação dos organismos sem exposição. Esta investigação apresenta informações importantes sobre os efeitos a curto e longo prazo, acerca de riscos e efeitos associados à exposição de organismos a misturas, com o foco em dois componentes com grande utilização a nível mundial, o Gly e as AgNP, estudando suas formas de interação e fornecendo dados relevantes para melhorar a avaliação de risco ambiental. Vale ressaltar que estudos envolvendo a interação desses compostos são escassos e não apresentam dados de exposição a longo prazo e multigeracionais, determinantes para projeções ao meio ambiente e para saúde.

1.1 HIPÓTESES

Avaliando a problemática exposta sobre o uso crescente de AgNP, bem como de Gly, e levando em consideração a carência de dados relacionados com a toxicidade da mistura binária AgNP/Gly (MR) em organismos, algumas hipóteses foram formuladas, com o objetivo de nortear o desenvolvimento da tese.

- A exposição a MR resultará em efeitos toxicológicos mais pronunciados para *D. magna* em comparação com seus componentes isolados (AgNP/Gly) em nível agudo e crônico;
- Ocorrerão interações de antagonismo e aditivismo em *D. magna* para a MR a partir dos diferentes tratamentos, bem como, estresse oxidativo.
- Efeitos multigeracionais negativos sobre longevidade, reprodução, crescimento e idade da primeira ninhada serão verificados nos descendentes, com e sem exposição aos componentes utilizados, não havendo recuperação dos parâmetros afetados;

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial toxicológico da mistura de AgNP com o herbicida Gly, bem como identificar os possíveis danos biológicos associados da exposição a mistura binária sobre o microcrustáceo *D. magna*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar as AgNP e caracterizar o Gly;
- Estudar a toxicidade aguda utilizando *D. magna* para suspensões de AgNP, Gly e para a MR;
- Investigar as interações resultantes em *D. magna* para diferentes faixas de UT, utilizando modelo de interação;
- Avaliar o estresse oxidativo em *D. magna* para exposição ao composto binário AgNP/Gly, para níveis de EROs, MDA, CAT, SOD e GSH;
- Avaliar os efeitos multigeracionais de AgNP, Gly e para a MR causados sobre *D. magna* quanto à longevidade, crescimento e reprodução, empregando ensaios de toxicidade crônica;
- Comparar os efeitos toxicológicos crônicos multigeracionais em descendentes de primeira geração de *D. magna* com exposição e em recuperação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOTECNOLOGIA

Recentemente, em meados do século XX, surgiu o conceito de uma tecnologia interdisciplinar que envolve biologia, química, física e a ciência dos materiais: a nanotecnologia. O prefixo nano é derivado a palavra grega 'nanos', que significa "anão", se referindo a coisas de um bilionésimo de tamanho ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) (GAMA, 2013). Richard Feynman, um físico americano que ficou conhecido por trazer este novo conceito, explicou na reunião americana da sociedade física realizada em 1959, que isso representaria, por exemplo, que todos os livros do mundo caberiam em um panfleto (SHARMA *et al.*, 2017).

A nanotecnologia cumpre um papel interessante, sendo definida como a aplicação do conhecimento científico para manipular e controlar a matéria predominantemente em nanoescala, para fazer uso de propriedades e fenômenos dependentes de tamanho e estrutura, distintos daqueles associados a átomos ou moléculas individuais, ou extrapolação de tamanhos maiores do mesmo material (ISO/TS 80004-1, 2015). Ela está cada vez mais presente no cotidiano, sendo utilizada em produtos de consumo (BASHARI; KOOHESTANI; SALAMATIPOUR, 2020), na medicina (LUO; NGUYEN; LAI, 2020; RUSSELL; LIU; GRODZINSKI, 2020), indústria (RAMANATHAN *et al.*, 2020), agricultura (BAKER *et al.*, 2017), sensores (DE GÓES; MULLER; FABRIS, 2017), remediação ambiental (DASTKHOON *et al.*, 2020), catalisadores (LU; ASTRUC, 2020), tratamento de água (SALEEM; ZAIDI, 2020), entre outros (SHARMA; KANCHI; BISETTY, 2015).

A partir desta definição, destacam-se as NP, que pela definição da norma ISO/TS 80004-1 (2015) consistem em nano-objetos que apresentam pelo menos uma das dimensões em escalas nanométricas (faixa de comprimento aproximadamente de 1 nm a 100 nm), cujos comprimentos dos eixos mais longo e mais curto do nano-objeto não diferem significativamente.

As NP podem ser amorfas ou cristalinas e suas superfícies podem atuar como transportadoras de compostos químicos. Pesquisas recentes descrevem potencialidade clínica de NP atuando na liberação controlada em sistemas de medicamentos e/ou substâncias ativas no organismo (NISKA *et al.*, 2017).

Dois métodos são comumente empregados na obtenção de NP: o procedimento chamado bottom up (“de baixo para cima”); e o procedimento chamado top down (“de cima para baixo”) (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010b). O primeiro se baseia na tentativa da construção da nanopartícula partindo de seus constituintes básicos: seus átomos e suas moléculas. De outra forma, é igualmente possível a construção de uma nanopartícula pela eliminação do excesso de material constituinte do elemento convencional, utilizando, por exemplo, técnica de litografia, que corresponde a uma série de fases de corrosão química seletiva com grande precisão para a elaboração do material nanométrico a partir de um bloco macroscópico do material (FARIA *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2017; BEYENE *et al.*, 2017).

NP são sólidas, sendo projetadas em escala molecular ou atômica, o que acaba proporcionando um aumento da reatividade química entre estas NP e o meio onde são empregadas (WONG; HU; BAEG, 2017). Isto confere propriedades novas ou superiores que não são atingidas por sólidos convencionais a granel, possibilitando aplicações promissoras em materiais e dispositivos altamente específicos (FU *et al.*, 2014; SHRESTHA; KISHEN, 2016; UDDIN; DESAI; ASMATULU, 2020).

Qualquer material tem algum tamanho crítico ou valor abaixo do qual suas propriedades se alteram consideravelmente, onde, por exemplo, partículas abaixo de 100 nm de diâmetro apresentam propriedades únicas, que são na grande maioria dos casos diferentes das características de seus sólidos convencionais (KHAN; SAEED; KHAN, 2017). A redução do material para a escala nano pode transformar as características físico-químicas em relação ao mesmo material em dimensões maiores, alterar a relação superfície/massa, aumentar a reatividade e também favorecer a liberação de íons (PETERS *et al.*, 2016).

Entretanto, todas estas características podem acabar promovendo uma maior mobilidade nos variados compartimentos ambientais, facilitando assim o transporte biológico e possíveis interações celulares, elevando a necessidade de estudos acerca da biodisponibilidade, degradabilidade, reatividade e toxicidade destes materiais (GONÇALVES *et al.*, 2018). Dentro desta preocupação, a nanotoxicologia surge como relevante ferramenta na avaliação dos possíveis impactos ambientais, enfatizando estudos com nanomateriais em variados compostos e diferentes organismos (ROSSETTO *et al.*, 2014; FUZINATTO *et al.*, 2015; MELEGARI *et al.*, 2019;

VICENTINI *et al.*, 2019; COSTA PUERARI *et al.*, 2020; LALAU *et al.*, 2020; NOGUEIRA *et al.*, 2020).

Embora o nível de ingestão de NP seja muito baixo nos sistemas vivos e seu nível de toxicidade também seja estimado em uma escala menor, esses nanomateriais geralmente levam ao acúmulo nos organismos ocasionando efeitos adversos, podendo se tornar um risco ecológico (PANDIARAJAN; KRISHNAN, 2017). Bour *et al.* (2015) trouxeram um estudo de revisão sobre abordagens ambientalmente relevantes para avaliar ecotoxicidade de NP, observando que os principais efeitos são a indução de sistemas de defesa bioquímica, imunomodulação, efeitos no crescimento e reprodução, alterações comportamentais e mortalidade.

2.2 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

2.2.1 Síntese e aplicações de AgNP

As AgNP recentemente entraram em evidência devido ao seu bom e amplo espectro de atividade antimicrobiana, atuando em múltiplos objetivos a partir da interação com os grupos tióis das proteínas e do DNA, alterando a cadeia de ligação e interferindo na síntese/divisão da parede celular (CUI; CHAE; AN, 2017; PALLAVICINI *et al.*, 2017; HAMOUDA *et al.*, 2019). As AgNP são conhecidas por desestabilizar a membrana bacteriana e aumentar a permeabilidade, levando a danos, bem como ao vazamento de constituintes celulares (SHRESTHA; KISHEN, 2016).

Porém, as características antimicrobianas já são conhecidas há séculos, sendo elas utilizadas para purificar água no armazenamento em recipientes de prata. Heródoto escreveu, em 425 a.C., que reis persas, como Ciro, o Grande, armazenavam água em vasos de prata para prevenir que ela se contaminasse durante as guerras (MCGILLICUDDY *et al.*, 2017).

As AgNP ou Ag⁰ (nano) consistem na prata metálica, com valência zero (Ag⁰) que apresenta dimensão menor que 100 nm em pelo menos uma de suas dimensões (ZHANG; HU; DENG, 2016). AgNP possuem propriedades físico-químicas distintas, incluindo alta condutividade elétrica e térmica, estabilidade química, atividade catalítica e comportamento óptico não linear (FABREGA *et al.*, 2011).

Estas NP podem apresentar diversas morfologias controladas, como nanoplaquetas (LUO *et al.*, 2011) nanoagulhas (LI, 2019), nanofolhas (WANG *et al.*,

2018), nanoflores (XIONGHUI; AIXIA, 2010), nanoesferas (CHEN; WANG; LIU, 2016), nanodiscos (BASHIR; KHAN, 2014), nano-hastes (TSUJI *et al.*, 2007), nanocubos (SARKAR; DAS, 2019), nanofios (LUO *et al.*, 2011) e nanoprismas (KHODASHENAS, BAHAREH, 2005), além da formação de associações com outros componentes (PATIL *et al.*, 2020). A forma e o tamanho das AgNP produzidas dependem de diferentes condições experimentais, tais como: temperatura, concentração de precursor de prata, pH da solução, relação molar e força da interação química entre os reagentes (KHODASHENAS, BAHAREH, 2005). Estes aspectos resultam em fatores cruciais, pois determinam os mecanismos preferenciais de internalização e eficácia da absorção, definindo assim o comportamento toxicológico destas NP em ambientes biológicos (CABALLERO-DÍAZ; VALCÁRCEL CASES, 2016).

Existem vários métodos utilizados para a fabricação de AgNP que visam gerar suspensões estáveis, com NP de forma regular e distribuição de tamanho homogêneo (KHODASHENAS, BAHAREH, 2005). Atualmente, variados métodos para produção de AgNP estão sendo utilizados, como redução química, radiação gama, microemulsões, métodos eletroquímicos, ablação a laser, autoclavagem, micro-ondas e redução fotoquímica. Estes métodos são todos eficazes, mas alguns sofrem limitações, como o uso de componentes tóxicos, alto custo operacional e necessidades energéticas (AKTER *et al.*, 2018).

Três são as principais rotas envolvidas na síntese de NP: os métodos físicos, químicos e biológicos. Na síntese biológica, ocorre produção e consequente liberação natural ao meio ambiente de AgNP resultante da síntese que utiliza tecido inativado, microrganismos, extratos vegetais ou plantas vivas. Basicamente estas NP são geradas na catálise de reações específicas e ficam biodisponíveis (MARCATO *et al.*, 2012; RAI *et al.*, 2015; GOPINATH *et al.*, 2016; EL-NAGGAR; HUSSEIN; EL-SAWAH, 2017). O ponto positivo para as sínteses biológicas é que geralmente são muito econômicas e podem ser empregadas como uma alternativa econômica de grande valia para a produção em larga escala de AgNP (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010).

Chandran *et al.* (2016) realizaram a síntese de AgNP utilizando o extrato das folhas de manjeriço (*Ocimum sanctum*) em temperatura ambiente, encapsuladas na matriz polimérica de (PVA), que resultou em alta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* gram-positivo e bactérias gram-negativas de *Escherichia coli*.

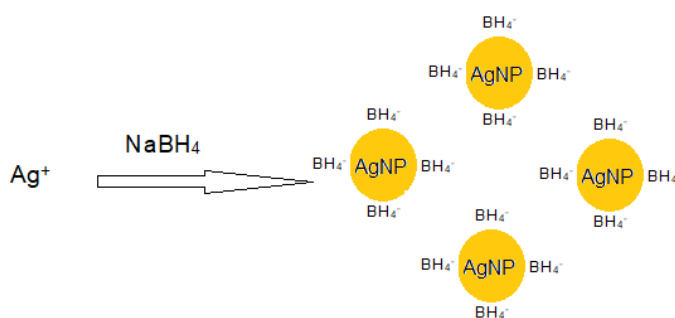
Para os métodos físicos, uma vantagem é que as AgNP formadas apresentam uma estreita faixa de distribuição de tamanho. Estes métodos compreendem técnicas de condensação física de vapor, descarga de arco, método de moagem de bolas de energia e pulverização por magnetron de corrente contínua (WEI *et al.*, 2015). Algumas desvantagens estão relacionadas com os processos físicos, como uma baixa taxa de produção de NP, geralmente ligada a um custo elevado, além do grande consumo de energia para manter a alta pressão e a temperatura frequentes nos processos relacionados à síntese (HAIDER; KANG, 2015). No estudo de Zafar *et al.* (2016), foi investigada a ação antibacteriana de AgNP sintetizadas por vias química (30-40 nm) e física por ablação a laser (20-30 nm) contra bactérias patogênicas humanas *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella*, resultando em um melhor desempenho para as AgNP que foram sintetizadas pela via física.

As metodologias mais clássicas e de comum uso para a síntese de NP usam processos químicos e podem ser subdivididas em redução química, técnicas eletroquímicas, métodos químicos assistidos por irradiação e pirólise (WEI *et al.*, 2015). As metodologias químicas apresentam ótimo custo/benefício, apresentado também grande volume na produção; entretanto, pode denotar pontos negativos, como a contaminação resultante dos componentes químicos precursores, elevada toxicidade de solventes e uma possível geração de subprodutos danosos (PANDIARAJAN; KRISHNAN, 2017). Tamanho, morfologia, estabilidade e propriedades das NP são influenciados consideravelmente por condições experimentais, como a cinética de interação com o agente redutor. Durante a síntese de AgNP, o tamanho e a agregação são controlados pela estabilização que é realizada por repulsão estérica ou eletrostática (FABREGA *et al.*, 2011).

A redução química, frequentemente utilizada para o preparo de AgNP, ocorre na forma de dispersão coloidal sintetizada em solventes orgânicos ou em água, cuja adição de compostos estabilizantes serve para impedir o crescimento e a agregação das AgNP formadas, desempenhando um papel decisivo no sucesso da síntese (LU; CHOU, 2008). Esta síntese ocorre geralmente por meio de agentes redutores, como citrato, glicose, etilenoglicol ou borohidreto de sódio, com a presença de estabilizadores coloidais adequados (BASHIR; KHAN, 2014). Algumas condições da reação, como concentrações utilizadas, agente redutor, temperatura, presença de aditivos ou estabilizantes, são fatores que resultam em diferentes morfologias e tamanhos da NP (CHERNOUSOVA; EPPLE, 2013).

No caso do borohidreto de sódio, a possibilidade de agregação das NP durante a síntese está relacionada à adsorção deste, que desempenha um papel fundamental na estabilização de AgNP em formação, fornecendo uma carga de superfície de partículas. Para que isso ocorra, deve haver uma quantidade significativa de borohidreto de sódio para estabilizar as partículas à medida que a reação acontece, conforme esquematizado na Figura 1 (MELO *et al.*, 2012). Esse excesso na presença deste redutor facilita a geração instantânea de núcleos, resultando na formação de coloides de AgNP de tamanho uniforme e monodisperso (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014).

Figura 1 - Forças repulsivas geradas pela adsorção de borohidreto separando as AgNP.



Fonte: Adaptado de Melo *et al.*, (2012).

Frequentemente, após a síntese de AgNP, estas tendem a se agregar depois de algumas horas ou dias se a estabilização coloidal for insuficiente. Como exemplos de bons estabilizadores comumente utilizados pode-se citar os polímeros, como poli (N-vinilpirrolidona) (PVP) e o álcool polivinílico (PVA), citrato, polietilenoglicol (PEG), albumina de soro bovino (BSA) e polissacarídeos (ANDREANI *et al.*, 2017). Esta adição de cadeias poliméricas na superfície das NP pode levar à estabilização estérica das partículas (LACAVE *et al.*, 2017).

O álcool polivinílico (PVA) é um produto biodegradável, sendo um polímero com propriedades únicas, que apresenta boa resistência, alta cristalinidade, não é tóxico e é utilizado na fabricação de medicamentos, filmes plásticos de embalagens, produtos utilizados em cirurgia, bem como em sistemas controlados para entrega de fármacos no organismo (SARWAR *et al.*, 2018). O PVA tem sido amplamente utilizado em sínteses de AgNP (KHANNA *et al.*, 2005; ABDUL KAREEM; ANU KALIANI, 2011;

CHANDRAN *et al.*, 2016; ANDREANI *et al.*, 2017; SARWAR *et al.*, 2018), por apresentar alta transmitância e solubilidade em água, onde as NP metálicas, como AgNP, podem ser facilmente sintetizadas em meio aquoso, tornando a preparação não tóxica e ecológica por causa do subproduto sólido nulo, quanto ao PVA (ABDUL KAREEM; ANU KALIANI, 2011). Por exemplo, Becaro *et al.* (2015) realizaram a síntese de AgNP utilizando PVA como agente estabilizador na redução do nitrato de prata (AgNO_3), na presença de borohidreto de sódio (NaBH_4), produzindo nanoesferas monodispersas com diâmetros na faixa de 2-18 nm.

A partir da grande variedade de métodos de síntese, bem como da ampla gama de aplicação, a utilização de AgNP em produtos comerciais está aumentando de forma rápida, representando a NP de maior uso (ZHANG *et al.*, 2019). Atualmente, exemplos de onde AgNP são utilizados incluem filtros de água, tintas, cosméticos, desodorantes, têxteis e vestuário (YETISEN *et al.*, 2016), embalagens de alimentos, plásticos funcionalizados, dispositivos médicos, curativos para feridas, aparelhos elétricos, como máquinas de lavar roupa, geladeiras, detergentes, biossensores e produtos biomédicos. Portanto, o risco de exposição ambiental, onde provavelmente bioacumularão e persistirão, é cada vez mais significativo (FABREGA *et al.*, 2011).

Mas este crescimento exponencial da sua utilização também resulta num aumento da liberação destas partículas para o ambiente, nos seus compartimentos aquáticos e terrestres (RIBEIRO *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2020), onde uma vez liberadas, as condições locais como pH e temperatura podem vir a alterar sua mobilidade, agregação, biodisponibilidade e toxicidade (RÖMER *et al.*, 2011).

As AgNP podem entrar em ecossistemas aquáticos a partir de efluentes de estações de tratamento, liberação direta de produtos contendo NP, escoamento de fontes terrestres ou até pelo ar (MAHDI *et al.*, 2017). Uma vez liberado no ambiente aquático, o seu comportamento vai depender de suas características, como forma, tamanho, composição química, carga de superfície, revestimento e estado da partícula (EL BADAWEY *et al.*, 2011). Estas NP podem também complexar com ligantes e, em seguida, aglomerar, reagindo com a fração orgânica dissolvida e com particulados naturais, de modo a liberar íons ou ainda se manter como NP no meio (GONÇALO VALE *et al.*, 2015; CHÂTEL; MOUNEYRAC, 2017).

2.2.2 AgNP e impactos ao meio ambiente

Como as AgNP produzidas e descartadas aumentam a cada dia, a quantidade destas NP em sistemas aquáticos e terrestres também cresce consideravelmente (WU *et al.*, 2020) e podem ser liberadas no meio ambiente durante a fabricação, durante seu uso, disposição e indiretamente no final do ciclo de vida do produto (KRYSTEK *et al.*, 2016). Consequentemente, há um esforço considerável para antecipar o destino ambiental e a toxicidade de uma série de NM, como a AgNP. Como possíveis efeitos tóxicos nos ecossistemas podem aumentar, torna-se necessário avaliar o efeito da toxicidade em organismos (MACKEVICA *et al.*, 2015; CUI; CHAE; AN, 2017).

Como a exposição às NP vem suscitando preocupações com os potenciais riscos para a saúde, um campo especializado no estudo desta toxicidade surgiu para avaliar os potenciais riscos associados às NP. Este campo ficou conhecido como nanotoxicologia e envolve a compreensão de efeitos biológicos adversos de NP em células, tecidos, órgãos e organismos em geral. Uma das principais causas de nanotoxicidade é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por intermédio da interação dos NP com moléculas biológicas, como proteínas, lipídios e DNA, resultando em estresse oxidativo, peroxidação lipídica e inflamação (FU *et al.*, 2014; WONG; HU; BAEG, 2017).

Deve-se destacar que um dos maiores desafios da pesquisa de nanotoxicologia é considerar a diversidade das composições químicas e propriedades físicas dos NP. Isto pode determinar seus mecanismos de interação com sistemas biológicos, resultando em danos aos organismos, onde novas gerações de NP estão aparecendo com enorme diversidade química e morfológica. Isso resulta em modos de interação diversificados com os organismos, dificultando assim o estabelecimento de protocolos para avaliação (CABALLERO-DÍAZ; VALCÁRCEL CASES, 2016).

Existem propriedades das NP que são comumente aceitas em estudos de caracterização para fins de avaliação de nanotoxicidade. Estes podem incluir a composição química, o tamanho, a forma, a organização de sua superfície, sua cristalinidade, o modo como se encontra a aglomeração e/ou agregação das partículas, entre outras (CABALLERO-DÍAZ; VALCÁRCEL CASES, 2016; KRYSTEK *et al.*, 2016).

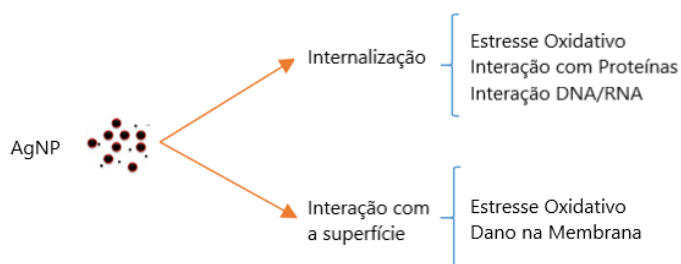
Haverá diferença entre materiais nanométricos e micrométricos em relação à sua toxicidade e outros efeitos biológicos, e isto se deve ao fato de que os efeitos biológicos das NP serão modificados devido ao tamanho, constituição química, estrutura de superfície, solubilidade, forma e estado de agregação (WANG *et al.*, 2016). Estudos de toxicidade com AgNP demonstraram que partículas menores apresentam-se um tanto mais eficientes em células, possibilitando uma maior biodisponibilidade intracelular comparadas às substâncias com partículas de tamanho maiores (IVASK *et al.*, 2014)

A nanotoxicidade relacionada ao tamanho das AgNP foi recentemente verificada em estudos com glóbulos vermelhos de peixes *Carassius auratus*, em que NP com tamanho de 50 nm demonstraram níveis altos de adsorção e absorção, mas as NP de tamanho menor (AgNP 15 nm) foram mais citotóxicas, resultando em fenômenos como de estresse oxidativo (CHEN *et al.*, 2015).

Alguns autores inclusive sugerem que, para serem consideradas como uma variável de maior relevância nos resultados de seus efeitos biológicos, as NP deveriam apresentar um limiar de até 15 nm de diâmetro, pois assim apresentam também uma maior distribuição nos organismos afetados (DE JONG *et al.*, 2008; PUZYN *et al.*, 2011; IVASK *et al.*, 2014).

Os efeitos das nanopartículas em ecossistemas aquáticos são produzidos essencialmente por danos oxidativos (internalização nas células) e interação entre as NP e a membrana celular (neste caso sem internalização) (Figura 2).

Figura 2 - Efeitos das AgNP em organismos



Fonte: Adaptado de McShan, Ray E Yu (2014).

Esta interação com a membrana celular está relacionada a duas variáveis: atração eletrostática ou presença de grupos tiol localizados nas proteínas da parede celular. Ambas as interações desestabilizam a membrana. Vários biomarcadores e

técnicas de expressão gênica são usadas para monitorar esses efeitos, com base em proteínas tiol (resposta antioxidante que gera espécies químicas) e enzimas, em que vários metabólicos relacionados à atividade e à integridade da membrana são estudados (LAPRESTA-FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ; BLASCO, 2012).

Os efeitos tóxicos das AgNP nos organismos, propriamente como NP ou na liberação íons Ag^+ , estão principalmente relacionados a danos na membrana celular e aos componentes celulares (PATIL *et al.*, 2020). Em essência, o estresse oxidativo induzido por AgNP e subsequente perturbação do equilíbrio redox celular e da função mitocondrial têm sido reconhecidos como os maiores mecanismos de toxicidade da prata que finalmente levam à morte celular *in vivo* e *in vitro* (AKTER *et al.*, 2018; PATIL *et al.*, 2020).

A desestabilização da membrana celular se deve à interação das AgNP com a bicamada fosfolipídica, por meio da presença de grupos tiol nas proteínas da parede celular, causando perturbação da homeostase celular e resultando numa consequente diminuição no gradiente eletroquímico que pode colapsar a membrana (SU *et al.*, 2009; LAPRESTA-FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ; BLASCO, 2012; AKTER *et al.*, 2018).

Entretanto, como AgNP são instáveis em ambientes fisiológicos ou naturais complexos — e esta instabilidade tende a transformar estas NP nas variadas condições de exposição, inclusive reagindo com outros compostos químicos —, a natureza dos efeitos de possíveis coexposições em organismos necessita de maiores estudos, de modo a compreender as interações com variados componentes em mais organismos (ZHANG; XIAO; FANG, 2018). Estudo recente demonstrou que níveis de MDA, GSH e atividades de SOD e CAT foram impactados no fígado de *C. gariepinus* após a exposição à AgNP, óxido de cobre e sua mistura (OGUNSUYI *et al.*, 2019). Zhang *et al.* (2015) em seu estudo, relataram que a redução com luz solar do íon de prata para AgNP por matéria orgânica atenua a toxicidade aguda da prata para *D. magna*.

2.3 AGROTÓXICOS

Temos presenciado, durante as últimas décadas, um aumento significativo da produção agrícola para que a população tenha acesso a alimentos. Mas notadamente este aumento está diretamente ligado ao uso e desenvolvimento de novos pesticidas,

que se tornaram fundamentais na moderna agricultura (MORILLO; VILLAVARDE, 2017).

Contudo, um grande percentual destes pesticidas aplicados acabam não atingindo os organismos alvo, sendo então lixiviados para o meio ambiente, podendo ser detectados com facilidade em amostras de água, ar, solo e também nos alimentos, sendo necessário ter atenção tanto em nível local, como global (NITI et al., 2017).

O aumento da contaminação causada pela variedade e quantidades aplicadas de agrotóxicos representa uma ameaça significativa para o meio ambiente, bem como para a saúde dos organismos (XU *et al.*, 2017). Quando estes produtos químicos são liberados no meio ambiente, os resultados muitas vezes trazem prejuízos, como mudanças na dinâmica populacional, ou na composição e funcionamento dos ecossistemas (JANSEN *et al.*, 2011).

Quando um agrotóxico é aplicado no campo, uma ampla porcentagem acaba indo para o solo e inúmeros fatores podem afetar sua destinação final — fatores como o sistema de plantio, as transformações das propriedades hidráulicas do solo e o transporte de águas provenientes das chuvas através do perfil do solo (OKADA; COSTA; BEDMAR, 2016). Existem aspectos que estão atrelados às características intrínsecas do produto químico, como, por exemplo, adsorção, solubilidade e persistência (LUPI et al., 2019). Outros fatores que influenciam a destinação final estão ligados às propriedades físico-químicas e biológicas do solo, tais como a fração orgânica, umidade, biomassa, porosidade e pH. Estas últimas ainda podem sofrer alterações relacionadas às características climáticas da região, como umidade e temperatura (OKADA; COSTA; BEDMAR, 2016).

Os agrotóxicos basicamente podem ser definidos como substâncias utilizadas pelos seres humanos para matar organismos indesejáveis (pragas) e para preservar os produtos agrícolas. Com base na sua ação em relação a pragas alvos, os agrotóxicos mais empregados são inseticidas e herbicidas seguidos de fungicidas, acaricidas, nematicidas, entre outros. A maioria destes traz sérios problemas ambientais por serem poluentes orgânicos persistentes (RANI; SHANKER; JASSAL, 2017).

Dentre os agrotóxicos, os herbicidas estão amplamente dispersos em todo o ambiente devido ao seu uso extensivo pela agricultura, bem como seu uso doméstico. Embora a maioria dos herbicidas seja aplicada principalmente em ambientes terrestres, estes podem ser carregados para ecossistemas aquáticos quando há um

maior grau de conectividade hidrológica entre esses dois ambientes (LUPI *et al.*, 2015; MAHDI *et al.*, 2017).

Comumente, herbicidas são localizados em diferentes ambientes aquáticos, ainda que em concentrações variáveis. Esta frequente ocorrência, bem como seus efeitos potencialmente prejudiciais ao meio ambiente, destacam a necessidade contínua de se estudar a toxicidade relacionada aos herbicidas (LESSARD; FROST, 2012).

2.4 GLIFOSATO

O glifosato (N-(fosfonometil)glicina, $C_3H_8NO_5P$) (Gly) é um herbicida sistêmico de amplo espectro que também é utilizado como dessecante de culturas. É um composto organofosforado, que contém três grupos funcionais: uma carboxila, uma amina e um grupo fosfonato, que podem reagir e formar ligações covalentes, servindo com um agente quelante (HANSEN; ROSLEV, 2016).

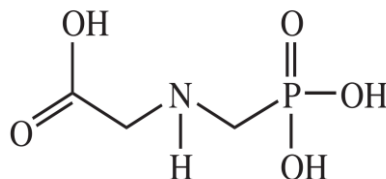
O Gly é altamente polar e solúvel em água (12 g/L em 25 °C), sendo praticamente insolúvel na presença de solventes orgânicos, como por exemplo acetona e etanol. Apresenta densidade aparente de 0,5 g/cm³, e o ponto de fusão de 200 °C, sendo estável na presença de luz, até mesmo em temperaturas acima de 60 °C (BATTAGLIN *et al.*, 2005; CAETANO, 2011). Apresenta também meia vida no solo e na água, esta variando de dias a anos, dependendo da composição do solo (ROY *et al.*, 2016).

O Gly foi introduzido ao mercado na década de 70, formulado com a marca Roundup®, apresentando grande eficácia para uma variedade de ervas terrestres e aquáticas (YUSOF; ISMAIL; ALIAS, 2014).

Os herbicidas à base de Gly são comumente empregados, sobretudo, antes do plantio de culturas agrícolas tradicionais, como a soja e o milho, bem como após o plantio de espécies agrícolas geneticamente modificadas, que resultam em resistência ao glifosato. O agrotóxico é também utilizado em áreas urbanas para o controle de ervas daninhas, como nas ruas e nos parques, em horticultura, silvicultura e em jardins (LE *et al.*, 2010; VAN BRUGGEN *et al.*, 2018). Até mesmo para o controle de plantas aquáticas, dá-se o uso do herbicida em questão (CLEMENTS *et al.*, 2017).

Gly é comumente utilizado como um ingrediente ativo em mais de 750 produtos comerciais herbicidas de amplo espectro, o que aumenta consideravelmente a possibilidade de sua biodisponibilidade no ambiente. Ele é normalmente formulado como sal de isopropilamina de glifosato (KWIATKOWSKA *et al.*, 2017). A Figura 3 apresenta a estrutura química da molécula de Gly.

Figura 3 - Estrutura química da molécula de glifosato



Fonte: (COUTINHO; MAZO, 2005).

A alta solubilidade do Gly em água traz malefícios, pois durante a ocorrência de chuvas pode ser facilmente lixiviado de áreas em que foi aplicado para corpos d'água circundantes, embora aplicado em ambiente principalmente terrestres (LESSARD; FROST, 2012), podendo ser encontrado também em águas subterrâneas (SILVA *et al.*, 2018).

Pesquisas apontam que desde a década de 90 o Gly já era encontrado em corpos hídricos na região sul do Brasil (ZEBRAL *et al.*, 2018). Um exemplo claro disto é o rio Paraná, sexto maior do mundo, que transpassa áreas agrícolas, industriais e urbanas em sua extensão, que foi submetido a um estudo no ano de 2016. Os resultados mostraram a presença de resíduos de glifosato na água e nos sedimentos do rio, na divisa com a Argentina e demais pontos neste país (RONCO *et al.*, 2016). Esta facilidade no transporte pode indicar um potencial de se espalhar no ecossistema e alcançar alvos não intencionais, como plantas e animais em geral (SZÉKÁCS *et al.*, 2014).

Sua atuação se deve à inibição do crescimento da planta, interferindo na via biossintética dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) essenciais para o crescimento da maioria das plantas, sendo precursores de outros produtos, como lignina, alcaloides, flavonoides, ácidos benzoicos e vitamina K, inibindo a enzima 5-enolpiruvishiquimato-3-fosfato sintetase, (EPSPS) que existe apenas em plantas, algas e bactérias superiores (VANNINI *et al.*, 2016; SÉGUIN *et al.*, 2017). Entretanto, diferentes estudos mostraram efeitos prejudiciais do Gly no

desenvolvimento e crescimento de uma grande variedade de organismos (SULUKAN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; DUAN *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2020).

Efeitos adversos devido a exposição de seres vivos ao Gly têm sido relatados na literatura, como por exemplo em peixes (LI *et al.*, 2017; ROY *et al.*, 2016; YUSOF *et al.*, 2014), em ostras (MOTTIER *et al.*, 2015; SÉGUIN *et al.*, 2017), alterações no sistema de defesa antioxidante da mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* (DE AGUIAR *et al.*, 2016), diminuição da acetilcolinesterase e alteração de núcleos de espermatozoides em ratos (CASSAULT-MEYER *et al.*, 2014; LARSEN *et al.*, 2016), indução da apoptose em cianobactérias *Microcystis aeruginosa* (WU *et al.*, 2016), redução da fertilidade em *Austrolebias nigrofasciatus* (ZEBRAL *et al.*, 2018).

Em seres humanos observou-se ligação entre o aumento do uso de herbicidas à base de Gly com um aumento na incidência de Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) em crianças, seja este contato realizado através do ar, da água ou da alimentação (FLUEGGE; FLUEGGE, 2016).

Em um estudo crônico, Vázquez *et al.* (2020) alimentaram larvas de abelhas *in vitro* com alimentos contendo glifosato, e apesar de visualizarem 29% dos indivíduos sem sinais de toxicidade, foram constatadas alterações transcricionais em vários genes após a ingestão crônica de Gly.

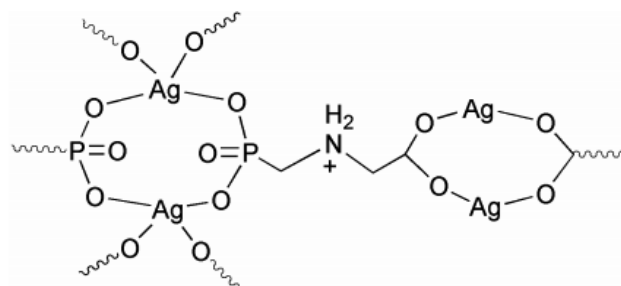
Como na molécula de Gly existe uma ligação entre carbono e fósforo, a degradação se torna mais difícil. Porém, no ambiente, ela acaba sendo realizada por microrganismos do solo e em plantas, gerando o ácido aminometilfosfônico (AMPA), podendo, então, não somente o resíduo do glifosato, como também o de AMPA serem encontrados no ambiente, principalmente em lixiviados agrícolas e efluentes de águas residuais urbanas. (LUPI *et al.*, 2015; GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

Gly também tem a capacidade de complexar metais, que ocorrem naturalmente no meio ambiente, e que também podem ser encontrados como poluentes em águas superficiais em coexistência com o Gly. A complexação do Gly com metais pode resultar em substâncias com características físico-químicas alteradas quando relacionadas aos compostos originais (HANSEN; ROSLEV, 2016). Alguns estudos acabam sugerindo que esta complexação com metais diminuirá a absorção e aumentará a mobilidade ambiental (BARRETT; MCBRIDE, 2006).

O grupo fosfonato ($R-PO(OH)_2$) presente neste agrotóxico apresenta a capacidade de formar complexos fortes na presença de metais, como cobre, zinco e níquel. Ações de biodegradação, adsorção e fotodegradação dos fosfonatos são alteradas na presença de íons metálicos, ocorrendo então o surgimento de complexos solúveis e não solúveis. No glifosato, os dois demais grupos funcionais (amino e carboxila) também podem ligar-se intensamente com íons metálicos, sobretudo com os de transição, como a prata em pH na proximidade de neutro, em que a carboxila e fosfonato estão desprotonados (COUTINHO; MAZO, 2005)

O complexo formado com a prata, representado na Figura 4, é uma estrutura de cadeia linear, ligada através do grupo carboxila e íons Ag^+ coordenados com os oxigênios do outro grupo fosfonato (COUTINHO; MAZO, 2005). O resultado é a alternância de ligações com a molécula de Gly e seus centros de metal coordenados, formando um complexo contínuo com poucas associações intercadeia, resultando numa estrutura com morfologia cristalina densa (SAGATYS *et al.*, 2000).

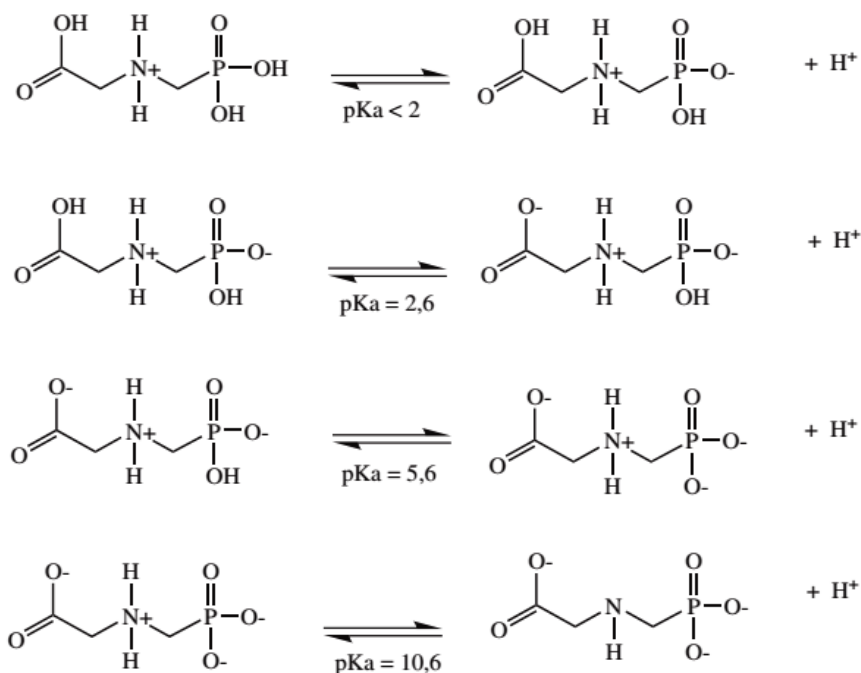
Figura 4 - Representação de um esquema ilustrativo do composto formado pela complexação entre glifosato e prata



Fonte: Sagatys et al. (2000)

Para ocorrência destas ligações, o Gly apresenta um encadeamento de equilíbrios com as seguintes constantes de dissociação ácida (pK_a): <2,0, 2,6, 5,6 e 10,6, como mostrado na Figura 5. Em pH abaixo de 2,0 o glifosato exibe carga positiva, o que contribui para sua adsorção à argila e matéria orgânica do solo, possuindo carga negativa. Enquanto em pH acima de 2,6, o glifosato apresenta carga zero e o número de cargas negativas conforme o pH vai aumentando. Já em pH acima de 12, praticamente todo o glifosato está na forma trianiônica.

Figura 5 - Equilíbrios e constantes de dissociação do herbicida glifosato.



Fonte: De Amarante Junior et al. (2002), Coutinho e Mazo (2005)

Estudos sobre a biodisponibilidade e a ecotoxicidade resultantes da complexação glifosato-metal demonstram um aumento na persistência ambiental, que se deve a uma biodegradação mais lenta e que acaba por atrasar uma possível desintoxicação biológica. Alguns estudos indicam que os complexos de glifosato-metal podem aumentar a bioacumulação de metais e resultar em toxicidade alterada em comparação aos compostos individuais (O DUKE; B POWLES, 2008; HANSEN; ROSLEV, 2016). Em muitas formulações comerciais, alguns compostos adjuvantes são adicionados ao princípio ativo com a finalidade de melhorar a eficiência do produto comercial, promovendo uma melhoria na penetração do ingrediente ativo na cutícula da planta (YUSOF; ISMAIL; ALIAS, 2014).

Estes adjuvantes são comumente avaliados como biologicamente inertes pelos fabricantes e agências de proteção, o que causaria poucas consequências em termos de toxicologia ambiental (SÉGUIN *et al.*, 2017). Entretanto, estudos com o surfactante polioxietileno amina (POEA) adicionado em formulações comerciais demonstraram que este composto é considerado mais tóxico que os glifosato puro, bem como a combinação dos dois é ainda mais tóxica (YUSOF; ISMAIL; ALIAS, 2014).

2.4.1 Gly e suas implicações

Os fabricantes do Gly anunciam a “baixa toxicidade e respeito ao meio ambiente” dos herbicidas à base de Gly. No entanto, de acordo com as informações das respectivas fichas de dados de segurança química, os herbicidas à base de Gly são classificados como perigosos para o ambiente aquático (tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros) (SIHTMÄE *et al.*, 2013).

No Brasil, temos a Resolução CONAMA 410/09, que traz a classificação dos corpos d’água e estabelece a concentração máxima permitida de diversas substâncias, de acordo com as diferentes classes de água. Nas águas enquadradas em classes 1 e 2, destinadas ao abastecimento para o consumo humano e à proteção das comunidades aquáticas, a concentração máxima permitida de Gly é de 65 µg/L (BRASIL, 2005). Porém, nenhuma norma estabelece a recomendação sobre dose diária de ingestão para o Gly no Brasil (SOLOMON, 2019).

Existem variados níveis aceitáveis de ingestão diária estabelecidos por órgãos fiscalizadores. Para a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), o limiar para ingestão diária aceitável proposta (IDA) foi calculado em 0,5 mg/kg por dia. O nível para efeito adverso não observado corresponde a 100 mg/kg por dia. (XU *et al.*, 2019).

Já a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) afirmou que não há riscos de preocupação para a saúde humana quando o Gly é usado de acordo com o rótulo. Atualmente, a classificação do glifosato como potencial cancerígeno é controversa, mas a USEPA também afirma que é improvável que o Gly seja um agente cancerígeno humano (USEPA, 2020). A partir disso, o equivalente da USEPA ao IDA é a dose de referência (DRf), que foi calculada em 1,75 mg/kg de peso corporal/dia. Nesse caso, o nível para efeito adverso não observado corresponde a 175 mg/kg por dia em estudos de teratogenicidade de coelhos (SINGH *et al.*, 2020). Entretanto, dois estudos atuais, publicados em revistas de qualidade, determinaram uma ligação entre a exposição ao Gly e o linfoma não-Hodgkin, sendo conflitante com as normas locais (LEON *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019).

Mesnager *et al.* (2015) relataram que foram detectados efeitos adversos, como pela ruptura endócrina e estresse oxidativo, causadores de efeitos teratogênicos, tumorigênicos e hepatoreniais dentro da faixa da ingestão diária aceitável recomendada. Já em quantidades maiores, estudos também relatam efeitos, como

indução de danos no Ácido Desoxirribonucleico (DNA) em leucócitos e em células mononucleares de sangue, causando metilação de DNA em humanos (KWIATKOWSKA *et al.*, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em março de 2015, decidiu alterar a classificação de glifosato na categoria 2A (Grupo de Trabalho do IARC, 2015), significando que o Gly é considerado “provavelmente cancerígeno para humanos”. O que se têm são informações conflitantes e desconexas sobre os reais efeitos do Gly, tanto pra a saúde, quanto para o meio ambiente (MCCLELLAN, 2016).

A preocupação que surge é que o uso — na maioria das vezes indiscriminado — de Gly afeta não apenas as culturas visadas, mas também apresenta riscos à saúde de espécies animais não visadas em diferentes compartimentos, como os ecossistemas aquáticos, que podem ser contaminados com herbicidas à base de Gly por lixiviação, escoamento ou pulverização, que podem acarretar em malefícios para saúde e para o meio ambiente (PÉREZ; VERA; MIRANDA, 2011; LUPI *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2020). Assim, os produtos herbicidas que entram nos corpos d'água são potencialmente prejudiciais para as populações de peixes e outras formas de vida aquática consideradas organismos não-alvo (GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017; SÁNCHEZ *et al.*, 2017).

Nestes compartimentos, o Gly não se apresenta isolado ou inativo, estando em contato com outras substâncias e provocando efeitos muitas vezes diferentes se comparados aos efeitos do Gly isolado (SOLONESKI; RUIZ DE ARCAUTE; LARRAMENDY, 2016; WANG *et al.*, 2017). Por exemplo, o estudo de Hansen e Roslev (2016) traz respostas comportamentais de *D. magna* juvenil após exposição a complexos de Gly e Gly-cobre, em que houve uma diminuição da toxicidade com o com a mistura Gly-cobre em relação ao Gly isolado.

O estudo de Jumarie, Aras e Boily (2017) revelou que misturas de Gly, atrazina e Cádmio (Cd), em níveis ambientalmente relevantes em abelhas, podem modificar o metabolismo do ácido retinóico em etapas a jusante da formação de retinaldeído, resultando também em peroxidação lipídica. As misturas de Gly e Cd, também reduzem os teores de α e β -caroteno nos indivíduos.

2.5 MISTURAS

A mensuração dos impactos ambientais dos poluentes tem enfoque usual na avaliação de produtos químicos individualizados. Contudo, os organismos habitam em ambientes geralmente contaminados por misturas de produtos químicos, sendo expostos a potenciais efeitos adversos por meio das interações entre estes produtos, onde a influência mútua pode vir a causar um aumento ou até mesmo uma atenuação dos efeitos tóxicos (DI POI *et al.*, 2017; JUMARIE; ARAS; BOILY, 2017; LIU *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-DONCEL *et al.*, 2020).

Os compartimentos ambientais são comumente poluídos com uma abundância de compostos e, conseqüentemente, representam condições complexas em termos de avaliação de toxicidade. Acaba sendo difícil encontrar um sistema aquático, ou algum outro sistema ambiental que apresente contaminação por um poluente isolado (GONZÁLEZ-DONCEL *et al.*, 2020). Na maioria das vezes, diversas substâncias nocivas se encontram juntas, o que pode levar a prováveis interações entre tais poluentes e alterações ambientais, bem como nos organismos testados (MANSOUR; GAD, 2010; JUMARIE; ARAS; BOILY, 2017; ANYANWU *et al.*, 2018; YIN *et al.*, 2020).

Na maioria dos estudos relacionados a misturas, a toxicidade é avaliada levando em consideração dois modelos de referência comumente usados: a adição de concentração (AC) — modelo proposto por Loewe, em 1926 — e a ação independente (AI) — proposto por Bliss, em 1939 (DERUYTTER *et al.*, 2017; PUCKOWSKI *et al.*, 2017).

O modelo de AC é empregado para misturas de substâncias que agem pelo mesmo mecanismo (tem o mesmo modo de ação). De acordo com a AC, o efeito tóxico conjugado de uma mistura é o resultado da soma das concentrações ponderadas dos constituintes da mistura. Este chamado fator de ponderação é a “potência tóxica” relativa dos constituintes da mistura. A concentração ponderada é apresentada como unidade tóxica (UT), que é a concentração de determinado constituinte da mistura, dimensionado para sua concentração de efeito quando aplicado isoladamente (NYS *et al.*, 2017).

Um exemplo de trabalho com a utilização desta metodologia, foi o estudo da coexposição da mistura de cádmio (II) com o composto orgânico 4-n-nonilfenol, que

resultou em efeito sinérgico nos tratamentos, ocasionando a inibição do crescimento e estresse oxidativo em *Chlorella sorokiniana* (WANG *et al.*, 2018).

O conceito da AI, adota que os elementos da mistura não partilham de um mecanismo análogo de toxicidade, assumindo assim que a resposta combinada de uma mistura pode ser calculada com base no produto das respostas esperadas dos constituintes individuais da mistura, quando aplicados individualmente, podendo utilizar também a UT como referência (RODEA-PALOMARES *et al.*, 2015; NYS *et al.*, 2017).

Todavia, AC e AI são modelos aceitáveis de referência em muitos estudos toxicológicos, sendo AC geralmente empregados em misturas de substâncias com modos de ação semelhantes, e AI em misturas de substâncias com diferentes modos de ação (PUCKOWSKI *et al.*, 2017). Cabe ressaltar que os variados modelos para a previsão e análise das interações em misturas nos fornecem uma estrutura de referência, muitas vezes quantitativa, que ainda é questionável devido às múltiplas formas de interação dos compostos nos variados organismos (SPURGEON *et al.*, 2010; ANYANWU *et al.*, 2018).

As principais interações toxicológicas em uma mistura podem ser classificadas como efeito aditivo, efeito sinérgico, antagonismo e potencialização. Efeito aditivo pode ser definido pelo somatório dos efeitos dos diferentes constituintes da mistura. Já efeito sinérgico se deve a um resultado final com efeito maior do que se considerados os resultantes de cada constituinte isolado. Antagonismo refere-se a um efeito diminuído ou à inativação de efeitos a partir da junção de dois ou mais constituintes da mistura. Por último, a potencialização pode ser definida quando um constituinte que não apresenta efeito tóxico, o que potencializa os efeitos de um segundo quando ocorre a mistura (RODEA-PALOMARES *et al.*, 2015; VAZ, 2020).

Um exemplo de modelo utilizado para avaliar as interações é o modelo de Abbott, que originalmente foi concebido como um método para o cálculo da eficácia de inseticidas (ABBOTT, 1925). Abbott é amplamente utilizado, e compara inibições esperadas e observadas que se enquadram no conceito de AI (ZHONG *et al.*, 2018). A estimativa de interação é realizada com base na relação da mortalidade induzida de indivíduos pelo tratamento com compostos individuais, estimando a relação da junção destas (efeito esperado) com a mortalidade observada nos testes. Esta relação resulta

na razão de inibição (RI), onde para $RI < 1$ considera-se efeito antagônico, $RI > 1$ efeito sinérgico e $RI = 1$ efeito aditivo (ISWARYA *et al.*, 2016).

Por exemplo, Gatidou e Thomaidis (2007) utilizaram o modelo de Abbott para verificar as interações esperadas para uma mistura das substâncias Irgarol 1051, Diuron, seus metabólitos, e cobre em *Dunaliella tertiolecta* e *Navicula forcipata* tratadas com concentrações diversas dos compostos. O modelo também foi utilizado por Liu *et al.* (2019) no estudo dos efeitos de coexposição de Gly e cobre sobre o desenvolvimento e alteração enzimática em *Salvinia natans*.

Estudos de coexposição estão surgindo devido à preocupação dos efeitos em diversos organismos, como, por exemplo, de AgNP com o herbicida quiral imazethapyr em *Arabidopsis thaliana*, que resultou em liberação de Ag^+ de AgNP e gerou maior ecotoxicidade (WEN *et al.*, 2016). Outro estudo de relevância, quando se leva em consideração a mistura de NP com agrotóxicos, foi o de Mukherjee *et al.* (2017). Nesse estudo, foi testada a coexposição de AgNP com 4,4'-dicloro-difenil-dicloroetileno (DDX), dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e Clordano, observando-se a uma redução do efeito tóxicos destes pesticidas persistentes em minhocas, onde a absorção destes agrotóxicos foi reduzida, não resultando em efeitos na sobrevivência das minhocas tratadas.

Outro exemplo é o estudo dos efeitos da toxicidade aguda em *Aliivibrio fischeri* e *D. magna* usando 3 metais pesados (Cu, Cd, Pb), 3 pesticidas orgânicos (Triazophos, Chlorpyrifos-Me e Profenofos) e suas misturas, que resultou em potenciação dos efeitos para as misturas de Cu + Cd e Pb + Cd, enquanto a mistura de Cu + Pb apresentou efeito aditivo em *D. magna*. Já as misturas terciárias dos pesticidas ou dos metais resultaram em efeitos antagônicos (MANSOUR *et al.*, 2015). Relevante resultado obteve-se com mistura entre agrotóxicos e NP, em que o Al_2O_3 de tamanho nanométrico reduziu os efeitos tóxicos agudos do inseticida thiacloprid no inseto *Chironomus riparius* (LORENZ *et al.*, 2017).

A pesquisa de Campos-Gracia *et al.* (2015) demonstrou que exposição de peixes Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ao carbofurano na presença de nanotubos de carbono levou a um aumento de mais de cinco vezes na toxicidade aguda do carbofurano, demonstrando que os nanotubos de carbono atuam como transportadores de pesticidas, aumentando o acúmulo dessas toxinas em peixe de água doce, afetando a sobrevivência, o metabolismo e o comportamento dos organismos testados.

Como resultado da quantidade considerável de agrotóxicos empregados na agricultura e seus usos diversos, bem como o uso extensivo de AgNP em variados produtos comerciais, essas substâncias inevitavelmente estarão presentes em uma coexposição no ambiente, simultaneamente a misturas binárias ou até sequencialmente. Portanto, possíveis efeitos devem ser investigados (WILKE *et al.*, 2018).

Apesar do incremento no número de estudos, ainda há uma falta de dados toxicológicos para o resultado de interações dos produtos comerciais habilitados com NP e agrotóxicos, para que com estes dados, a avaliação de risco e a possível regulamentação com dados toxicológicos sejam implementadas (PEREIRA *et al.*, 2019).

2.6 TESTES DE TOXICIDADE

Testes de toxicidade consistem em experimentos laboratoriais com a finalidade de avaliar os efeitos danosos dos compostos a serem analisados, como também o seu grau de toxicidade. Para isto, os organismos vivos são expostos a variadas concentrações dos compostos de interesse, analisando-se os efeitos adversos resultantes sobre estes organismos, como imobilidade, morte, alterações físicas, morfológicas e funcionais, entre outros (MATIAS, 2009; ROSSETTO, 2016).

Estes testes representam instrumentos de grande importância na avaliação dos efeitos nos sistemas biológicos, bem como seus efeitos no ambiente, podendo ser empregados na avaliação do potencial de risco ambiental dos diversos contaminantes (COSTA *et al.*, 2008).

A duração do teste de toxicidade aguda consiste geralmente em uma exposição de até 96 horas. Este efeito de toxicidade geralmente é demonstrado por meio da concentração letal média (CL₅₀) ou da concentração efetiva média (CE₅₀). A CE₅₀ está relacionada à concentração real da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos no período de exposição, em determinadas condições de teste, sendo estas geralmente avaliadas pela imobilidade ou mortalidade (MATIAS, 2009; ROSSETTO, 2016).

Já os testes de toxicidade crônica se remetem a testes de longa duração, cuja exposição é continuada por um período de tempo considerável, que compreende todo

ou parte do ciclo de vida do organismo a ser estudado. Mesmo não apresentando resultados significativos nos ensaios de toxicidade aguda, este não é indicativo de que não haverá alterações em níveis crônicos (MATIAS, 2009; ROSSETTO, 2016). Os objetivos deste tipo de teste são avaliar os efeitos subletais, como as modificações nas atividades bioquímicas, respiratórias, alterações no desenvolvimento morfológico e funções biológicas, bem como efeitos na reprodução e no crescimento, não resultando na morte do organismo (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Comumente, os resultados dos testes de toxicidade crônica são expressos por meio da concentração de efeito observado (CEO). A CEO consiste em identificar a menor concentração que causa efeito sobre os organismos, bem como a concentração de efeito tóxico não observado (CENO), que nada mais é do que a maior concentração do composto que não resulta em efeito sobre os organismos (COSTA *et al.*, 2008; MATIAS, 2009).

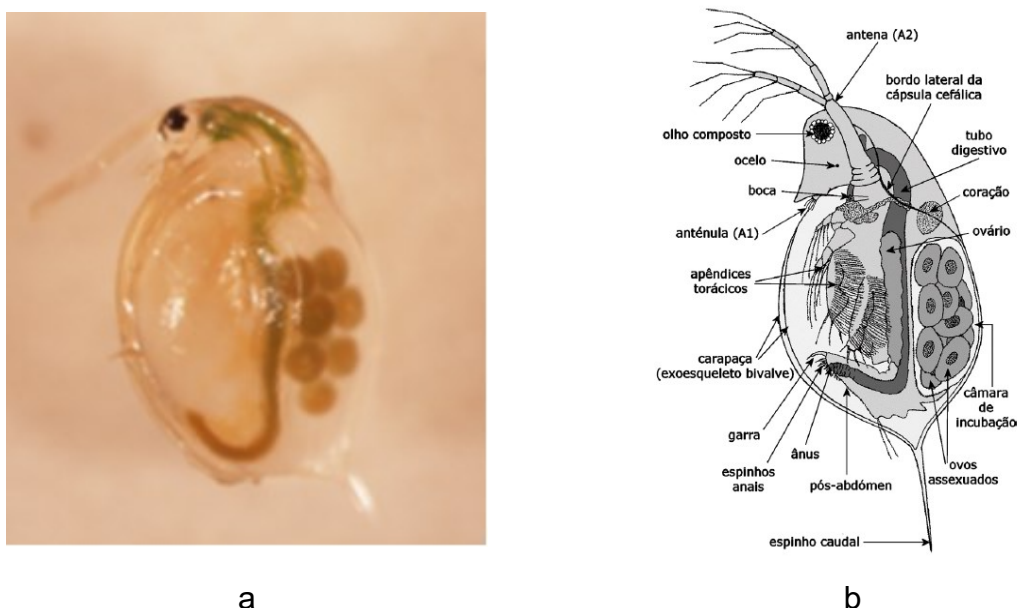
Um organismo-teste muito empregado para estes ensaios é o microcrustáceo *D. magna* (MWAANGA; CARRAWAY; VAN DEN HURK, 2014; KIMBERLY; SALICE, 2015; KIM *et al.*, 2016; QIU *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2020).

2.7 MICROCRUSTÁCEO *D. magna*

A *D. magna* (Figura 6) é um microcrustáceo de água doce, pertencente à Ordem Cladocera (BOWNIK, 2017). Em condições adequadas, este organismo se reproduz por partenogênese (reprodução assexuada), entretanto em condições ambientais adversas a reprodução pode se dar sexualmente (DAMÁSIO *et al.*, 2007; MANSOUR; GAD, 2010).

D. magna é um organismo que se reproduz por partenogênese cíclica, que resulta, em sua maioria, em populações quase inteiramente por fêmeas. Devido a perturbações como alterações na temperatura, disponibilidade de alimento, alta densidade na população com consequente liberação e acúmulo de excreções, ocorre uma produção de espécimes machos. A partir destas condições, pode ocorrer a indução de ovos sexuais, chamados de efípios (EPA, 2002; FLOHR, 2007).

Figura 6 - Imagem de um indivíduo adulto de *D. magna* cultivado em laboratório.



Nota: Aumento de 50x (a), de um indivíduo utilizado nos testes (LABTOX). Representação esquemática da anatomia interna e externa (ANTUNES; CASTRO, 2017) (b).

Fonte: O Autor (2020) (a), (ANTUNES; CASTRO, 2017) (b)

A biologia de *D. magna* já foi amplamente estudada, sendo classificada taxonomicamente no filo Arthropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Diplostraca, subordem Cladocera, família Daphnidae. Dentre os microcrustáceos, *D. magna* pertencente ao zooplâncton e ocupa uma importante posição nas cadeias alimentares aquáticas, ligando produtores primários e peixes, cujas alterações na sua população, acabam afetando os ecossistemas aquáticos (LV *et al.*, 2017).

Como estes organismos são sexualmente partenogênicos e sua reprodução clonal oferece uma uniformidade genética, aumenta a reprodutibilidade e a repetibilidade dos resultados de testes toxicológicos. Tais organismos apresentam também um tempo de vida relativamente breve, de simplificado cultivo e manipulação em laboratório, exibindo sensibilidade elevada quando exposta a uma grande variedade de compostos tóxicos, além de ser de ocorrência mundial (ROSSETTO, 2016).

Isto se releva como um fator ambientalmente importante, em que a *D. magna* é comumente empregada como um organismo na determinação da toxicidade de compostos químicos para avaliação de risco ambiental, tanto para testes de toxicidade crônicos, como para testes de toxicidade agudos. Isso porque a *D. magna* possui

vantagens como alta fecundidade, boa taxa de crescimento, criação fácil e barata, além de um ciclo de vida de fácil avaliação (ZHENG *et al.*, 2020).

Quando se considera que a *D. magna* se apresenta na base da cadeia alimentar em ambientes aquáticos, o estudo da relação entre a agregação e o transporte de NP neste organismo e sua consequente toxicidade aguda e crônica traz subsídios expressivos sobre um possível efeito genérico de NP em ecossistemas aquáticos (GÖKÇE; KÖYTEPE; ÖZCAN, 2018).

Por se tratar de um organismo-teste bem aceito, são variados os trabalhos que utilizam *D. magna*, como, por exemplo, pesquisas com nanopartículas (ROSSETTO *et al.*, 2014; TAN; WANG, 2014; LI *et al.*, 2015; PUERARI *et al.*, 2016; VICENTINI *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2020), bem como em estudos relacionados com agrotóxicos (LIU; YUAN; LI, 2012; SEELAND; OEHLMANN; MÜLLER, 2012; ERICKSON *et al.*, 2014; MCKNIGHT *et al.*, 2015; HUETE-SOTO *et al.*, 2017; KNAPIK; RAMSDORF, 2020).

2.8 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

Um dos mecanismos mais explorados relacionados à nanotoxicidade é a geração de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs) (CUI *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2019; DE MELO *et al.*, 2020). Quando em condições fisiológicas normais, os organismos mantêm um equilíbrio entre geração e neutralização de EROs (MASTELING *et al.*, 2016). A presença de substâncias tóxicas (como as NP) pode perturbar estas condições ideais, resultando no aumento da produção de EROs, sobrecarregando a capacidade de defesa dos organismos ao longo do tempo, causando inativação de algumas enzimas, oxidação de proteínas, danos ao DNA e outras biomoléculas essenciais, como lipídios (CUI *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2019).

A superprodução de EROs acaba extrapolando as barreiras antioxidantes das células, resultando em estresse oxidativo e outros danos laterais, como alteração de proteínas, peroxidação lipídica, quebra de DNA e modulação da expressão genética (CHÂTEL; MOUNEYRAC, 2017).

Sob o estresse ambiental, o oxigênio molecular pode ser convertido em radicais livres, que são produzidos no processo de metabolismo aeróbico e podem regular o estado das células em termos de diferentes concentrações. Radicais livres de alta concentração têm capacidade de induzir apoptose e necrose, enquanto a

concentração fisiologicamente adaptativa de EROs pode facilitar a ativação de fatores de transcrição, bem como promover a diferenciação celular (WANG; TANG, 2018).

Este oxigênio molecular é usado como ferramenta oxidante na produção de adenosina trifosfato (ATP) em células nos organismos aeróbicos, que em seguida acaba sendo reduzido à água. O oxigênio que não foi reduzido forma superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) que também podem ser transformados em radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$) que, por sua vez, apresenta a maior potencialidade de redução de todas as EROs. Em condições normais, estas são facilmente suprimidas por antioxidantes, como os polifenóis e enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). As enzimas SOD catalisam a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ em oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2), este que é decomposto pela CAT em água e oxigênio molecular. Apesar do H_2O_2 ser menos reativo em comparação às espécies de radicais, este ainda é um oxidante forte que necessita ser minimizado. O GPx também desempenha um papel na desintoxicação do H_2O_2 , consumindo a glutathione (GSH) que atua como agente redutor. Durante o processo, ocorre a conversão e oxidação do GSH, resultando em dissulfeto de glutathione (GSSG), que é reduzido novamente para GSH por enzimas glutathione-S-transferase (GST), finalizando deste modo e completando todo o ciclo. A atividade de enzimas antioxidantes é considerada um reflexo do estado redox das células, que são avaliadas como biomarcadores de estresse oxidativo (SCHIEBER; CHANDEL, 2014; GONÇALO VALE *et al.*, 2015).

Estes tipos de efeitos têm sido observados também para a espécie *D. magna*, como exemplo de trabalho contemplando o estresse oxidativo, foi apontada nestes organismos expostos para AgNP (0,5 a 10 $\mu\text{g/L}$) por 48 h uma alteração significativa nos níveis de EROs em comparação à forma solúvel do metal (ULM *et al.*, 2015). Estas modificações estão relacionadas a um maior dano mitocondrial por AgNP.

2.9 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Os organismos aquáticos estão a cada dia mais sendo expostos a múltiplos contaminantes químicos com distintos mecanismos de toxicidade, cooperando para um resultado final de dano aos organismos. Para minimizar este dano oxidativo aos

componentes celulares, organismos desenvolveram defesas antioxidantes (BARATA *et al.*, 2005).

As NP podem resultar em efeitos adversos aos organismos, sendo reconhecidas por resultar na produção de EROs por meio da interação das NP com moléculas biológicas como proteínas, lipídios e DNA, resultando em estresse oxidativo, lipoperoxidação e inflamação (WONG; HU; BAEG, 2017).

Geralmente, tem-se a coexistência de sistemas oxidativo e antioxidante nos organismos, sendo que em circunstâncias normais tais sistemas se apresentam em equilíbrio dinâmico (MASTELING *et al.*, 2016). Quando em desequilíbrio, pela estimulação persistente dos xenobióticos no organismo, ocorre o aumento da produção de EROs, então os organismos aumentam também a produção das defesas antioxidantes, como, por exemplo, a produção de enzimas como a SOD, CAT, GPx, GST, GSH e GR, cuja alteração na produção pode ser mensurada, sendo empregada em pesquisas envolvendo toxicologia (IUMMATO *et al.*, 2019; DE MELO *et al.*, 2020; GALHANO *et al.*, 2020).

No entanto, a falha na ação destas defesas, resulta em danos oxidativos, como a inativação de enzimas, deterioração de proteínas, danos ao DNA e peroxidação lipídica, podendo esta última ser considerada um dos principais mecanismos em que os oxirradicais acabam causando danos aos tecidos, trazendo alterações em propriedades físico-químicas em membranas celulares e ocasionando perturbações importantes nas funções vitais (BARATA *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2015; WANG; TANG, 2018).

Biomarcadores são ferramentas úteis que têm sido utilizadas como indicadores precoces de poluição ambiental, sendo que consequentes resultados são avaliados devido à sua capacidade de detectar diferentes efeitos em níveis muito baixos (PERINA, 2016).

Diferentes estudos toxicológicos demonstram a utilização de biomarcadores de estresse oxidativo, como por exemplo XU *et al.* (2017), que avaliaram os efeitos do sulfonato perfluorooctano na imobilização, alterações do batimento cardíaco, bem como o desempenho reprodutivo e bioquímico no microcrustáceo *D. magna*. Outro exemplo de estudo foi a análise da bioconcentração do antidepressivo fluoxetina e seus efeitos sobre o estado fisiológico e bioquímico em *D. magna*, resultando na significativa inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), e alterações na atividade da SOD e de MDA (DING *et al.*, 2017).

Nos variados estudos, a quantificação das atividades das enzimas antioxidantes como CAT, SOD, GSH, bem como a quantificação dos níveis de EROs e análise da peroxidação lipídica da membrana, tem sido amplamente utilizada como biomarcadores do estresse oxidativo (KIM et al., 2010; MASTELING et al., 2016; VALE et al., 2016).

2.9.1 Catalase (CAT)

Esta enzima exerce duas funções: funciona como catalisador na dismutação de moléculas de peróxido de hidrogênio e realiza a peroxidação se comportando como acceptora de elétrons. Para que esta enzima desempenhe bem sua atividade, o ferro e os tocoferóis (vitamina E) que se acham distribuídos na membrana celular são elementos essenciais. A estrutura molecular da catalase apresenta quatro subunidades, cada uma contendo agrupamento (Fe III -protoporfirina) e uma molécula de NADPH ligada ao seu sítio ativo (ANDRADE-WARTHA, 2007; DORIA, 2014; OLIVEIRA, 2014). Alteração na atividade da CAT é um indicador de uma dano celular após a exposição de organismos a compostos químicos e, assim, é considerada um biomarcador inicial do estresse ambiental (PATRICIA *et al.*, 2017). Por exemplo, Vieira *et al.* (2019) estudaram os efeitos adversos em termos de estresse oxidativo que o clotrimazol causou em *D. magna*, observando um aumento significativo na atividade da CAT, causando estresse oxidativo e danos ao metabolismo dos organismos.

2.9.2 Glutationa (GSH)

A GSH consiste em um tiol de baixo peso molecular encontrado em variados compartimentos celulares, como citosol, mitocôndrias, cloroplastos, vacúolos e peroxissomos. A GSH está relacionada à uma extensa gama de processos celulares, como diferenciação celular, crescimento e divisão celular, envelhecimento e morte celular, regulação do transporte de sulfato, desintoxicação de contaminantes, conjugação de metabólitos, regulação da atividade enzimática, síntese de proteínas e nucleotídeos, bem como expressão de genes responsivos ao estresse oxidativo (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). Essa versatilidade do GSH se deve ao seu alto potencial redutor. A GSH atua na supressão do H_2O_2 , $OH^\cdot$ e $O_2^\cdot$, que resulta na proteção de

biomoléculas e redução de EROs, produzindo GSSG como subproduto. Este GSSG produzido é transformado novamente em GSH pela síntese enzimática da GR. Portanto, este equilíbrio das reações é fundamental para manter preservado o estado redox nas células, em que a diminuição nos níveis endógenos de GSH vem a depreciar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres (ANTUNES-NETO; SILVA; MACEDO, 2006).

2.9.3 Superóxido Dismutase (SOD)

Outra enzima que apresenta importância para a eliminação das EROs é a SOD, que representa um grupo de metaloenzimas que são encontradas em todos os reinos da vida (YOUNUS, 2018). A SOD, junto com a CAT, são as principais enzimas que formam a primeira linha de defesa contra os radicais livres derivados de oxigênio (LI *et al.*, 2019). Um aumento na atividade da SOD se relaciona a um incremento na produção de H_2O_2 , molécula esta de relevância em vários processos metabólicos (NUNES; VIANA; NETO, 2015). A SOD é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutação do O_2^- , que danifica as células a uma concentração excessiva em H_2O_2 e moléculas de oxigênio (NGUYEN; TRAN; NGUYEN, 2020).

Kumar et al. (2014) observaram um aumento expressivo na produção de EROs e SOD, além de alterações morfológicas em bactérias de água doce *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus aquimaris* expostas a 0,25 - 1 $\mu\text{g/mL}$ de AgNP, revestidas com PVP.

2.9.4 Peroxidação lipídica (LPO)

Os lipídios compõem relevante constituinte na membrana plasmática, que serve como fonte de proteção das células, auxiliando nas adaptações às mudanças ambientais. Entretanto, quando ocorre algum desequilíbrio e os níveis EROs se elevam para diante de um valor limite ocorre a LPO, fenômeno este tão danoso que a LPO é frequentemente analisada como único parâmetro na avaliação de danos irreversíveis na membrana. A LPO inicia uma reação em cadeia e acentua ainda mais o estresse oxidativo, criando radicais lipídicos que danificam proteínas e DNA (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

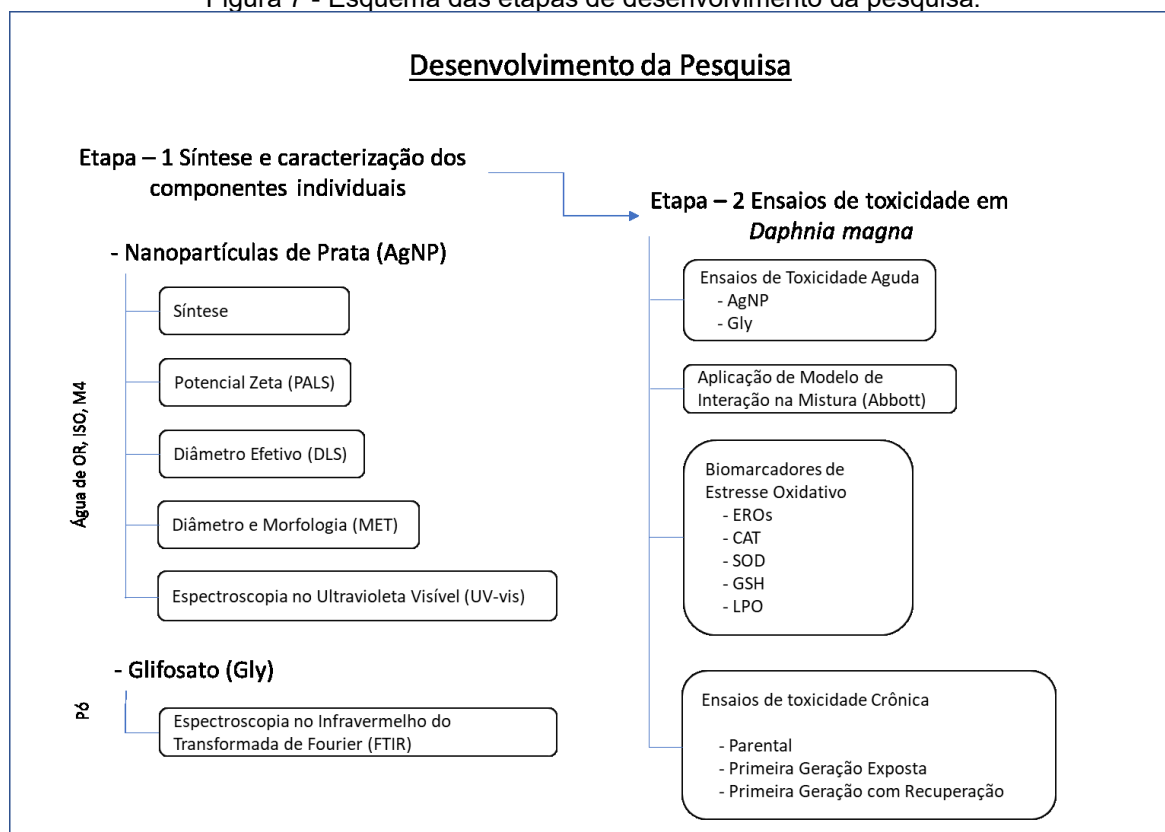
O processo para LPO exerce elevado potencial como biomarcador, e isto se deve ao fato de ser a oxidação de ácidos graxos polinsaturados uma consequência do estresse oxidativo (MWAANGA; CARRAWAY; VAN DEN HURK, 2014). Esta oxidação acaba ocorrendo por uma série de reações abrangendo três etapas diferentes: iniciação, propagação e terminação. O término da LPO é o resultado da interação de radicais lipídicos e/ou formação de espécies não radicalares. Entre os produtos finais formados durante o processo de LPO, destacam-se os gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal. O peróxido lipídico pode acumular-se até certo grau dentro do órgão ou tecido, resultando em dano irreversível na fluidez da membrana, aumentando sua permeabilidade e gerando perda da integridade da membrana e ruptura da célula (OLIVEIRA, 2014). Como exemplo de estudo envolvendo a LPO, Sánchez et al. (2017) avaliaram os efeitos de formulações de Roundup (Roundup Original®, Roundup Transorb® e Roundup WG) em biomarcadores bioquímicos e na qualidade do esperma masculino de peixes da espécie *Jenynsia multidentata*, exposto na faixa de 0,5-5mg/L. As amostras apresentaram um estado de desequilíbrio oxidativo, que causou LPO acentuada em seus fígados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi dividido em duas etapas, que podem ser observadas na Figura 7. A primeira dessas etapas consistiu na síntese e caracterização físico-químicas das AgNP, e também na caracterização química do composto comercial Gly. Já a segunda etapa consistiu na avaliação da toxicidade aguda e crônica, para tratamentos com os compostos individuais, bem como da MR de AgNP/Gly, em *D. magna*.

Figura 7 - Esquema das etapas de desenvolvimento da pesquisa.



Fonte: O Autor (2020)

3.2 MATERIAIS

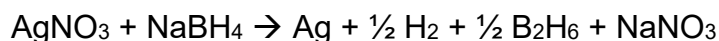
As AgNP foram sintetizadas no Laboratório de Toxicologia Ambiental - LABTOX da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, com tamanho médio de

4,37±0,30 nm, e o glifosato (N(Fosfonometil)Glicina) foi adquirido da Sigma Aldrich. Além destes, foram usados no trabalho os seguintes materiais: Nitrato de prata (AgNO₃); Borohidreto de sódio (NaBH₄); Álcool polivinílico (PVA); Cloridrato de 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris-HCl); Cloreto de sódio (NaCl); Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA); Ácido clorídrico (HCl); Dodecilsulfato de sódio (SDS); 4,6-Dihidroxipirimidina-2-tiol (TBA) e 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP); Fosfato de potássio monobásico; 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB); Solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H₂DCFDA). Tais materiais foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Água de osmose reversa (OR) (0,05 S/cm) e água Ultrapura (UP) (18,2 mΩ).

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Síntese das Nanopartículas de Prata (AgNP)

A preparação de AgNP foi realizada por meio da síntese química de redução do nitrato de prata (AgNO₃) com o borohidreto de sódio (NaBH₄) na presença de um agente estabilizante, o álcool polivinílico (PVA). A preparação de 100 mL da suspensão (solução estoque) de AgNP seguiu a metodologia de Lalau *et al.* (2020), com pequenas modificações na quantidade de reagentes utilizados. A equação pela qual ocorre a redução da prata está apresentada a seguir.



O PVA (1% em m/v) foi solubilizado em 50 mL de água aproximadamente a 100 °C e, em seguida, a solução polimérica resultante foi resfriada até próximo de 3 °C. Paralelamente, a solução de 2 mM de NaBH₄ (25 mL) foi preparada e mantida a 3 °C em banho de gelo sob agitação. Em seguida, uma solução de 1 mM de AgNO₃ (25 mL) foi preparada e adicionada gota a gota (1 gota/s) na mistura das soluções de PVA e NaBH₄. A razão estequiométrica entre AgNO₃ e o NaBH₄ foi de 1:2. A reação foi mantida sob agitação por mais 5 min. Por fim, a suspensão coloidal obtida foi armazenada a aproximadamente 4 °C até o uso.

3.3.2 Caracterização das AgNP

Para um efetivo estudo de toxicidade das AgNP e do composto binário com o herbicida Gly em organismos vivos, é necessário que sejam realizadas caracterizações das suspensões-teste com a finalidade de entender acerca dos possíveis geradores de efeitos prejudiciais. Existem diferentes tipos de caracterização que podem ser realizadas para uma NP, mas para este estudo serão utilizadas as seguintes técnicas: microscopia eletrônica de transmissão (MET), Potencial Zeta (PZ) e Diâmetro Efetivo (DE) e Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis).

3.3.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os diâmetros médios das AgNP foram determinados a partir das imagens de um Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM-1011 MET – 100kV), localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para tal análise, as suspensões-teste foram gotejadas sobre uma grade de carbono-Cu (300 meshes) e contidas em um dessecador à vácuo por 24h para a secagem. O programa ImageJ® foi utilizado para determinar o diâmetro das AgNP a partir da curva gaussiana gerada com a análise das imagens MET.

3.3.2.2 Potencial Zeta (PZ) e Diâmetro Efetivo (DE)

O Potencial Zeta (PZ) e Diâmetro Efetivo (DE) das AgNP foram determinados em água de osmose reversa (H₂O OR), e também para os meios de teste (ISO) e cultivo (M4) pelas técnicas de Dispersão de Luz de Fase Alternativa (PALS) e por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), respectivamente, em triplicata a 25 °C, com a utilização do equipamento NanoBrook 90Plus Zeta, do Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX da UFSC. O pH também foi medido nos diferentes meios (Alfakit, AT-355). Nestas aferições, as soluções foram diluídas em proporção 1/10 (v/v).

3.3.2.3 Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis)

Para a caracterização das AgNP quanto ao tamanho e possível agregação, foi utilizado um espectrofotômetro (Shimadzu 1800) com duplo feixe que atua na

região UV-Vis, com faixa espectral programada entre 300 e 700 nm. Para a leitura no espectrofotômetro, foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. As soluções foram diluídas em proporção 1/10 (v/v) e a resolução de leitura utilizada foi de 1 nm.

3.3.3 Caracterização do Glifosato

3.3.3.1 Espectroscopia no Infravermelho FTIR

Os espectros de absorção dos grupos funcionais e ligações característicos do composto, foram analisados por meio da análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Esta Análise foi realizada sobre discos de KBr preparados com uma pequena quantidade de Gly. O espectro de infravermelho foi obtido em um equipamento Perkin-Elmer PC-16 com transformada de Fourier e com resolução de 4 cm^{-1} na faixa situada entre 4000 e 400 cm^{-1} . Localizado na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química da UFSC.

3.3.4 Ensaios Toxicológicos

3.3.4.1 Organismo teste *D. magna*

Por questões práticas, dada a sua distribuição comum, ciclo de vida curto e sensibilidade a toxinas, *D. magna* tem sido amplamente utilizado como organismo-teste para testes de toxicidade, bem como para avaliar os efeitos de nanopartículas metálicas (LV *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2018). Além disso, *D. magna* está no início da cadeia alimentar em ecossistemas aquáticos, onde qualquer mudança na qualidade de sua população ou quantidade pode resultar em mudanças nas populações de outros organismos aquáticos superiores (ASGHARI *et al.*, 2012).

Os procedimentos para manutenção foram realizados de acordo com a NBR 12713 (ABNT, 2016) e ISO 6341 (ISO, 1996). Em resumo, os animais adultos foram mantidos em grupos de 20-30 indivíduos, em recipientes de vidro de 2 L, em incubadoras com temperatura de $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 h claro-escuro. O meio de cultivo (M4) foi composto por água destilada reconstituída com nutrientes e

as *D. magna* foram alimentadas três vezes por semana, cuja rotina de alimentação consistiu em *Desmodesmus subspicatus* em $3,5 \times 10^7$ células/mL.

Para validação dos testes de toxicidade com o organismo *D. magna*, foram realizados semanalmente testes de sensibilidade com a substância de referência Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$). A sensibilidade consiste em efetuar um teste expondo por 24 horas indivíduos jovens a diluições de uma solução de Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$) em meio de teste (ISO). A metodologia aplicada a este teste é a mesma do ensaio agudo (descrito a seguir), porém as concentrações já são predefinidas, sendo 0,5; 0,7; 0,9; 1,1 e 1,3 mg/L. A faixa adequada da sensibilidade para *D. magna* é entre 0,6 e 1,7 mg/L (ABNT 12713, 2016).

3.3.4.2 Ensaio de Toxicidade Aguda

As condições de ensaio de toxicidade aguda de 48 h foram realizadas de acordo com as diretrizes da NBR 12713 (ABNT, 2016). Os experimentos foram conduzidos com cinco concentrações de AgNP ou cinco de Gly, todos em duplicata. Dez neonatos (< 24 horas de vida) foram selecionados aleatoriamente e colocados nas soluções-teste em cada réplica. As concentrações utilizadas para a AgNP foram, 0; 0,0187; 0,037; 0,075; 0,15 e 0,3 μ g/L. Já para o Gly, as concentrações utilizadas foram 0; 40; 60; 80; 100 e 120 mg/L. Estas concentrações para os dois compostos foram obtidas a partir de ensaios preliminares.

Os testes foram conduzidos em condições análogas às das culturas, contudo, sem alimentação ou iluminação, e após 48h foram avaliados quanto à imobilidade/mortalidade. A CE_{50} foi determinada observando o número de indivíduos imóveis após 48 horas de exposição e calculada por meio de métodos estatísticos.

3.3.4.3 Toxicidade de AgNP e glifosato individuais e da mistura binária

Com base nos valores de CE_{50} observados, a toxicidade individual de AgNP e Gly, bem como a sua MR, foram avaliados em diferentes unidades tóxicas (UT), sendo 0, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 1,75 e 2 UT. A abordagem da unidade tóxica (SPRAGUE; RAMSAY, 1965) tem sido amplamente utilizada em estudos toxicológicos para determinar o efeito de diferentes substâncias tóxicas em uma mistura (BACKHAUS; FAUST, 2012; FJORDBØGE *et al.*, 2013; MCKNIGHT *et al.*, 2015; RASMUSSEN *et*

al., 2015; ISWARYA *et al.*, 2016; DI NICA *et al.*, 2017). As UT individuais e da mistura foram calculadas usando Equações (1) e (2), respectivamente:

$$UT = \frac{CI}{CE_{50} \text{ Composto Individual}} \quad (1)$$

Onde:

UT = Unidade Tóxica

CI = Concentração Individual

CE50 = Concentração média efetiva

$$\sum UT = UT_{AgNP} + UT_{Gly} \quad (2)$$

Onde:

UT = Unidade Tóxica

UT AgNP = Proporção equivalente de UT para nanopartículas de prata

UT Gly = Proporção equivalente de UT para glifosato

Para os compostos individuais, a UT foi calculada utilizando-se a razão entre a concentração individual (CI) e a CE₅₀ do componente do tratamento (Equação 1). No cálculo das UT utilizadas na MR (Equação 2), o somatório de baseou em proporções equivalentes dos componentes individuais, onde, 1 UT da MR, por exemplo, corresponde ao somatório de 0,5 UT de AgNP e 0,5 UT de Gly (FERREIRA; LOUREIRO; SOARES, 2008; ISWARYA *et al.*, 2016).

Os testes agudos com as respectivas UT de AgNP e Gly, bem como da MR, seguiram os padrões da NBR 12713 (ABNT, 2016) adaptada para UT. Todos os experimentos de toxicidade foram repetidos pelo menos cinco vezes (n = 5) para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

3.3.4.4 Modelo de interação na mistura binária

Para a validação dos resultados em relação aos efeitos das misturas, as interações foram previstas utilizando o modelo proposto por Abbott (ABBOTT, 1925), de acordo com o trabalho de Köerich *et al.*, (in press). Este modelo foi inicialmente desenvolvido para avaliação de agrotóxicos e nos últimos anos, tem sido utilizado para nanopartículas (GATIDOU, THOMAIDIS, 2007; ISWARYA *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2019).

A partir deste modelo, foi calculada a toxicidade esperada (Tesp) da MR (Equação 3). A Tesp estima o efeito a junção da potência tóxica observada nos componentes individuais em relação a mortalidade (Mt) dos organismos expostos aos tratamentos com AgNP e Gly (em %).

$$Tesp = Mt \text{ AgNP} + Mt \text{ Gly} - \left(\frac{Mt \text{ AgNP} \cdot Mt \text{ Gly}}{100} \right) \quad (3)$$

Onde:

Tesp = Toxicidade Esperada

Mt AgNP = Mortalidade (%) para AgNP

Mt Gly = Mortalidade (%) para Gly

A relação de interação foi obtida através da Razão de Inibição (RI), usando-se a Equação (4), onde $RI < 1$ considera-se efeito antagônico, $RI > 1$ efeito sinérgico e $RI = 1$ efeito aditivo. Esta relação foi obtida por meio da relação entre a toxicidade esperada (Tesp) e a toxicidade observada (Tobs) para a mistura binária.

$$RI = \frac{Tobs}{Tesp} \quad (4)$$

Onde:

RI = Razão de Inibição

Tobs = Toxicidade Observada

Tesp = Toxicidade Esperada

3.3.5 Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo

Para a realização dos ensaios com os biomarcadores, os tratamentos escolhidos foram baseados nas UT para a MR de AgNP e Gly utilizadas nos testes de toxicidade aguda, correspondendo a 0,5, 1 e 1,75 UT, respectivamente.

Na quantificação da geração de EROs, procedeu-se adotando o protocolo de Xie *et al.* (2006) com algumas modificações. *D. magna* juvenis (com mais de 5 dias de vida) foram expostas por 48h, e após isso foram recolhidas e transferidas para um béquer contendo 1 mL de H₂DCFDA que apresentava concentração final de 50 μ M durante 4h a uma temperatura de 25°C com ausência de luz. Logo após, as *D. magna* foram lavadas com água ultrapura, homogeneizadas com o auxílio de homogeneizador manual e centrifugadas a 6500 RPM durante 5 min. Para a análise, o sobrenadante foi recolhido e submetido a um leitor de fluorescência (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices) com excitação 488 nm e emissão 530 nm.

Como biomarcadores de estresse oxidativo, foram analisados os antioxidantes enzimáticos catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e não enzimático glutathiona reduzida (GSH). Adotou-se, nestes ensaios de quantificação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, a metodologia de extração utilizada por Barata *et al.* (2005), com poucas modificações. Após 48h de exposição, as *D. magna* juvenis (aproximadamente 8 dias de vida) foram recolhidas, homogeneizadas em tampão fosfato salino (100 mM - pH 7,4), centrifugadas a uma taxa 10,000x *g* pelo tempo de 5 min com uma temperatura de 4 °C e, logo após, os sobrenadantes foram utilizados para os ensaios cinéticos.

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Aebi (1984), que consiste em misturar 10 μ L de amostra com H₂O₂ (10 mM) em tampão fosfato salino (100 mM) para a degradação do substrato (H₂O₂), para a mensuração e análise via espectroscopia de UV (UV-5100S) na faixa de 240 nm.

A determinação da atividade da SOD foi realizada em 50 μ L de amostra, conforme o método apresentado por Mccord e Fridovich (1969). A análise fundamentou-se na inibição da diminuição do citocromo C (0,075mM) pelo superóxido produzido no sistema enzimático xantina/xantina oxidase (56 mM). A quantidade de xantina oxidase utilizada teve capacidade de produzir uma atividade de redução do

citocromo C que pôde ser quantificada via espectroscopia de UV (UV-5100S), na faixa de 550 nm.

A atividade da GSH foi determinada segundo método descrito por Beutler, Duron e Kelly (1963), onde 500 µL de amostra foram precipitados com TCA 12% em proporção 1:10 (m/v). Logo após, a amostra foi submetida a centrifugação a 1.000 RPM pelo tempo de 15 minutos, acrescentado DTNB (2,5 mM) e tampão fosfato de potássio (80 mM - pH 8,0), mantidos sob agitação por cerca de 1 minuto. Sequencialmente, iniciou-se prontamente a avaliação da absorbância registrada via espectroscopia de UV (UV-5100S) na faixa de 412 nm. A normalização dos resultados de CAT, SOD e GSH seguiu o processo estabelecido pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando a massa total de proteína (mg).

Para a peroxidação lipídica (LPO) a determinação ocorreu pela quantificação do conteúdo de Malondialdeído (MDA), seguindo a metodologia de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) estabelecido por Draper e Hadley (1990) com mínimas alterações. Juvenis (8 dias de vida) de *D. magna* foram expostos aos tratamentos por 48 h, e logo após foram recolhidos e homogeneizados com tampão (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 15 mM) e misturados com 7% de SDS, 0,67% de TBA e HCL 1M. Esta mistura foi aquecida a aproximadamente 95 °C (controlados em termômetro) pelo tempo de 90 minutos. Logo após, a mistura foi resfriada, centrifugada e realizadas as medidas de absorbância via espectroscopia de UV (UV-5100S) na faixa de 532 nm. As concentrações de MDA foram calculadas usando TEP como um padrão de referência. O resultado de LPO foi normalizado utilizando-se a massa total de proteína (mg), obtida conforme o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.3.5.1 Teste de Toxicidade Crônica

A avaliação dos efeitos subletais das amostras foram realizadas a partir de ensaios em que o período de exposição compreende parte significativa do ciclo de vida do organismo. No caso de testes crônicos com *D. magna*, o período de tempo em que os organismos são submetidos à amostra foi de 21 dias, sendo mantidas as mesmas condições ambientais que os lotes de cultivo, ou seja, temperatura ambiente controlada de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, alimentadas com a microalga *D. subspicatus*.

Para realização dos testes foram utilizados organismos neonatos (< 24 horas de vida). As concentrações das amostras testadas foram definidas a partir da concentração que não causou efeito no teste de toxicidade aguda para os componentes individuais (AgNP e Gly), bem como para a MR, e seguiram uma razão de diluição de 1,5, objetivando a determinação da CEO e CENO.

Os parâmetros analisados no ensaio crônico com *D. magna* foram longevidade (número de organismos sobreviventes), reprodução (números de neonatos gerados por réplica e idade da primeira ninhada) e crescimento (tamanho da *D. magna* no final dos 21 dias). O teste com *D. magna* é uma adaptação da ISO 10.706 (ISO, 2000) e da ABNT 13.373 (NBR, 2017).

Para os ensaios com a MR, os dois componentes testados individualmente foram utilizados em suas maiores (H) e menores (L) concentrações para os ensaios crônicos, sendo para AgNP 0,017 µg/L (L) e 0,09 µg/L (H), e para Gly as concentrações de 2,92 mg/L (L) e 14,86 mg/L (H). Foram 4 possíveis combinações das concentrações utilizadas ((L) AgNP + (L) Gly representando a MR 1; (L) AgNP + (H) Gly representando a MR 2; (H) AgNP + (L) Gly representando a MR 3; e (H) AgNP + (H) Gly representando a MR 4). Durante os testes, os dafnídeos foram mantidos nas mesmas condições da cultura, sendo verificados diariamente para registro dos parâmetros de longevidade (número sobreviventes) e reprodução (idade da primeira ninhada e número de neonatos). E, ao final dos 21 dias, os indivíduos sobreviventes foram visualizados em estereomicroscópio de fluorescência (Olympus, SZX16) e medidos a partir de imagens analisadas no Image J® para avaliação do parâmetro crescimento. Esses testes foram denominados F0 (geração parental). Para a continuidade do teste com a primeira geração, este foi composto por neonatos isolados da geração parental, do segundo dia do período de reprodução para AgNP e Gly, e, para o terceiro dia, para a MR. Para cada concentração testada, foram utilizadas 10 réplicas de 1 neonato. As avaliações da primeira geração de descendentes de F0 foram realizadas com exposição a todas as concentrações testadas da mistura (F1E), e não expostos aos contaminantes (F1NE), somente em M4 para verificação dos resultados de recuperação. Antes do início dos testes com F1E e F1NE, a sensibilidade dos neonatos foi verificada para a confiabilidade do teste seguindo o protocolo ISO 6341 (ISO, 2012). A renovação do meio/solução-teste três vezes por semana (sistema semi-estático).

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados relativos aos efeitos para AgNP, Gly e sua respectiva MR nos ensaios com *D. magna* foram analisados empregando as ferramentas disponíveis no programa estatístico *GraphPad Prism®* v7.0 (*StatSoft Inc*). Para garantir que os requisitos da distribuição normal fossem atingidos, o teste de Shapiro-Wilk foi empregado antes da realização das análises paramétricas nos conjuntos de dados. Em seguida, com estes requisitos atendidos, o teste de Bartlett foi aplicado para examinar a homogeneidade da variação dos dados.

Os conjuntos de dados testados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), acompanhado pelo teste de Dunnett (que corresponde a checagem entre os tratamentos e seus respectivos controles) ou pelo teste de Tukey (comparação múltipla), aplicados como testes *post-hoc*. Os ensaios de toxicidade aguda em *D. magna*, com a análise da CE50 e o correspondente intervalo de confiança de 95% foram calculados a partir de curvas de regressão não-linear pelo método *probit* (WEBER, 1991). As interações para as misturas foram analisados por meio de ANOVA seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. A concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO) — avaliando os parâmetros de longevidade, tamanho, tempo da primeira ninhada e reprodução — foram obtidas utilizando o teste de Dunnett, considerando os tratamentos utilizados e o controle para compostos individuais e MR. Os dados para biomarcadores bioquímicos em relação a EROs, CAT, SOD, GSH e produção de MDA para *D. magna* foram calculados pelo teste de Dunnett. Os efeitos são exibidos como média $\pm$ desvio padrão (DP) e as diferenças foram consideradas estatisticamente relevantes para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

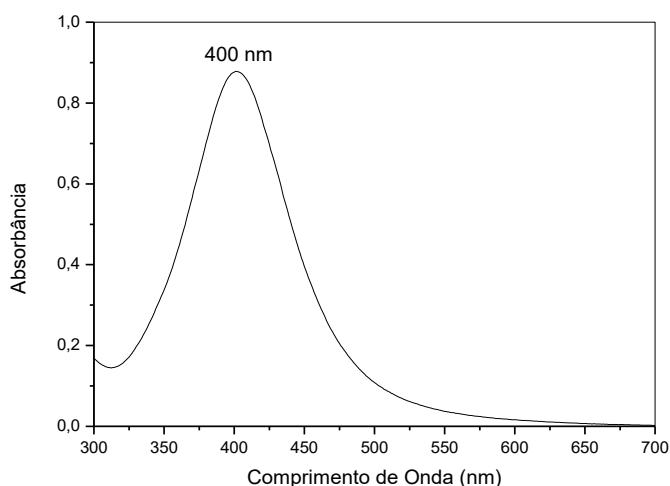
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE PRATA

4.1.1 Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis)

O espectro no UV-vis das AgNP (Figura 8) apresentou uma banda característica com absorbância máxima a 400 nm, indicando diâmetro da NP de aproximadamente 5 nm (MULFINGER *et al.*, 2007; GARCIA, 2011).

Observou-se também que o espectro exibiu uma banda pouco alargada na base, indicativo de pouca aglomeração destas NP (GARCIA, 2011).

Figura 8 - Espectro no UV-Vis de AgNP



Fonte: O Autor (2020)

4.1.2 Medidas de Potencial Zeta e Diâmetro efetivo

A Tabela 1 mostra os resultados das medidas de pH, potencial Zeta (PZ) e diâmetro efetivo (DE) para as AgNP em água de OR e nos meios ISO e M4.

Os resultados das medidas de pH e PZ das suspensões de AgNP em todos os meios apresentaram pH neutro e elevada instabilidade se levada em conta a teoria que estabelece os valores para o material ser considerado estável no meio. A estabilidade eletrostática das nanopartículas geralmente apresentam Potencial Zeta acima de 30 mV, ou também com valores abaixo de -30 mV (ANGEL *et al.*, 2013).

Entretanto, a estabilidade do resultado da síntese de AgNP se baseia na estabilidade estérica, que com polímeros (como o PVA e o PVP) e proteínas é independente de pH e da concentração eletrolítica, remetendo a uma barreira física entre as NP. Esta estabilização acaba prevenindo a aglomeração de nanopartículas em meios fisiológicos (LOESCHNER *et al.*, 2011; BECARO *et al.*, 2015).

Tabela 1 - Resultados das medidas de PZ, DE e pH nos meios H₂O OR, ISO e M4

AgNP	pH	PZ ± DP (mV)	DE ± DP (nm)
H ₂ O OR	7,6	-0,93 ± 0,07	36,40 ± 0,28
ISO	7,8	-4,79 ± 0,37	42,66 ± 0,30
M4	7,8	-4,40 ± 0,32	39,20 ± 0,42

Fonte: O Autor (2020)

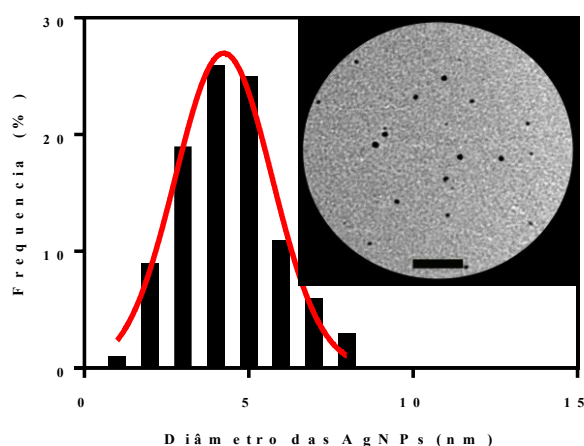
Os valores de Potencial Zeta e Diâmetro Efetivo estão coerentes com os valores apresentados pela literatura para a síntese de AgNP por redução química, utilizando o PVA como estabilizante (VRČEK *et al.*, 2014; ANDREANI *et al.*, 2017). Os valores da amostra no meio ISO, bem como em M4, são resultantes de uma maior concentração de sais dissolvidos no meio.

Estes resultados remetem a uma barreira eletrostática reduzida, o que aumenta as chances de interações entre célula-partícula, podendo resultar em maior toxicidade. Quando esta barreira é superada, as NP interagem com a membrana celular, causando danos como, por exemplo, a indução de espécies reativas de oxigênio (EL BADAWEY *et al.*, 2011).

4.1.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Na imagem de MET das AgNP (Figura 9) é possível visualizar que as NP apresentam morfologia esférica, sem aglomeração e com diâmetro médio de $4,37 \pm 0,30$ nm. A Figura 9 mostra ainda a distribuição de diâmetros das AgNP, apresentando variação entre 1-8 nm. O diâmetro das AgNP determinado na imagem de MET corrobora o resultado obtido no espectro de UV-vis. Estes resultados se apresentam conforme a literatura (CAVASSIN, 2013).

Figura 9 - Micrografias de MET para AgNP (inserção) e histograma da curva Gaussiana (n = 100 partículas). Barra de escala, 50 nm



Fonte: O Autor (2020)

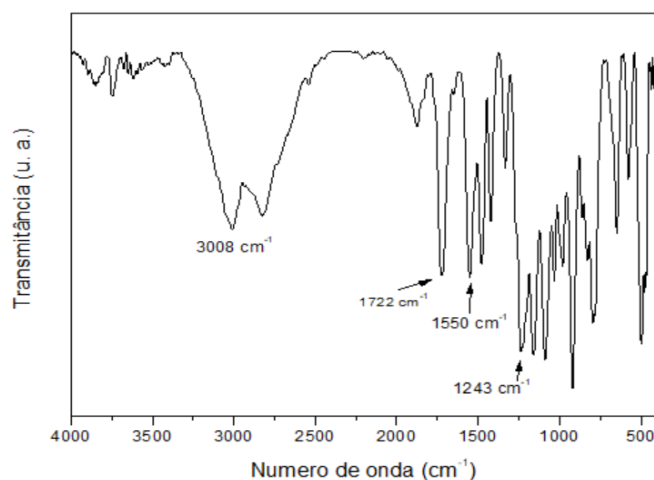
O tamanho médio das nanopartículas individuais foi calculado a partir da curva gaussiana gerada com a análise das imagens, avaliando-se o diâmetro de cerca de 100 nanopartículas escolhidas aleatoriamente das imagens TEM, analisadas com a ajuda do *software* de imagem ImageJ®.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO GLIFOSATO

4.2.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro vibracional na região do infravermelho do composto Gly apresentou perfil dominado pelas bandas de vibração características do herbicida (Figura 10) (DANIAL *et al.*, 2019). Considerando a estrutura química do glifosato, observa-se a banda relativa de deformação axial amina secundária, banda fraca em aproximadamente 3300 cm^{-1} . Observa-se na região de 3008 cm^{-1} a presença das bandas atribuídas ao estiramento das ligações O-H de ácido carboxílico ligadas ao grupo fosfato. A banda em 1722 cm^{-1} , bastante intensa no espectro do Gly, é atribuída ao estiramento C=O do grupo carbonila da carboxila. Na região de 1550 cm^{-1} encontra-se a banda relativa à deformação angular da ligação N-H. Outra banda visualizada é a deformação axial da ligação P=O de compostos organofosforados em 1243 cm^{-1} .

Figura 10 – Espectro de FTIR demonstrando bandas características do Gly.



Fonte: O Autor (2020)

Além destas principais bandas características, outras relacionadas ao Gly podem ser observadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Demais bandas observadas no FTIR do Gly e seus referentes modos vibracionais

Comprimento de onda (cm^{-1})	Atribuições
1380 e 1460	Deformação angular simétrica e assimétrica da ligação C-H de grupos metila.
1300-1250	Deformação axial simétrica da ligação C-O de ácidos carboxílicos.
1220-1020	Aminas alifáticas
1108-1104	Deformação axial da ligação P-O

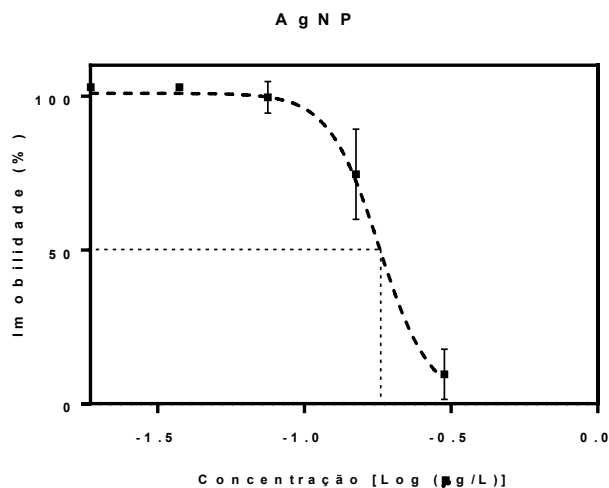
Fonte: (CARVALHO, 2017)

4.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

4.3.1 Toxicidade Aguda para o AgNP

Os resultados obtidos de CE_{50} para os organismos expostos a AgNP podem ser observados na Figura 11. As concentrações utilizadas para a AgNP foram 0; 0,0187; 0,037; 0,075; 0,15 e 0,3 $\mu\text{g/L}$, e o resultado obtido para CE_{50} foi de 0,1799 (0,1682 a 0,1924) $\mu\text{g/L}$.

Figura 11 - Curva de toxicidade aguda (CE₅₀) de nanopartículas de prata (AgNP)



Fonte: O Autor (2020)

Estes resultados sugerem que a toxicidade relacionada às AgNP pode estar associada ao tamanho reduzido da NP, no caso, diâmetro médio de $4,37 \pm 0,30$ nm, que acaba aumentando a área superficial, bem como a sua reatividade. Isto acaba por facilitar a translocação destas através da barreiras celulares, atingindo o meio interno celular e causando danos (ANGEL *et al.*, 2013; DURÁN *et al.*, 2016; SUKHANOVA *et al.*, 2018).

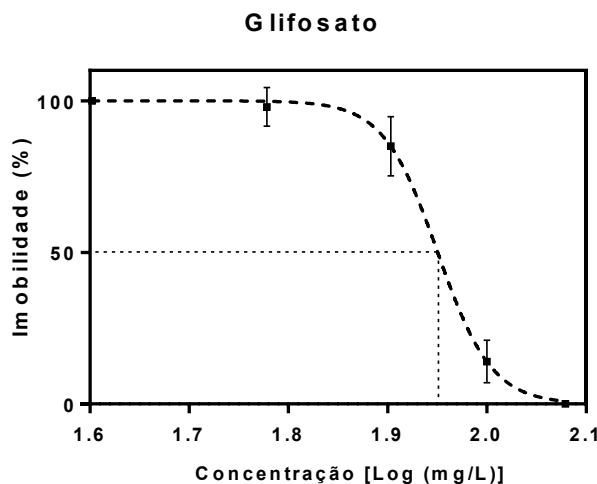
Um estudo semelhante da avaliação da toxicidade de AgNP estabilizadas com PVA em algas e microcrustáceos (BECARO *et al.*, 2015) observou uma CE₅₀ de 0,262 µg/L em *Daphnia similis*. O trabalho de Asghari *et al.* (2012), também resultou em relevante toxicidade, tanto para as AgNP coloidais (0,0020 e 0,0040 mg/L) quanto AgNO₃ (0,0023 mg/L), utilizado como fonte de íons de prata, apresentando semelhanças em termos de mortalidade em *D. magna*, atribuída à presença de íons Ag⁺ liberados pelas NP, e também à interação entre as NP e as biomoléculas.

4.3.2 Toxicidade aguda para o Gly

Os resultados obtidos na análise da toxicidade aguda (CE₅₀) para os organismos expostos ao glifosato podem ser observados na Figura 12. Para este

teste, as contrações utilizadas foram 0, 40, 60, 80, 100 e 120 mg/L. O resultado obtido para CE₅₀ foi de 89,20 (88 a 90,41) mg/L.

Figura 12 - Curva de toxicidade aguda (CE₅₀) de glifosato (Gly).



Fonte: O Autor (2020)

Esta toxicidade era esperada, levando em consideração que testes realizados com formulações comerciais de glifosato podem conter adjuvantes e/ou aditivos em concentrações que podem contribuir para um aumento da toxicidade em comparação ao ingrediente ativo glifosato (JANSSENS; STOKS, 2017).

Um estudo de efeitos toxicológicos de diferentes formulações de glifosato (SIHTMÄE *et al.*, 2013b) apresentou toxicidade para formulações comerciais Roundup Max® e Roundup Quick®, sendo a CE₅₀ de 38.1 ± 6.7 e de 48.9 ± 5.5 mg/L respectivamente em *D. magna*. Também com *D. magna*, a formulação comercial Ron-Do® apresentou CE₅₀ de 61.7 mg/L (ALBERDI *et al.*, 1996). Estes trabalhos corroboram com o resultado obtido nas análises de toxicidade aguda do estudo.

4.3.3 Interação entre AgNP e Gly usando o método de Abbott

A toxicidade para AgNP e Gly individualmente e para a MR AgNP/Gly para exposição de *D. magna* foi testada em várias unidades tóxicas, tais como 0,25, 0,5, 1, 1,5, 1,75 e 2 UT (Tabela 2). Os resultados, que representam a mortalidade induzida por AgNP, Gly e AgNP/Gly e suas formas de interação podem ser visualizados na Figura 13 e na Tabela 3.

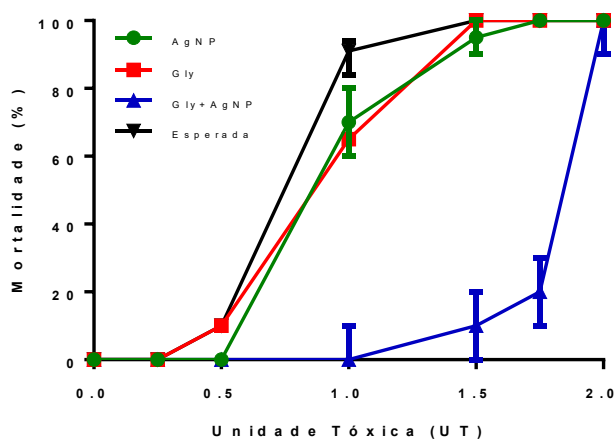
Tabela 2 - Concentração e unidade tóxica (UT) de AgNP e glifosato usadas na avaliação tóxica dos compostos individuais e da mistura binária.

Total UT	Compostos Individuais				Mistura Binária			
	Concentração de AgNP µg/L (UT)		Concentração de Gly mg/L (UT)		Concentração de AgNP µg/L (UT)		Concentração de Gly mg/L (UT)	
CE ₅₀	0,1799		89,20		-		-	
0	0		0		0		0	
0,25	0,044	(0,25)	22,30	(0,25)	0,022	(0,125)	11,15	(0,125)
0,50	0,089	(0,50)	44,60	(0,50)	0,044	(0,25)	22,30	(0,25)
1,00	0,179	(1)	89,20	(1)	0,089	(0,50)	44,60	(0,50)
1,50	0,268	(1,50)	133,80	(1,50)	0,133	(0,75)	66,90	(0,75)
1,75	0,313	(1,75)	156,10	(1,75)	0,155	(0,875)	78,05	(0,875)
2,00	0,360	(2)	178,40	(2)	0,179	(1)	89,20	(1)

Fonte: O Autor (2020)

AgNP e Gly demonstraram mortalidade de aproximadamente 70 e 65%, respectivamente, em 1 UT, sendo a primeira concentração a demonstrar toxicidade efetiva para os compostos individuais. No entanto, com a mesma concentração de 1 UT a mistura binária não apresentou mortalidade significativa, representando uma notável diminuição da toxicidade. Para a mistura somente em 2 UT a porcentagem de mortalidade em *D. magna* se equipara aos compostos individuais, resultando em aditividade na toxicidade.

Figura 13 - Mortalidade induzida por nanopartículas de prata (AgNP), glifosato (Gly) e sua mistura (AgNP/Gly) em *D. magna*



Fonte: O Autor (2020)

A razão de inibição (RI) foi calculada para a mistura binária. Observou-se estar na faixa de 0-0,97. Foi possível observar também que houve principalmente efeito antagônico nas UT intermediárias, ou seja, a interação entre os dois constituintes apresentou uma toxicidade diminuída em relação a esperada pelo método de Abbott, nas concentrações de 1, 1,50 e 1,75 UT ($p < 0,05$). Já as misturas em 0,25, 0,50 e 2 UT, mesmo com valores de RI abaixo de 1, que resultaria em antagonismo, foram consideradas como de efeito aditivo devido à insignificância estatística ($p > 0,05$) que a mistura binária apresentou.

Tabela 3 - Modelo de Abbott representando o tipo de interação entre AgNP e Gly em uma mistura binária sob diferentes exposições de UT

UT	Toxicidade Observada (%)	Toxicidade Esperada (%)	Razão de Inibição (RI)	<i>p</i>	Relação
0,25	0	0	0	$p > 0,05$	Aditivo
0,50	0	0	0	$p > 0,05$	Aditivo
1,00	1,67 ± 4,08	90 ± 4,89	0,02 ± 0,05	$p < 0,05$	Antagônico
1,50	10,00 ± 6,32	100 ± 0,00	0,07 ± 0,05	$p < 0,05$	Antagônico
1,75	20,00 ± 8,94	100 ± 0,00	0,17 ± 0,09	$p < 0,05$	Antagônico
2,00	98,33 ± 4,08	100 ± 0,00	0,97 ± 0,05	$p > 0,05$	Aditivo

Fonte: O Autor (2020)

Neste contexto, a toxicidade em ambos os constituintes na mistura (Figura 13 e Tabela 3) é provavelmente alterada pela complexação da prata por ânions de glifosato nos agrupamentos carboxila e fosfonato que, quanto ao pH da mistura, se apresentam desprotonados (SAGATYS *et al.*, 2000; COUTINHO; MAZO, 2005).

É possível que em 1, 1,50 e 1,75 UT os íons de Ag^+ livres tenham sido complexados pelo ânion Gly, reduzindo assim sua disponibilidade no meio, resultando em uma menor absorção do metal, reduzindo significativamente a sua toxicidade. Somado a isto, sugere-se também que pode ocorrer a perda dos efeitos herbicidas e consequente alteração na biodisponibilidade tanto de Gly, como de AgNP (HANSEN; ROSLEV, 2016; TSUI *et al.*, 2005).

Resultado semelhante foi visualizado por Tsui *et al.* (2005), que estudaram a influência do glifosato e sua formulação Roundup® na toxicidade e biodisponibilidade de metais para *Ceriodaphnia dubia*. Nesta pesquisa houve uma redução drástica de 90% na mortalidade dos organismos quando a mistura de glifosato com Ag foi analisada, havendo a complexação do metal no organismo.

Também houve redução da toxicidade do Cobre (II) em algumas concentrações de misturas com glifosato para *D.magna* em um estudo de respostas

comportamentais após exposição a complexos de glifosato-cobre (HANSEN; ROSLEV, 2016). O efeito da redução da toxicidade também ocorreu para a mistura de glifosato e cobre com minhocas, demonstrando efeito quelante, o que reduziu a toxicidade e biodisponibilidade no solo (ZHOU et al., 2013).

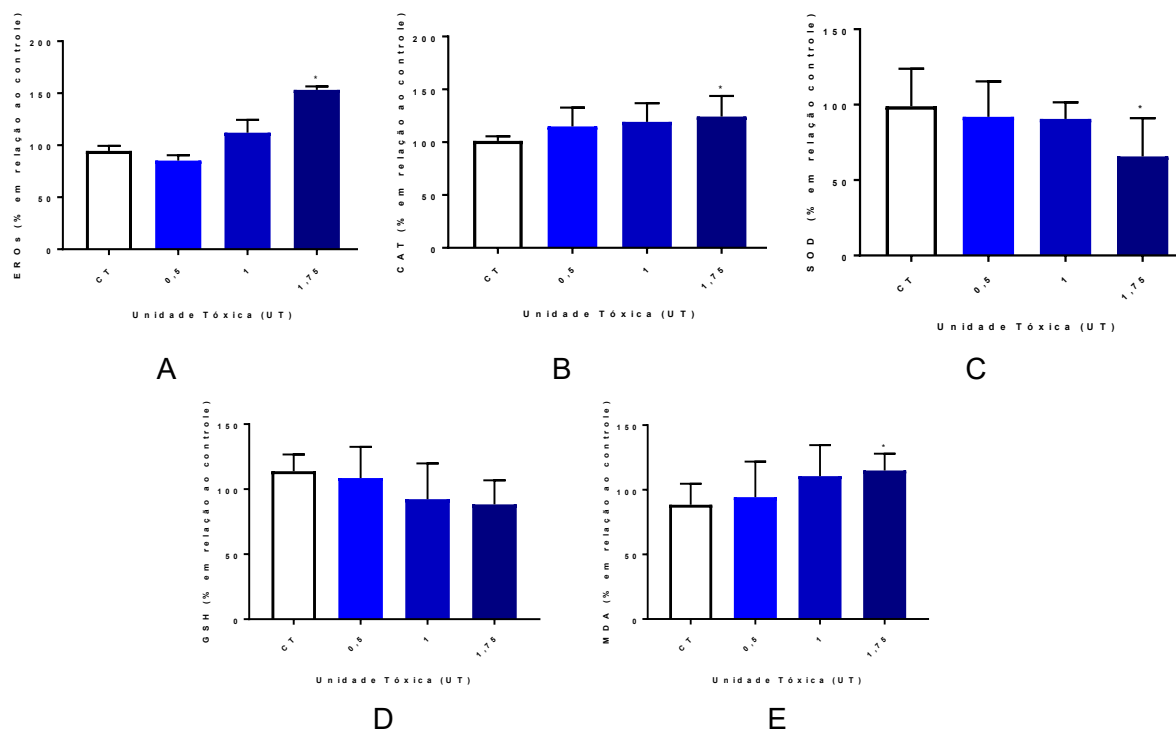
4.3.4 Biomarcadores Bioquímicos

O estresse oxidativo induzido pela mistura binária AgNP/Gly em *D. magna*, em termos de UT, foi avaliado para o nível de EROs e MDA, e avaliada também a atividade da CAT, SOD, GSH (Figura 14). Em relação às faixas de tratamento, foram utilizadas 0,5, 1 e 1,75 UT. O uso de biomarcadores tem sido uma importante ferramenta na avaliação do impacto de diversos compostos em organismos, onde o equilíbrio entre relação do oxidante/anti-oxidante pode ser afetado (MODESTO; MARTINEZ, 2010; ULM et al., 2015; CUI et al., 2017).

Para EROs, nas UT avaliadas, observou-se uma diminuição de 9,39% para 0,5 UT, um aumento de 17,46% para 1 UT, e um incremento significativo ($p < 0,05$) de 58,63% em 1,75 UT em relação ao Controle (CT) (Figura 14 A). Este aumento na produção de EROs está relacionado à geração de compostos prejudiciais que resultam em estresse oxidativo, como, por exemplo, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila e superóxido, ocasionados pelo contato com poluentes, como pesticidas e metais (GAO et al., 2018).

A atividade observada para a CAT foi aumentada em 13,72% para 0,5 UT, em 17,97% para 1 UT, e contou com aumento estatisticamente relevante de 23,04% em 1,75 UT, todos em relação ao Controle (CT) (Figura 14 B). A CAT é determinante para a avaliação do impacto dos xenobióticos nos indivíduos, sendo responsável pela decomposição do peróxido de H_2O_2 em água e realizando um efeito protetor no organismo contra as EROs (SIVULA et al., 2018). Este aumento gradativo de CAT sugere um mecanismo de compensação para remover o excesso de H_2O_2 , enquanto houve inibição de outros mecanismo de proteção como a SOD (CUI et al., 2017).

Figura 14 – Biomarcadores bioquímicos após exposição a MR de AgNP e Gly, em *D. magna*, para 0,5, 1 e 1,75 UT.



Nota: Referência % em relação ao Controle (CT) como média $\pm$ DP (n = 3). (A) geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). (B) Atividade da Catalase (CAT). (C) Atividade da Superóxido Dismutase (SOD). (D) Atividade da Glutathiona (GSH). (E) Quantificação de malondialdeído (MDA). O asterisco (*) resultado significativo para ANOVA de uma via ($p < 0,05$).

Fonte: O Autor (2020)

Houve inibição da atividade de SOD em 6,96 e 8,30% em 0,5 e 1 UT, respectivamente, sendo alterações não estatisticamente relevantes ($p > 0,05$). Entretanto, houve redução relevante ($p < 0,05$) de 33,29% em 1,75 UT quando comparado ao CT (Figura 14 C). Esta diminuição pode estar relacionada a um aumento de EROs, em que a capacidade antioxidante se encontra com sobrecarga (CUI *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2018).

Aconteceram decréscimos também em relação à atividade de GSH, atingindo 25,49% em 1,75 UT em relação ao CT, no entanto as atividades foram apenas leves, sem relevância estatística para os tratamentos ($p > 0,05$) (Figura 14 D).

Os indivíduos expostos a MR exibiram um aumento na produção de MDA resultante da peroxidação lipídica, um dos apontadores de estresse oxidativo (MODESTO; MARTINEZ, 2010), em todas as faixas de UT analisadas, demonstrando resultado significativo ($p < 0,05$) em 1,75 UT com alteração de 26,49 % (Figura 14 E). As consequências do mecanismo tóxico da LPO são as modificações das bases, a

inibição da síntese proteica, a desnaturação do DNA e a formação de adutos do DNA, a qual pode induzir a processos genotóxicos, mutagênicos e ainda carcinogênicos.

Ulm *et al.* (2015) visualizaram um decréscimo da geração de EROs, aumento na atividade da CAT e da GSH, no entanto, não houve quaisquer alterações significativas na atividade da SOD para neonatos de *D. magna* expostos a AgNP, quando submetidos por 48h a 0,5–10 µg/L de AgNPs. LE *et al.* (2010) avaliaram os efeitos em *D. magna* para a exposição com Gly de 190–234 mg/L, e obtiveram alterações para citocromo P450 (CYP4), hemoglobinas e Arn t. Os efeitos de Gly em *D. magna* foram quantificados por Ørsted e Roslev (2015) através da verificação por fluorescência, observando a liberação de enzimas hidrolíticas, provenientes da alteração da estrutura e na permeabilidade das membranas celulares após tratamento 1– 100 mg/L de Gly.

Estes resultados demonstraram que a expressão dos biomarcadores bioquímicos envolvidos no sistema de defesa antioxidante foi desregulada em *D. magna* quando exposta aos tratamentos com MR, onde os antioxidantes avaliados (CAT, SOD e GSH) não foram capazes de modular as EROs, ocasionando estresse oxidativo e possivelmente resultando em danos por peroxidação lipídica. A desregulação da atividade enzimática/não enzimática também é verificada em estudos com diferentes nanopartículas (GONÇALO VALE *et al.*, 2015; NOGUEIRA *et al.*, 2020; VILLA *et al.*, 2020), diferentes agrotóxicos (BARATA *et al.*, 2007; CRISTINA; MARTINEZ, 2014; CUI *et al.*, 2017) e para misturas de compostos variados (GUILHERMINO *et al.*, 2018; LÉCRIVAIN *et al.*, 2018; GARCÍA-GÓMEZ *et al.*, 2019).

4.3.5 Toxicidade crônica multigeracional com *D. magna*

Para validação dos testes multigeracionais, a sensibilidade dos neonatos coletados e utilizados no início de novos testes crônicos — tanto F1E, quanto F1NE para os compostos individuais AgNP e Gly e para a MR — foi avaliada para CE50(24h) ao composto K₂Cr₂O₇. Os resultados podem ser observados na Tabela 4, e demonstraram que a sensibilidade dos organismos utilizados estava de acordo com os critérios de validação do protocolo adotado. A faixa adequada da sensibilidade para *D. magna* é entre 0,6 e 1,7 mg/L (NBR 12713, 2016). Entretanto, a sensibilidade não

pôde ser verificada para os neonatos das MR 3 e MR 4, devido à quantidade reduzida de neonatos e atraso na geração das primeiras ninhadas.

Tabela 4 - Resultados dos testes de sensibilidade para neonatos utilizados nos testes crônicos, utilizando como substância de referência o $K_2Cr_2O_7$.

NPAg F1		Gly F1		MR	
Concentração de exposição ($\mu g.L^{-1}$)	CE50 _(24h) (mg.L ⁻¹) $K_2Cr_2O_7$	Concentração de exposição (mg.L ⁻¹)	CE50 _(24h) (mg.L ⁻¹) $K_2Cr_2O_7$	Exposição Parental	CE50 _(24h) (mg.L ⁻¹) $K_2Cr_2O_7$
Controle	1,01	Controle	1,00	Controle	1,02
0,017	0,91	2,92	0,91	1	0,96
0,026	0,89	4,38	0,86	2	0,96
0,04	0,99	6,57	0,99	3	-
0,06	0,94	9,86	0,91	4	-
0,09	0,96	14,8	0,90	-	-

Fonte: O Autor (2020)

Quando os indivíduos parentais (F0) de *D. magna* foram expostos a diferentes concentrações de Gly no experimento crônico (0, 2,92, 4,38, 6,57, 9,86 e 14,86 mg/L), nenhum resultado significativo ($p < 0,05$) foi visualizado para os parâmetros de longevidade, crescimento, reprodução e idade da primeira ninhada (Tabela 5). Para o ensaio da primeira geração com exposição (F1E), para as mesmas concentrações do teste com parentais, o parâmetro crescimento não apresentou diferença significativa em comparação ao controle. O parâmetro longevidade teve uma pequena diminuição de 10% nas concentrações de 9,86 e 14,86 mg/L, não sendo estatisticamente relevante ($p > 0,05$).

Entretanto, o Gly produziu efeitos na idade da primeira ninhada em 14,86 mg/L, com a eclosão dos ovos dois dias mais tarde, e também apresentou efeitos adversos sérios quando considerada a reprodução, onde desde a concentração mais baixa testada (2,92 mg/L) até a maior (14,86 mg/L) houve diminuições estatisticamente relevantes quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). Estudos envolvendo Gly demonstraram que em concentrações de Roundup de 0,45 mg/L, o microcrustáceo *D. magna* apresentou uma redução da fertilidade, um aumento na taxa de aborto de neonatos com alterações morfológicas e uma redução no tamanho dos descendentes liberados, provavelmente ocasionados pelos efeitos genotóxicos que podem condicionar a viabilidade das progênes, estes valores inferiores em analogia à este trabalho, está relacionado com a diferença entre as toxicidades dos compostos comerciais e seu princípio ativo isolado (CUHRA; TRAAVIK; BØHN, 2013; RENO *et al.*, 2018).

Para verificar se houve dano permanente para os dafnídeos devido à exposição ao Gly, foi realizado um experimento de recuperação (R) com os descendentes não expostos (F1NE) para as faixas de concentração experimentais dos organismos parentais. Observou-se, que mesmo para os indivíduos não expostos (F1NE), não houve melhoria ou recuperação no período do teste para os parâmetros reprodutivos, resultando, da mesma forma que para os neonatos expostos (F1E), efeitos negativos sobre a reprodução em todas as faixas de tratamento, bem como, efeitos sobre o tempo para a primeira ninhada, que foi aumentado em dois dias para as faixas em 9,86 e 14,86 mg/L.

Tabela 5 - Resultados para os testes de toxicidade crônica, CEO e CENO para parâmetros de longevidade, crescimento, reprodução e de *D. magna* expostos ao Gly e não expostos

Amostras	Concentração (mg/L)	Longevidade: sobreviventes (%)	Comprimento do corpo (mm)	Reprodução: Neonatos/ninhada	Idade da Primeira Ninhada (d)
Gly F0	Control	100	2,80 ± 0,04	6,18 ± 1,00	9,3 ± 0,48
	2,92	100	2,81 ± 0,03	5,87 ± 0,82	9,1 ± 0,31
	4,38	100	2,83 ± 0,02	5,40 ± 0,97	9,3 ± 0,67
	6,57	100	2,78 ± 0,15	5,35 ± 0,75	9,0 ± 0,00
	9,86	100	2,79 ± 0,10	5,22 ± 0,92	9,3 ± 0,67
	14,86	100	2,83 ± 0,04	5,38 ± 0,63	9,1 ± 0,31
	CEO (mg/L)	>14,86	>14,86	>14,86	>14,86
	CENO (mg/L)	no	no	no	no
Gly F1E	Control	100	2,81 ± 0,03	6,01 ± 0,98	11,00 ± 1,56
	2,92	100	2,80 ± 0,02	3,51 ± 0,82*	11,40 ± 1,77
	4,38	100	2,82 ± 0,02	3,27 ± 0,94*	11,40 ± 1,17
	6,57	100	2,76 ± 0,14	3,17 ± 0,92*	11,60 ± 1,77
	9,86	90	2,76 ± 0,09	2,48 ± 1,10*	11,60 ± 4,45
	14,86	90	2,78 ± 0,02	2,61 ± 0,32*	13,80 ± 1,03*
	CEO (mg/L)	>14,86	>14,86	2,92	14,86
	CENO (mg/L)	no	no	< 2,92	9,86
Gly F1NE	Control	100	2,80 ± 0,04	6,25 ± 1,02	10,50 ± 0,70
	R (2,92)	100	2,80 ± 0,02	3,50 ± 0,78*	12,20 ± 1,93
	R (4,38)	100	2,82 ± 0,01	3,26 ± 0,86*	12,20 ± 1,47
	R (6,57)	100	2,79 ± 0,04	3,49 ± 0,71*	10,90 ± 0,87
	R (9,86)	100	2,81 ± 0,04	3,53 ± 0,70*	12,50 ± 1,65*
	R (14,86)	100	2,81 ± 0,02	2,98 ± 0,52*	12,90 ± 1,85*
	CEO (mg/L)	no	no	R (2,92)	R (9,86)
	CENO (mg/L)	no	no	< R (2,92)	R (6,57)

Nota: O asterisco (*) representa diferença estatisticamente relevante ($p < 0,05$) entre o controle e os respectivos tratamentos. F1E representa os descendentes expostos e F1NE os descendentes não expostos, em R (recuperação) nas faixas de tratamento que os organismos parentais foram expostos.

Fonte: O Autor (2020)

Estes resultados evidenciam um menor potencial de adaptação nas gerações sucessivas, resultando em uma toxicidade permanente. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Papchenkova *et al.* (2009), que analisaram parâmetros de reprodução, tamanho e atividade de hidrolases em *D. magna* para sucessivas gerações expostas a uma formulação comercial de Gly. Para os parâmetros de crescimento e longevidade, não houve alteração em relação ao controle. Em recente trabalho, Reno *et al.* (2018) realizaram um estudo de simulação de Monte Carlo, para prever a dinâmica populacional, apontando um valor médio de λ sempre <1 para *D. magna*, indicando que populações do microcrustáceo, após uma exposição aguda ao Gly entre 0,25 e 35 mg/L⁻¹, não seriam capazes de sobreviver em condições ambientais naturais.

Após 21 dias de exposição para as fêmeas parentais, o teste crônico para AgNP não demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) em nenhuma das concentrações testadas, para os parâmetros longevidade, crescimento e idade da primeira ninhada (Tabela 6). Entretanto, em relação à reprodução, pode-se observar efeitos relevantes em 0,06 e 0,09 µg/L, em comparação ao controle.

Em um estudo crônico com uma geração, observou-se comportamento semelhante, sem alterações nos parâmetros tamanho e tempo para a primeira ninhada e sem alterações sobre a reprodução (divergindo deste estudo). Houve alteração também para a sobrevivência, que pode ser explicada pela baixa concentração utilizada nos tratamentos aqui utilizados (SAKKA *et al.*, 2016).

O experimento multigeracional F1E e F1NE com as AgNPs teve o objetivo de determinar se existe o ganho de tolerância ou se a toxicidade relacionada aumenta com o tempo. Sobre o parâmetro crescimento, não houve alteração relevante em relação ao controle para F1E e F1NE. Quanto à sobrevivência, a taxa de mortalidade foi inferior a 10% nos tratamentos com 0,04, 0,06 e 0,09 µg/L para F1E e F1NE, não apresentando relevância estatística. O parâmetro idade para a primeira ninhada não teve relevância para a quase totalidade dos tratamentos, apenas em 0,09 µg/L houve diferença estatisticamente relevante em relação ao controle para os descendentes dos parentais em F1NE. O parâmetro reprodução foi o mais atingido à exposição sub-letal com AgNP. Impactos negativos ($p < 0,05$) puderam ser observados em todas as concentrações de tratamento para F1E e em todas as faixas de recuperação para F1NE.

Tabela 6 - Resultados para os testes de toxicidade crônica, CEO e CENO para parâmetros de longevidade, crescimento, reprodução e de *D. magna* expostos a AgNP

Amostras	Concentração (mg/L)	Longevidade: sobreviventes (%)	Comprimento do corpo (mm)	Reprodução: Neonatos/ninhada	Idade da Primeira Ninhada (d)
AgNP F0	Control	100	2,65 ± 0,04	6,12 ± 1,51	11,10 ± 0,32
	0,017	100	2,67 ± 0,05	5,93 ± 1,30	11,00 ± 0,00
	0,026	100	2,67 ± 0,05	5,82 ± 0,95	11,10 ± 0,32
	0,04	100	2,66 ± 0,05	5,45 ± 0,67	11,10 ± 0,31
	0,06	100	2,66 ± 0,06	4,65 ± 1,45*	11,30 ± 0,48
	0,09	100	2,68 ± 0,06	4,22 ± 0,54*	11,20 ± 0,42
	CEO (µg/L)	>0,09	>0,09	0,06	>0,09
	CENO (µg/L)	no	no	0,04	no
AgNP F1E	Control	100	2,66 ± 0,02	6,00 ± 0,80	11,30 ± 1,25
	0,017	100	2,65 ± 0,03	3,22 ± 0,46*	10,60 ± 0,52
	0,026	100	2,67 ± 0,04	3,06 ± 0,60*	11,00 ± 0,66
	0,04	90	2,65 ± 0,04	2,97 ± 0,32*	10,80 ± 0,42
	0,06	90	2,66 ± 0,05	2,48 ± 0,62*	11,30 ± 0,82
	0,09	90	2,62 ± 0,04	1,70 ± 0,63*	10,80 ± 3,96
	CEO (µg/L)	>0,09	>0,09	0,017	>0,09
	CENO (µg/L)	no	no	< 0,017	no
AgNP F1NE	Control	100	2,68 ± 0,04	6,10 ± 0,62	10,90 ± 0,56
	R (0,017)	100	2,66 ± 0,03	3,65 ± 0,80*	11,50 ± 0,70
	R (0,026)	100	2,65 ± 0,03	3,02 ± 0,50*	11,80 ± 0,63
	R (0,04)	90	2,65 ± 0,03	2,84 ± 0,45*	10,50 ± 0,52
	R (0,06)	90	2,64 ± 0,05	2,57 ± 0,22*	11,60 ± 1,50
	R (0,09)	90	2,65 ± 0,04	2,30 ± 0,34*	12,70 ± 0,82*
	CEO (µg/L)	no	no	R (0,017)	R (0,09)
	CENO (µg/L)	no	no	< R (0,017)	R (0,06)

Nota: O asterisco (*) representa diferença estatisticamente relevante ($p < 0,05$) entre o controle e os respectivos tratamento. F1E representa os descendentes expostos e F1NE os descendentes não expostos, em R (recuperação) nas faixas de tratamento que os organismos parentais foram expostos.

Fonte: O Autor (2020)

Considerando que organismos aquáticos como *D. magna* são expostos concomitantemente a contaminantes através da água e das rotas alimentares, podemos considerar que as AgNPs, quando ingeridas, sejam translocadas para seus ovos, acarretando em efeitos negativos sobre seus descendentes (SÁ-PEREIRA *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2019), bem como ficarem aderidas ao intestino, inibido a ingestão de alimentos durante os experimentos, contribuindo assim para a diminuição das reservas de energia, como os lipídios, sendo um fator limitante para a reprodução (COWGILL; WILLIAMS; ESQUIVEL, 1984; VÖLKER *et al.*, 2013; SAKKA *et al.*, 2016)(COWGILL; WILLIAMS; ESQUIVEL, 1984; VÖLKER *et al.*, 2013; SAKKA *et al.*, 2016).

Estudo recente, sugere que alterações no conteúdo de ácidos graxos afetam diretamente a reprodução de *D. similis*, em que a diminuição do ácido linolelaídico, do ácido araquidônico e do ácido estearidônico alteram o desenvolvimento de *D. similis* (WANG *et al.*, 2018). Outro fator relevante que afeta negativamente o organismo da *D. magna* são as alterações nas células e nas membranas intracelulares resultantes da interação com as AgNPs, acarretando danos para a respiração celular e para a replicação pela ligação ao RNA e ao DNA (SCHLUESENER; SCHLUESENER, 2013).

Após o período de exposição, pode-se notar que para a mistura binária e para os parâmetros longevidade e crescimento, nenhum resultado significativo em relação ao controle foi visualizado para as amostras parentais (Tabela 7). Contudo, para o parâmetro reprodução, em todos os tratamentos com AgNP e Gly (L+L=1, L+H=2, H+L=3 e H+H=4) — sendo para AgNP 0,017 µg/L (L) e 0,09 µg/L (H), e para Gly as concentrações de 2,92 mg/L (L) e 14,86 mg/L — houve resultado estatisticamente relevante em relação ao controle ($p < 0,05$), demonstrando que a capacidade de produzir descendentes foi fortemente reduzida. O parâmetro idade para a primeira ninhada apresentou alteração relevante na mistura 4 (H+H), sendo atrasada em torno de 3 dias em relação ao controle.

Este forte impacto nos parâmetros de reprodução e idade da primeira ninhada se mostrou como um limitador para a realização dos testes, sendo necessário utilizar filhotes do terceiro dia de nascimento em cada concentração testada. Isto também interferiu nos testes de sensibilidade com os filhotes na MR 3 e 4, não sendo possível a sua realização devido à quantidade baixa de neonatos gerados.

Para F1E e F1NE o fator crescimento não apresentou alteração em nenhuma faixa da exposição à MR, nem para a R com os descendentes dos dafnídeos parentais expostos. Houve mortalidade na faixa de 20 a 30% para as misturas 3 e 4, respectivamente, em F1E, e de aproximadamente 10% em R3 e R4 com F1NE, mas este não foi um resultado com alteração estatística relevante em relação ao controle.

A capacidade de produzir descendentes foi reduzida na mistura, tanto em relação ao controle, como em relação aos resultados dos compostos individuais anteriormente destacados, demonstrando um resultado negativo de forte impacto. Tanto para o parâmetro reprodução quanto para o parâmetro de idade da primeira ninhada, em todas as faixas da mistura, seja F1E ou F1NE, os testes demonstram alterações estatisticamente relevantes ($p < 0,05$).

A diminuição nos parâmetros reprodutivos pode estar ligada à alocação de energia e recursos, pois quando os organismos são expostos a contaminantes ambientais, esta energia e estes recursos são alocados para combater os estressores (LI *et al.*, 2018). Em *D. magna*, aproximadamente 50% de sua alocação energética é constituída por lipídios, que representa a fração mais sensível e de consumo primordial nestes organismos em condições de estresse. Como esta fração lipídica é essencial à produção de ovos e ao desenvolvimento de embriões, a reprodução é prejudicada (GONÇALVES *et al.*, 2018). Este efeito deletério dos parâmetros reprodutivos converge com os resultados dos biomarcadores, que mesmo na menor concentração testada demonstrou desregulação das defesas antioxidantes, portanto, estes efeitos oxidativos possivelmente influenciaram a toxicidade crônica.

D. magna exposta à experimentos crônicos na mistura de NP de ouro com microplásticos apresentou diminuição reprodutiva relacionada ao atraso na liberação da primeira ninhada, fertilidade reduzida e efeitos na liberação de ovos abortados e juvenis imóveis (PACHECO; MARTINS; GUILHERMINO, 2018).

Em um estudo sobre a exposição subletal de *D. magna* em misturas binárias com diferentes proporções molares entre Cu (II) e glifosato, demonstrou um efeito tóxico maior para os indivíduos expostos aos complexos glifosato-Cu (II), em relação ao glifosato sozinho, levando em conta fatores comportamentais de velocidade de natação, aceleração, distância movida e inatividade (HANSEN; ROSLEV, 2016).

Cabe salientar que os efeitos mais negativos em todos os parâmetros foram observados na MR 4, que apresenta as maiores concentrações (H+H) para AgNP e Gly, respectivamente. Entretanto, levando em consideração as MR intermediárias, se destaca a MR 3 com a maior concentração do composto AgNP e menor de Gly. Um estudo sobre os efeitos da mistura de AgNP com os enantiômeros do herbicida quiral imazethapyr em *Arabidopsis thaliana* apresentou uma amplificação na ecotoxicidade enantiosseletiva, resultado de uma maior liberação de Ag⁺ a partir das NP nas maiores concentrações de AgNP (WEN *et al.*, 2016).

Tabela 7 - Resultados para os testes de toxicidade crônica para parâmetros de longevidade, crescimento, reprodução e de *D. magna* expostos à mistura binária (MR) de AgNP e Gly e não expostos

Amostras	MR	Longevidade: sobreviventes (%)	Comprimento do corpo (mm)	Reprodução: Neonatos/ninhada	Idade da Primeira Ninhada (d)
MR F0	Control	100	2,80 ± 0,05	6,13 ± 0,65	9,80 ± 0,78
	1	100	2,80 ± 0,02	3,78 ± 0,87*	10,90 ± 1,44
	2	100	2,81 ± 0,03	3,58 ± 0,64*	10,60 ± 1,35
	3	100	2,79 ± 0,09	3,44 ± 0,27*	10,90 ± 1,44
	4	100	2,78 ± 0,06	2,61 ± 0,61*	13,30 ± 1,76*
MR F1E	Control	100	2,79 ± 0,03	6,12 ± 0,64	10,30 ± 0,67
	1	100	2,79 ± 0,01	3,71 ± 0,81*	11,40 ± 0,51*
	2	100	2,79 ± 0,02	3,40 ± 0,65*	11,43 ± 0,52*
	3	80	2,77 ± 0,03	3,11 ± 0,55*	12,00 ± 0,66*
	4	70	2,77 ± 0,06	2,57 ± 0,37*	13,10 ± 1,72*
MR F1NE	Control	100	2,81 ± 0,03	6,08 ± 0,74	11,20 ± 0,63
	R1	100	2,80 ± 0,02	3,62 ± 0,49*	12,50 ± 0,70*
	R2	100	2,80 ± 0,03	3,67 ± 0,62*	12,50 ± 0,52*
	R3	90	2,78 ± 0,08	3,36 ± 0,69*	12,40 ± 0,84*
	R4	90	2,78 ± 0,06	2,88 ± 0,56*	12,80 ± 1,22*

O asterisco (*) representa diferença estatisticamente relevante ($p < 0,05$) entre o controle e os respectivos tratamentos. F1E representa os descendentes expostos e F1NE os descendentes não expostos em R (recuperação) nas faixas de tratamento que os organismos parentais foram expostos. MR representa as faixas de mistura entre AgNP e Gly (L+L=1, L+H=2, H+L=3 e H+H=4, respectivamente)

Fonte: O Autor (2020)

Os resultados indicam que a possibilidade da mistura de AgNP e Gly, mesmo em condições subletais, pode trazer prejuízo ao sistema alimentar com um todo, ocasionado pela diminuição na população de microinvertebrados como *D. magna*, sugerindo um potencial impacto e desequilíbrio ambiental ao longo do tempo (KARIMI *et al.*, 2018).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, foi realizada um estudo, acerca dos efeitos associados à toxicidade aguda e crônica multigeracional, para a mistura binária entre AgNP e Gly, em relação à exposição *in vivo* para organismo teste *D. magna*. Apesar da literatura fornecer uma vasta gama de informações sobre os efeitos toxicológicos para os componentes isolados da mistura (AgNP e Gly), este estudo foi o primeiro a verificar os efeitos da interação desta mistura para os parâmetros analisados *in vivo*.

Para os estudos das possíveis interações, a partir da metodologia proposta por Abbott, resultados de inibição de toxicidade puderam ser observados em algumas faixas de tratamento, resultando em efeitos antagônicos para a exposição à MR em relação a exposição com os componentes individuais (AgNP e Gly), para os ensaios de toxicidade aguda. A mistura também resultou em estresse e dano oxidativo em *D. magna*, resultado este que interferiu nos parâmetros reprodutivos para as exposições em níveis crônicos. Outro fator relevante, que pode ser observado nas exposições sub-letais, foi a não recuperação destes parâmetros para os descendentes não expostos, resultado que remete à um dano permanente e prejudicial.

Portanto, as hipóteses neste estudo foram confirmadas, o que demonstra um potencial risco ambiental que pode ser extrapolado para diferentes organismos.

6 CONCLUSÕES

A síntese de AgNP foi bem-sucedida, apresentando morfologia esférica, sem aglomeração e com diâmetro médio de $4,37 \pm 0,30$ nm, resultados condizentes com estudos já realizados;

AgNP e Gly apresentaram efeitos em níveis de exposição aguda. Considerando AgNP, o tamanho e morfologia das NP foram determinantes para o resultado;

O modelo de Abbott utilizado para a previsão das interações na mistura se mostrou interessante quanto aos resultados, demonstrando efeitos de antagonismo e sinergismo, provavelmente relacionados à complexação da AgNP pelo Gly;

As concentrações da MR investigadas induziram uma desregulação dos biomarcadores bioquímicos envolvidos no sistema de defesa antioxidante em *D. magna* expostas aos tratamentos, em que atividade enzimática/não enzimática da CAT, SOD e GSH não foram capazes de modular a produção de EROs, resultando em estresse oxidativo e danos por peroxidação lipídica.

Os resultados demonstraram que os efeitos da mistura de AgNP e Gly, em mais de uma geração, a níveis crônicos, são mais tóxicos do que seus compostos individuais, afetando principalmente os parâmetros reprodutivos. Para todos os tratamentos na MR, tanto para os organismos parentais, como para seus descendentes, houve decréscimo relevante na quantidade de filhotes gerados, bem como atraso para o surgimento da primeira ninhada nos descendentes da MR. Corroborando assim, com os resultados do biomarcadores bioquímicos, onde a desregulação das defesas antioxidantes, resultante em efeitos oxidativos, influenciando os efeitos da toxicidade crônica.

Não houve recuperação para os descendentes não expostos, demonstrando uma preocupante toxicidade permanente e prejudicial na interação entre os elementos, que pode ser extrapolada para outros organismos potencialmente expostos.

Estes parâmetros fornecem dados relevantes para uma previsão de um possível comportamento da população de dafnídeos ao longo do tempo.

7 RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados obtidos, algumas recomendações para pesquisas futuras baseadas neste estudo são:

- Sugere-se que mais pesquisas sobre os efeitos da coexposição de AgNP e Gly sejam realizadas com diferentes organismos, sobretudo testes multigeracionais, pois efeitos relevantes podem surgir ao longo do tempo, isto para que o real efeito sobre populações seja elucidado;
- Sugere-se estudos de modelagem das possíveis interações entre AgNP (com diferentes morfologias e tamanhos) e Gly, utilizando ferramentas variadas, como, por exemplo, isobologramas, para um maior gradiente de concentrações;
- Sugere-se avaliações comportamentais sobre os efeitos da coexposição, como, por exemplo, efeitos sobre a natação, velocidade de movimentos, batimentos cardíacos, entre outros, para uma avaliação mais completa do real impacto sobre o organismo;
- Sugere-se também, avaliações comportamentais sobre os efeitos da coexposição, após tratamentos nos organismos avaliados, com compostos antioxidantes, como por exemplo, Vitamina C;
- Sugere-se ainda, estudos futuros para avaliar se os efeitos da MR binária sobre organismos testem vegetais, como macrófitas *Landoltia punctata* (lemna) ou *Lactuca sativa* (semente de alface). Uma vez que esse agrotóxico tem seu uso amplamente difundido em atividades de agricultura cujo foco principal é o cultivo de alimentos que, em sua maioria, compreendem espécies vegetais.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265–267, 1 abr. 1925. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>>.
- ABDUL KAREEM, T.; ANU KALIANI, A. Synthesis and thermal study of octahedral silver nano-plates in polyvinyl alcohol (PVA). **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 325–331, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.06.054>>.
- ABNT, A. B. D. N. T. **NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp. (Cladocera, Crustacea)** Rio de Janeiro, 2016. .
- ABNT NBR 12713. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera) Aquatic. n. 4, p. 1–23, 2016. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/7483>>.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, jan. 1984.
- AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Adv.**, v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C3RA44507K>>.
- AKTER, M. et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. **Journal of Advanced Research**, v. 9, p. 1–16, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>>.
- ALBERDI, J. L. et al. Comparative Acute Toxicity of Two Herbicides, Paraquat and Glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 57, n. 2, p. 229–235, 1996.
- ALE, A. et al. Exposure to a nanosilver-enabled consumer product results in similar accumulation and toxicity of silver nanoparticles in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 211, n. December 2018, p. 46–56, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.018>>.
- ANDRADE-WARTHA, E. R. S. de. **Capacidade antioxidante in vitro do pedúnculo de caju (Anacardium Occidentale L .) e efeito sobre as enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal**. 2007. Universidade de São Paulo, 2007.
- ANDREANI, T. et al. Influence of the stabilizers on the toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms and human cell lines. **Science of the Total Environment**, v. 607–608, p. 1264–1277, 2017a.

ANDREANI, T. et al. Influence of the stabilizers on the toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms and human cell lines. **Science of the Total Environment**, v. 607–608, p. 1264–1277, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.098>>.

ANGEL, B. M. et al. The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 359–365, 2013a.

ANGEL, B. M. et al. The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 359–365, 2013b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.096>>.

ANTUNES-NETO, J. M. F.; SILVA, L.P.; MACEDO, D. V. Biomarcadores de Estresse Oxidativo : Novas Possibilidades de Monitoramento. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 13, n. 19, p. 73–79, 2006.

ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B. Pulgas-de-água (*Daphnia* spp .). p. 1–3, 2017.

ANVISA. NOTA TÉCNICA Nº 23/2018/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2017.

ANYANWU, B. O. et al. Heavy metal mixture exposure and effects in developing nations: An update. **Toxics**, v. 6, n. 4, p. 1–32, 2018.

ASGHARI, S. et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, p. 1–11, 2012.

AZEVEDO, F. A. de; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: RiMa, 2003.

BACKHAUS, T.; FAUST, M. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: A conceptual framework. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 5, p. 2564–2573, 2012.

BAKER, S. et al. Nanoagroparticles emerging trends and future prospect in modern agriculture system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 10–17, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.04.012>>.

BARATA, C. et al. Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 1, p. 81–90, 2005a.

BARATA, C. et al. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 2, p. 175–186, fev. 2005b.

BARATA, C. et al. Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 370–379, 2007.

BARRETT, K. A.; MCBRIDE, M. B. Trace Element Mobilization in Soils by Glyphosate. **Soil Science Society of America Journal**, 2006.

BASHARI, A.; KOOHESTANI, A. H. S.; SALAMATIPOUR, N. Eco-friendly Dual-Functional Textiles: Green Water-Repellent & Anti-Bacterial. **Fibers and Polymers**, v. 21, n. 2, p. 317–323, 2020.

BASHIR, O.; KHAN, Z. Silver nano-disks : Synthesis , encapsulation , and role of water soluble starch. **Journal of Molecular Liquids**, v. 199, p. 524–529, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2014.09.041>>.

BATTAGLIN, W. A. et al. Glyphosate, other Herbicides, and Transformation Product in Midwestern Streams. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 41, n. 2, p. 323–332, 2005.

BECARO, A. A. et al. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 3, p. 22–29, 2015.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, 2016.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 61, p. 882–8, 1963. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13967893>>.

BEYENE, H. D. et al. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 13, n. January, p. 18–23, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.susmat.2017.08.001>>.

BOUR, A. et al. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p. 764–777, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.021>>.

BOWNIK, A. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 194–205, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.199>>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273?via%3Dihub>>. Acesso em: 29 abr. 2020.

BRASIL. RESOLUÇÃO No 410, DE 17 DE MARÇO DE 2009 - Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2009. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>.

BRASIL. ATO Nº 58, DE 27 DE AGOSTO DE 2019. **Diário Oficial da União**, 2019. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/web/dou/-/ato-n-58-de-27-de-agosto-de-2019-213474289>>.

CABALLERO-DÍAZ, E.; VALCERCEL CASES, M. Analytical methodologies for nanotoxicity assessment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 160–171, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.007>>.

CAETANO, M. S. INATIVAÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO E FORMAÇÃO DO 5-. 2011.

CAMPOS-GARCIA, J. et al. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish nile tilapia: Nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 131–137, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.005>>.

CARVALHO, L. M. S. **Preparação de filmes de quitosana reforçados com nanofibras de celulose : estudo das propriedades físico-químicas na associação com o herbicida glifosato**. 2017. Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

CASSAULT-MEYER, E. et al. An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 131–140, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.007>>.

CAVASSIN, E. D. Estudo da ação in vitro de nanopartícula de prata Emerson Danguy Cavassin Estudo da ação in vitro de nanopartícula de prata. p. 120, 2013.

CHANDRAN, S. et al. Biosynthesis of PVA encapsulated silver nanoparticles. **Journal of Applied Research and Technology**, v. 14, n. 5, p. 319–324, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jart.2016.07.001>>.

CHÂTEL, A.; MOUNEYRAC, C. Signaling pathways involved in metal-based nanomaterial toxicity towards aquatic organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 196, n. March, p. 61–70, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.03.014>>.

CHEN, L. Q. et al. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: Size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 501–509, 2015.

CHEN, M.; WANG, D.; LIU, X. nano-spheres and nano-chains with controllable. p.

9549–9553, 2016.

CHERNOUSOVA, S.; EPPLE, M. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 6, p. 1636–1653, 2013.

CLEMENTS, D. et al. Herbicide efficacy for aquatic *Alternanthera philoxeroides* management in an early stage of invasion: integrating above-ground biomass, below-ground biomass and viable stem fragmentation. **Weed Research**, v. 57, n. 4, p. 257–266, 2017.

COSTA, C. R. et al. Quim. Nova, Vol. 31, No. 7, 1820-1830, 2008 A TOXICIDADE EM AMBIENTES AQUÁTICOS: DISCUSSÃO E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO Carla. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/quimicanova.sbq.org.br/pdf/Vol31No7_1820_37-RV07485.pdf>.

COSTA PUERARI, R. et al. The influence of amine-functionalized SiO₂ nanostructures upon nanofiltration membranes. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 13, n. December 2019, 2020.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: Revisão. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038–1045, 2005.

COWGILL, U. M.; WILLIAMS, D. M.; ESQUIVEL, J. B. Effects of Maternal Nutrition on Fat Content and Longevity of Neonates of *Daphnia Magna*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 4, n. 2, p. 173–190, 1 mar. 1984. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/1548014>>.

CRISTINA, K.; MARTINEZ, C. B. R. Ecotoxicology and Environmental Safety Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup s , alone and in combination , on the Asian clam *Corbicula fl uminea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 7–14, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.014>>.

CUHRA, M.; TRAAVIK, T.; BØHN, T. Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 2, p. 251–262, 2013.

CUI, F. et al. Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 169, p. 107–116, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.073>>.

CUI, F. et al. Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 169, p. 107–116, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.073>>.

CUI, R.; CHAE, Y.; AN, Y.-J. Dimension-dependent toxicity of silver nanomaterials on the cladocerans *Daphnia magna* and *Daphnia galeata*. **Chemosphere**, v. 185, p.

205–212, 2017a. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653517310548>>.

CUI, R.; CHAE, Y.; AN, Y. J. Dimension-dependent toxicity of silver nanomaterials on the cladocerans *Daphnia magna* and *Daphnia galeata*. **Chemosphere**, v. 185, p.

205–212, 2017b. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.011>>.

DAI, P. et al. Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 5, p. 519–526, 2016.

DAMÁSIO, J. et al. Biochemical mechanisms of resistance in *Daphnia magna* exposed to the insecticide fenitrothion. **Chemosphere**, v. 70, n. 1, p. 74–82, 2007.

DANIAL, R. et al. FTIR, CHNS and XRD analyses define mechanism of glyphosate herbicide removal by electrocoagulation. **Chemosphere**, v. 233, p. 559–569, 2019.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.010>>.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, n. DEC, p. 1–13, 2014.

DASTKHOON, M. et al. Comparative study of ability of sonochemistry combined ZnS:Ni nanoparticles-loaded activated carbon in reductive of organic pollutants from environmental water samples. **Polyhedron**, v. 180, p. 114341, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.114341>>.

DE AGUIAR, L. M. et al. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 185–186, p. 94–101, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.006>>.

DE GÓES, R. E.; MULLER, M.; FABRIS, J. L. Spectroscopic detection of glyphosate in water assisted by laser-ablated silver nanoparticles. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 5, 2017.

DE JONG, W. H. et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1912–1919, 2008.

DE MELO, M. S. et al. Modulation of antioxidant gene expressions by Roundup® exposure in the decapod *Macrobrachium potiana*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, n. October 2019, p. 110086, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110086>>.

DERUYTTER, D. et al. Mixture toxicity in the marine environment: Model development and evidence for synergism at environmental concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 12, p. 3471–3479, 2017.

DI NICA, V. et al. Toxicity of Quaternary Ammonium Compounds (QACs) as single compounds and mixtures to aquatic non-target microorganisms: Experimental data and predictive models. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, n. January, p. 567–577, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.028>>.

DI POI, C. et al. Toxicity assessment of five emerging pollutants, alone and in binary or ternary mixtures, towards three aquatic organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 6122–6134, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-017-9306-9>>.

DING, J. et al. Bioconcentration of the antidepressant fluoxetine and its effects on the physiological and biochemical status in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, n. November 2016, p. 102–109, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.042>>.

DORIA, H. B. **AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA QUALIDADE DE ÁGUA DOS RESERVATÓRIOS DE ALAGADOS E VOSSOROCA COM O USO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO**. 2014. Universidade Federal do Paraná, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>><http://dx.doi.org/10.1038/nature10402>><http://dx.doi.org/10.1038/nature21059>><http://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127>><http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2577>><http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2577>>.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 421–31, 1990.

DUAN, K. et al. The Impact of Glyphosate-Based Herbicides and Their Components on *Daphnia Magna*. p. 1–47, 2019.

DURÁN, N. et al. Silver nanoparticles : A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 789–799, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>>.

EL-NAGGAR, N. E.-A.; HUSSEIN, M. H.; EL-SAWAH, A. A. Bio-fabrication of silver nanoparticles by phycocyanin, characterization, in vitro anticancer activity against breast cancer cell line and in vivo cytotoxicity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10844, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-11121-3>>.

EL BADAWY, A. M. et al. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 283–287, 2011.

EPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. EPA-821-R-02-012. **U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY**, n. Washington DC, 2002.

EPA. **No Title**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/glyphosate>>.

ERICKSON, R. A. et al. A Daphnia population model that considers pesticide exposure and demographic stochasticity. **Ecological Modelling**, v. 275, p. 37–47, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.12.015>>.

FABREGA, J. et al. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment International**, v. 37, n. 2, p. 517–531, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.012>>.

FAN, W. et al. Two-generational effects and recovery of arsenic and arsenate on Daphnia magna in the presence of nano-TiO₂. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, n. 37, p. 136–143, 2019.

FARIA, EDINETE M.; ELEMEN, GIOVANNA R. DE A.; SILVA, ACARÍLIA E.; MENDONÇA, ELISÂNGELA A. DE M.; OLIVEIRA, E. E. Nanotecnologia e meio ambiente: uma análise sobre os riscos e benefícios dessa tecnologia em um contexto atual. **Revista Biol. Farm.**, v. 9, n. March, p. 18–26, 2013.

FERREIRA, A. L. G.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on Daphnia magna. **Aquatic Toxicology**, v. 89, n. 1, p. 28–39, 2008.

FJORDBØGE, A. S. et al. Zero valent iron reduces toxicity and concentrations of organophosphate pesticides in contaminated groundwater. **Chemosphere**, v. 90, n. 2, p. 627–633, 2013.

FLOHR, L. **Ensaio Toxicológicos com Daphnia Magna como Alternativa para Classificação de Resíduos Sólidos Industriais**. 2007. Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

FLUEGGE, K.; FLUEGGE, K. Glyphosate use predicts healthcare utilization for ADHD in the healthcare cost and utilization project net (HCUPnet): A two-way fixed-effects analysis. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 25, n. 4, p. 1489–1503, 2016.

FRIDOVICH, J. M. M. I. Superoxide Dismutase An Enzymic Function For Erythrocyte (Hemocytin). **Journal of Biological Chemistry**, n. 22, 1969. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100>>.

FU, P. P. et al. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 64–75, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949814000064>>.

FUZINATTO, C. F. et al. Oxidative stress and hypermethylation induced by exposure of Oreochromis niloticus to complex environmental mixtures of river water from Cubatão do Sul, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 190–197, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.025>>.

GALHANO, V. et al. Impact of wastewater-borne nanoparticles of silver and titanium dioxide on the swimming behaviour and biochemical markers of *Daphnia magna*: An integrated approach. **Aquatic Toxicology**, v. 220, n. October 2019, 2020.

GAMA, C. F. **Uma proposta para o ensino de nanociência e da nanotecnologia, nas aulas de física no ensino médio**. 2013. Universidade de São Paulo, 2013. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/81/81131/tde-25112014-152017/publico/Catia_Fernandes_Gomes.pdf>.

GAO, M. et al. Toxic effects of nanomaterial-adsorbed cadmium on *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. 399, p. 261–268, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.038>>.

GARCÍA-GÓMEZ, C. et al. Science of the Total Environment Joint effects of zinc oxide nanoparticles and chlorpyrifos on the reproduction and cellular stress responses of the earthworm *Eisenia andrei*. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 199–207, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.083>>.

GARCIA, M. V. D. **Síntese , caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. 2011. 2011.

GATIDOU, G.; THOMAIDIS, N. S. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. **Aquatic Toxicology**, v. 85, n. 3, p. 184–191, 2007.

GÖKÇE, D.; KÖYTEPE, S.; ÖZCAN, İ. Effects of nanoparticles on *Daphnia magna* population dynamics. **Chemistry and Ecology**, v. 34, n. 4, p. 301–323, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02757540.2018.1429418>>.

GOMES, S. I. L. et al. Effects of silver nanoparticles to soil invertebrates: Oxidative stress biomarkers in *Eisenia fetida*. **Environmental Pollution**, v. 199, p. 49–55, 2015.

GONÇALO VALE et al. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment – Biochemical responses on freshwater organisms : A critical overview. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 162–174, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.019>>.

GONÇALVES, R. A. et al. Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests. **Aquatic Toxicology**, v. 197, n. September 2017, p. 32–40, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.002>>.

GONZÁLEZ-DONCEL, M. et al. The role of PFOS on triclosan toxicity to two model freshwater organisms. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114604, 2020.

GOPINATH, P. M. et al. Multi-functional nano silver: A novel disruptive and theranostic agent for pathogenic organisms in real-time. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 1–16, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep34058>>.

GRANDCOIN, A.; PIEL, S.; BAURİĆ, E. AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. **Water Research**, v. 117, p. 187–197, 2017.

GUILHERMINO, L. et al. Uptake and effects of the antimicrobial florfenicol, microplastics and their mixtures on freshwater exotic invasive bivalve *Corbicula fluminea*. **Science of the Total Environment**, v. 622–623, p. 1131–1142, 2018.

HAIDER, A.; KANG, I. K. Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: A comprehensive review. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2015, 2015.

HAMOUDA, R. A. et al. Synthesis and biological characterization of silver nanoparticles derived from the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. **Scientific Reports**, n. August, p. 1–17, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-49444-y.pdf>>.

HANSEN, L. R.; ROSLEV, P. Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. **Aquatic Toxicology**, v. 179, p. 36–43, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.010>>.

HU, X. et al. Characterization and toxicity of nanoscale fragments in wastewater treatment plant effluent. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 1332–1341, 2018a.

HU, Y. et al. Distinct toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna* in M4 medium and surface water. **Science of the Total Environment**, v. 618, p. 838–846, 2018b.

HUETE-SOTO, A. et al. Simultaneous removal of structurally different pesticides in a biomixture: Detoxification and effect of oxytetracycline. **Chemosphere**, v. 169, p. 558–567, 2017.

ISO/TS 80004-1. Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms. 2015. Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:en:sec:2.4>>.

ISO. ISO 10706:2000 - Water Quality - Determination of Long Term Toxicity of Substances to *Daphnia Magna* Straus (Cladocera, Crustacea). 2000.

ISO. **ISO 6341:2012 - Water Quality - Determination of the Inhibition of the Mobility of *Daphnia Magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute Toxicity Test.** [s.l: s.n.].

ISO, I. O. F. S. **Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Stratus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test: ISO 6341.** [s.l: s.n.]

ISWARYA, V. et al. Individual and binary toxicity of anatase and rutile nanoparticles towards *Ceriodaphnia dubia*. **Aquatic Toxicology**, v. 178, p. 209–221, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.007>>.

IUMMATO, M. M. et al. Effect of glyphosate on the growth, morphology, ultrastructure and metabolism of *Scenedesmus vacuolatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, n. February, p. 471–479, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.083>>.

IVASK, A. et al. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

JANSEN, M. et al. Evolutionary ecotoxicology of pesticide resistance: A case study in *Daphnia*. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 3, p. 543–551, 2011.

JANSSENS, L.; STOKS, R. Stronger effects of Roundup than its active ingredient glyphosate in damselfly larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 193, n. July, p. 210–216, 2017.

JUMARIE, C.; ARAS, P.; BOILY, M. Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. **Chemosphere**, v. 168, p. 163–170, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.056>>.

KALWAR, K.; SHAN, D. Antimicrobial effect of silver nanoparticles (AgNPs) and their mechanism – A mini review. **Micro and Nano Letters**, v. 13, n. 3, p. 277–280, 2018.

KARIMI, S. et al. Acute and chronic toxicity of metal oxide nanoparticles in chemical mechanical planarization slurries with *Daphnia magna*. **Environmental Science: Nano**, v. 5, n. 7, p. 1670–1684, 2018.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>>.

KHANNA, P. K. et al. Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method. **Materials Chemistry and Physics**, v. 93, n. 1, p. 117–121, 2005.

KHODASHENAS, BAHAREH, G. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. **Materials Letters**, v. 59, n. 14–15, p. 1760–1763, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.014>>.

KIM, I. et al. Chemosphere Citrate coated silver nanoparticles change heavy metal toxicities and bioaccumulation of *Daphnia magna*. v. 143, p. 99–105, 2016a.

KIM, I. et al. Citrate coated silver nanoparticles change heavy metal toxicities and bioaccumulation of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 143, p. 99–105, 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.046>>.

KIM, J. et al. Molecular cloning of *Daphnia magna* catalase and its biomarker potential against oxidative stresses. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 263–269, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.05.001>>.

KIMBERLY, D. A.; SALICE, C. J. Multigenerational contaminant exposures produce non-monotonic, transgenerational responses in *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 207, p. 176–182, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.09.020>>.

KNAPIK, L. F. O.; RAMSDORF, W. Ecotoxicity of malathion pesticide and its genotoxic effects over the biomarker comet assay in *Daphnia magna*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 5, 2020.

KÖERICH, J. S. et al. Toxicity of binary mixtures of Al₂O₃ and ZnO nanoparticles toward fibroblast and bronchial epithelium cells Toxicity of binary mixtures of Al₂O₃ and ZnO nanoparticles toward fibroblast and bronchial epithelium cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A - In press**.

KRYSTEK, P. et al. Exploring methods for compositional and particle size analysis of noble metal nanoparticles in *Daphnia magna*. **Talanta**, v. 147, p. 289–295, 2016.

KUMAR, D. et al. Qualitative toxicity assessment of AgNPs on the fresh water bacterial isolates and consortium at low level of exposure concentration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 108, p. 152–160, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.033>>.

KWIATKOWSKA, M. et al. DNA damage and methylation induced by glyphosate in peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 93–98, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691517301497>>.

LACAVE, J. M. et al. Acute toxicity, bioaccumulation and effects of dietary transfer of silver from brine shrimp exposed to PVP/PEI-coated silver nanoparticles to zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 199, p. 69–80, 2017.

LALAU, C. M. et al. Toxicological effects of AgNPs on duckweed (*Landoltia punctata*). **Science of the Total Environment**, v. 710, p. 136318, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136318>>.

LAPRESTA-FERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; BLASCO, J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 32, n. 797, p. 40–59, 2012.

LARSEN, K. E. et al. The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 41–44, 2016.

LE, T. H. et al. Effects of glyphosate and methidathion on the expression of the Dhb, Vtg, Arnt, CYP4 and CYP314 in *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 79, n. 1, p. 67–71, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.067>>.

LÉCRIVAIN, N. et al. Multi-contamination (heavy metals, polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons) of littoral sediments and the associated ecological risk assessment in a large lake in France (Lake Bourget). **Science of the Total Environment**, v. 619–620, p. 854–865, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.151>>.

LEON, M. E. et al. Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: a pooled analysis from the AGRICOH consortium. n. March, p. 1519–1535, 2019.

LESSARD, C. R.; FROST, P. C. Phosphorus nutrition alters herbicide toxicity on *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 421–422, p. 124–128, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.040>>.

LI, D. et al. Individual and binary mixture effects of bisphenol A and lignin-derived bisphenol in *Daphnia magna* under chronic exposure. **Chemosphere**, v. 191, p. 779–786, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.022>>.

LI, J. et al. Evaluation and monitoring of superoxide dismutase (SOD) activity and its clinical significance in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. **Medical Science Monitor**, v. 25, p. 2032–2042, 2019.

LI, L. Z. et al. A metabolomic study on the responses of *daphnia magna* exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 66–73, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.005>>.

LI, M. et al. Metabolic profiling of gold fish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. v. 188, n. March, p. 159–169, 2017.

LI, Z. Silver nano-needles: focused optical field induced solution synthesis and application in remote-excitation nanofocusing SERS. v. 11, n. 5, 2019.

LIN, W. et al. Joint effect of nanoplastics and humic acid on the uptake of PAHs for *Daphnia magna*: A model study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 391, n. January, p. 122195, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122195>>.

LIU, H.; YUAN, B.; LI, S. Altered quantities and in vivo activities of cholinesterase from *Daphnia magna* in sub-lethal exposure to organophosphorus insecticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 118–125, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.014>>.

LIU, N. et al. Separate and combined effects of glyphosate and copper on growth and antioxidative enzymes in *Salvinia natans* (L.) All. **Science of the Total Environment**, v. 655, p. 1448–1456, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.213>>.

LIU, Y. et al. Single and mixture toxicities of BDE-47, 6-OH-BDE-47 and 6-MeO-BDE-47 on the feeding activity of *Daphnia magna*: From behavior assessment to neurotoxicity. **Chemosphere**, v. 195, p. 542–550, 2018.

LOESCHNER, K. et al. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 18, 2011. Disponível em: <<http://www.particleandfibretoxicology.com/content/8/1/18>>.

LORENZ, C. S. et al. Nano-sized Al₂O₃ reduces acute toxic effects of thiacloprid on the non-biting midge *Chironomus riparius*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–13, 2017.

LU, F.; ASTRUC, D. Nanocatalysts and other nanomaterials for water remediation from organic pollutants. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 408, p. 213180, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213180>>.

LU, Y.; CHOU, K. A simple and effective route for the synthesis of nano-silver colloidal dispersions. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 39, p. 673–678, 2008.

LUO, L. J.; NGUYEN, D. D.; LAI, J. Y. Dually functional hollow ceria nanoparticle platform for intraocular drug delivery: A push beyond the limits of static and dynamic ocular barriers toward glaucoma therapy. **Biomaterials**, v. 243, n. February, p. 119961, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119961>>.

LUO, X. et al. Morphology control of silver nano-crystals through a polyol synthesis. **Solid State Sciences**, v. 13, n. 9, p. 1719–1723, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2011.06.024>>.

LUPI, L. et al. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. **Science of the Total Environment**, v. 536, p. 687–694, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.090>>.

LUPI, L. et al. Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina. **Chemosphere**, v. 225, p. 906–914, 2019.

LV, X. et al. Mechanisms underlying the acute toxicity of fullerene to *Daphnia magna*: Energy acquisition restriction and oxidative stress. **Water Research**, v. 123, p. 696–703, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.023>>.

MACKEVICA, A. et al. Chronic toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* under different feeding conditions. v. 161, p. 10–16, 2015.

MAHDI, K. N. M. et al. Transport of silver nanoparticles by runoff and erosion – A flume experiment. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 1418–1426, 2017a.

MAHDI, K. N. M. et al. Transport of silver nanoparticles by runoff and erosion – A flume experiment. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 1418–1426, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.020>>.

MANSOUR, S. A. et al. Toxicity of Some Pesticides, Heavy Metals and Their Mixtures to *Vibrio fischeri* Bacteria and *Daphnia magna*: Comparative Study. **Journal of Biology and Life Science**, v. 6, n. 2, p. 221, 2015. Disponível em: <<http://www.macrothink.org/journal/index.php/jbls/article/view/8174>>.

MANSOUR, S. A.; GAD, M. F. Risk assessment of pesticides and heavy metals contaminants in vegetables: A novel bioassay method using *Daphnia magna* Straus. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 377–389, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.026>>.

MARCATO, P. D. et al. Biogenic silver nanoparticles : Antibacterial and cytotoxicity applied to textile fabrics. v. 20, p. 69–76, 2012.

MARTÍN-DE-LUCÍA, I. et al. Combined toxicity of graphite-diamond nanoparticles and thiabendazole to *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 1145–1154, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.316>>.

MASTELING, R. P. et al. Whole-organism and biomarker endpoints in *Daphnia magna* show uncoupling of oxidative stress and endocrine disruption in phenolic derivatives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 134, p. 64–71, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.012>>.

MATIAS, W. G. **Apostila de Toxicologia Ambiental**. [s.l: s.n.].

MCCLELLAN, R. O. Critical Reviews in Toxicology Evaluating the potential carcinogenic hazard of glyphosate. v. 8444, p. 9–11, 2016.

MCGILLICUDDY, E. et al. Science of the Total Environment Silver nanoparticles in the environment : Sources , detection and ecotoxicology. **Science of the Total Environment**, The, v. 575, p. 231–246, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>>.

MCKNIGHT, U. S. et al. Sources, occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. **Environmental Pollution**, v. 200, p. 64–76, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.02.015>>.

MCSHAN, D.; RAY, P. C.; YU, H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 116–127, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>>.

MELEGARI, S. P. et al. Can the surface modification and/or morphology affect the ecotoxicity of zinc oxide nanomaterials? **Chemosphere**, v. 224, p. 237–246, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.093>>.

MELO, M. A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MERTENS, M. et al. Glyphosate, a chelating agent—relevant for ecological risk assessment? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 6, p. 5298–5317, 2018.

MESNAGE, R. et al. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 133–153, 2015.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 294–299, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047>>.

MOHAN, S. et al. Morphological Transformation of Silver Nanoparticles from Commercial Products : Modeling from Product Incorporation , Weathering through Use Scenarios , and Leaching into Wastewater. 2019.

MOTTIER, A. et al. Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): FROM molecular to individual levels. **Marine Pollution Bulletin**, v. 95, n. 2, p. 665–677, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.026>>.

MUKHERJEE, A. et al. Nanoparticle silver coexposure reduces the accumulation of weathered persistent pesticides by earthworms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1864–1871, 2017.

MULFINGER, L. et al. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322–325, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ed084p322%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1021/ed084p322%5Cnhttp://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed084p322>>.

MWAANGA, P.; CARRAWAY, E. R.; VAN DEN HURK, P. The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. **Aquatic Toxicology**, v. 150, p. 201–209, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.011>>.

MYERS, J. P. et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks

associated with exposures: A consensus statement. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>>.

NAASZ, S.; ALTENBURGER, R.; KÜHNEL, D. Environmental mixtures of nanomaterials and chemicals: The Trojan-horse phenomenon and its relevance for ecotoxicity. **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 1170–1181, 2018.

NBR, A. ABNT NBR 13373:2017 -Aquatic ecotoxicology - Chronic toxicity - Test method with Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera). p. 20, 2017. Disponível em: <<https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=368530>>.

NGUYEN, N. H.; TRAN, G. B.; NGUYEN, C. T. Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. **Journal of Molecular Medicine**, v. 98, n. 1, p. 59–69, 2020.

NISKA, K. et al. Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. **Chemico-Biological Interactions**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.018>>.

NITI, C. et al. Bioremediation : An emerging technology for remediation of pesticides **Bioremediation: A n e m e r g i n g t e c h n o l o g y f o r r e m e d i a t i o n o f p e s t i c i d e s**. n. June, 2017.

NOGUEIRA, D. J. et al. Crystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward Daphnia magna and ecological risk assessment. **Environmental Research**, v. 182, n. November 2019, 2020a.

NOGUEIRA, D. J. et al. Crystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward Daphnia magna and ecological risk assessment. **Environmental Research**, v. 182, 2020b.

NUNES, R. C. A.; VIANA, R. S.; NETO, N. B. M. Atividade enzimática da superóxido dismutase em resposta aos fitorreguladores em Gerbera jamensonii. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 1, p. 83–89, 2015.

NYS, C. et al. a Framework for Ecological Risk Assessment of Metal Mixtures in Aquatic Systems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 623–642, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/etc.4039>>.

O DUKE, S.; B POWLES, S. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest management science**, v. 63, n. 11, p. 1100–1106, 2008.

OGUNSUYI, O. I. et al. Genetic and systemic toxicity induced by silver and copper oxide nanoparticles, and their mixture in Clarias gariepinus (Burchell, 1822). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 26, p. 27470–27481, 2019.

OKADA, E.; COSTA, J. L.; BEDMAR, F. Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. **Geoderma**, v. 263, p. 78–85,

2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.09.009>>.

OLIVEIRA, L. L. D. de. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos**
Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos. 2014. Universidade de São Paulo, 2014.

ØRSTED, M.; ROSLEV, P. A fluorescence-based hydrolytic enzyme activity assay for quantifying toxic effects of Roundup® to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 8, p. 1841–1850, 2015.

PACHECO, A.; MARTINS, A.; GUILHERMINO, L. Toxicological interactions induced by chronic exposure to gold nanoparticles and microplastics mixtures in *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 628–629, p. 474–483, 2018.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.081>>.

PALLAVICINI, P. et al. Journal of Colloid and Interface Science Silver nanoparticles synthesized and coated with pectin : An ideal compromise for anti-bacterial and anti-biofilm action combined with wound-healing properties. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 498, p. 271–281, 2017. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2017.03.062>>.

PANDIARAJAN, J.; KRISHNAN, M. Properties, synthesis and toxicity of silver nanoparticles. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 3, p. 387–397, 2017.

PAPCHENKOVA, G. A.; GOLOVANOV, I. L.; USHAKOVA, N. V. The Parameters of Reproduction , Sizes , and Activities of Hydrolases in *Daphnia magna* Straus of Successive Generations Affected by Roundup Herbicide. v. 2, n. 3, p. 286–291, 2009.

PATIL, V. et al. Chemosphere Synthesis of silver nanoparticles colloids in imidazolium halide ionic liquids and their antibacterial activities for gram-positive and gram-negative bacteria. v. 243, p. 1–10, 2020.

PATRICIA, C. S. et al. Responses to silver nanoparticles and silver nitrate in a battery of biomarkers measured in coelomocytes and in target tissues of *Eisenia fetida* earthworms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, n. October 2016, p. 57–63, 2017. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.008>>.

PEREIRA, A. C. et al. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1841–1853, 2019.

PEREIRA, A. E. S. et al. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p.

207–215, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.01.025>>.

PÉREZ, G. L.; VERA, M. S.; MIRANDA, L. A. Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. **Herbicides and the Environment**, p. 343–368, 2011.

PERINA, F. C. **Avaliação de Risco Ecológico devido à contaminação por metais no setor sul do Complexo Estuarino-Lagunar Cananéia-Iguape**. 2016. 2016.

PETERS, R. J. B. et al. Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 54, p. 155–164, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.008>>.

PUCKOWSKI, A. et al. Mixture toxicity of flubendazole and fenbendazole to *Daphnia magna*. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220, n. 3, p. 575–582, 2017.

PUERARI, R. C. et al. Synthesis, characterization and toxicological evaluation of Cr₂O₃ nanoparticles using *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 36–43, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.011>>.

PULIT-PROCIAK, J.; BANACH, M. Silver nanoparticles - A material of the future...? **Open Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 76–91, 2016.

PUZYN, T. et al. Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 3, p. 175–178, 2011.

QIU, X. et al. Interaction patterns and toxicities of binary and ternary pesticide mixtures to *Daphnia magna* estimated by an accelerated failure time model. **Science of the Total Environment**, v. 607–608, p. 367–374, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.034>>.

RAI, M. et al. Three *Phoma* spp. synthesised novel silver nanoparticles that possess excellent antimicrobial efficacy. v. 9, n. 1, p. 280–287, 2015.

RAMANATHAN, S. et al. Nanostructured aluminosilicate from fly ash: Potential approach in waste utilization for industrial and medical applications. **Journal of Cleaner Production**, v. 253, p. 119923, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119923>>.

RANI, M.; SHANKER, U.; JASSAL, V. Recent strategies for removal and degradation of persistent & toxic organochlorine pesticides using nanoparticles: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 190, p. 208–222, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.068>>.

RASMUSSEN, J. J. et al. The legacy of pesticide pollution: An overlooked factor in current risk assessments of freshwater systems. **Water Research**, v. 84, p. 25–32, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.07.021>>.

RENO, U. et al. Effects of glyphosate formulations on the population dynamics of two freshwater cladoceran species. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 7, p. 784–793, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10646-017-1891-3>>.

RIBEIRO, F. et al. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. **Science of the Total Environment**, v. 466–467, p. 232–241, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.101>>.

RIBEIRO, F. et al. Bioaccumulation of silver in *Daphnia magna*: Waterborne and dietary exposure to nanoparticles and dissolved silver. **Science of the Total Environment**, v. 574, p. 1633–1639, 2017.

RICHMOND, M. E. Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. **Journal of Environmental Studies and Sciences**, v. 8, n. 4, p. 416–434, 2018.

RODEA-PALOMARES, I. et al. Additivity and Interactions in Ecotoxicity of Pollutant Mixtures: Some Patterns, Conclusions, and Open Questions. **Toxics**, v. 3, n. 4, p. 342–369, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2305-6304/3/4/342/>>.

RÖMER, I. et al. Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 27, p. 4226–4233, 2011.

RONCO, A. E. et al. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10661-016-5467-0>>.

ROSSETTO, A. L. de O. F. et al. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 807–814, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.056>>.

ROSSETTO, A. L. de O. F. Avaliação dos efeitos tóxicos da nanopartícula e micropartícula de óxido de cobre em diferentes organismos aquáticos. p. 166, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/168228>>.

ROY, N. M. et al. Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 46, p. 292–300, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.08.010>>.

ROY, N. M.; CARNEIRO, B.; OCHS, J. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 45–54, 2016.

RUSSELL, L. M.; LIU, C. H.; GRODZINSKI, P. Nanomaterials innovation as an enabler for effective cancer interventions. **Biomaterials**, v. 242, n. February, p. 119926, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119926>>.

SÉGUIN, A. et al. Sub-lethal effects of a glyphosate-based commercial formulation and adjuvants on juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) exposed for 35 days. **Marine Pollution Bulletin**, v. 117, n. 1–2, p. 348–358, 2017.

SANCHEZ, J. A. A. et al. Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. **Chemosphere**, v. 177, p. 200–210, 2017.

SÁ-PEREIRA, P. et al. Protein profiling as early detection biomarkers for TiO₂ nanoparticle toxicity in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 4, p. 430–439, 2018.

SAGATYS, D. S. et al. The complex chemistry of N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate): preparation and characterization of the ammonium, lithium, sodium (4 polymorphs) and silver(I) complexes. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v. 2, n. 19, p. 3404–3410, 2000. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b002748k>>.

SAKKA, Y. et al. Behavior and chronic toxicity of two differently stabilized silver nanoparticles to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 526–535, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.025>>.

SALEEM, H.; ZAIDI, S. J. Nanoparticles in reverse osmosis membranes for desalination: A state of the art review. **Desalination**, v. 475, n. July 2019, p. 114171, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.desal.2019.114171>>.

SARKAR, S.; DAS, R. Synthesis of Silver Nano-cubes and Study of Their Elastic Properties Using X-Ray Diffraction Line Broadening. **Journal of Nondestructive Evaluation**, v. 38, n. 1, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10921-018-0549-2>>.

SARWAR, M. S. et al. Preparation and characterization of PVA/nanocellulose/Ag nanocomposite films for antimicrobial food packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, n. July 2017, p. 453–464, 2018.

SCHAUMBURG, L. G. et al. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 71–78, 2016.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. 453–462, 2014.

SCHLUESENER, J. K.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: Application and novel aspects of toxicology. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 4, p. 569–576, 2013.

SEELAND, A.; OEHLMANN, J.; MÜLLER, R. Aquatic ecotoxicity of the fungicide pyrimethanil: Effect profile under optimal and thermal stress conditions. **Environmental Pollution**, v. 168, p. 161–169, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.04.020>>.

SHARMA, D.; KANCHI, S.; BISETTY, K. Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015.

SHARMA, G. et al. Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: A Review. **Journal of King Saud University - Science**, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364717303518>>.

SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 10, p. 1417–1426, 2016.

SIHTMÄE, M. et al. Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 215–224, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.005>>.

SIHTMÄE, M. et al. Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 215–224, 2013b.

SILVA, V. et al. Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. **Science of the Total Environment**, v. 621, p. 1352–1359, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.093>>.

SINGH, S. et al. **Glyphosate uptake , translocation , resistance emergence in crops , analytical monitoring , toxicity and degradation : a review**. [s.l.] Springer International Publishing, 2020.

SIVULA, L. et al. Toxicity of biomining effluents to *Daphnia magna*: Acute toxicity and transcriptomic biomarkers. **Chemosphere**, v. 210, p. 304–311, 2018.

SOLOMON, K. R. Estimated exposure to glyphosate in humans via environmental, occupational, and dietary pathways: an updated review of the scientific literature. **Pest Management Science**, n. October, 2019.

SOLONESKI, S.; RUIZ DE ARCAUTE, C.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba- and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 17, p. 17811–17821, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-6992-7>>.

SPRAGUE, J. .; RAMSAY, A. B. Lethal Levels of Mixed Copper * Zinc for Juvenile Salmon Solutions. **Journal Fisheries Research Board of Canada**, v. 22, n. 2, p. 425–432, 1965.

SPURGEON, D. J. et al. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 18, p. 3725–3734, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.02.038>>.

SU, H. L. et al. The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5979–5987, 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.030>>.

SUKHANOVA, A. et al. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, 2018.

SULUKAN, E. et al. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 77–85, 2017.

SZÉKÁCS, I. et al. Environmental and Toxicological Impacts of Glyphosate with Its Formulating Adjuvant. **International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering**, v. 8, n. 3, p. 213–218, 2014.

TAN, C.; WANG, W. X. Modification of metal bioaccumulation and toxicity in *Daphnia magna* by titanium dioxide nanoparticles. **Environmental Pollution**, v. 186, p. 36–42, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.015>>.

TANG, Q. et al. Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 114129, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114129>>.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 257–262, 2010a.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–262, 1 abr. 2010b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963409001154>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES. **No Title**. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/>>.

TORTELLA, G. R. et al. Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 390, n. November 2019, 2020.

TSUI, M. T. K.; WANG, W. X.; CHU, L. M. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup®) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Pollution**, v. 138, n. 1, p. 59–68, 2005.

TSUJI, M. et al. Rapid Preparation of Silver Nanorods and Nanowires by a Microwave-Polyol Method in the Presence of Pt Catalyst and 2007. p. 0–9, 2007.

UDDIN, M. N.; DESAI, F.; ASMATULU, E. Engineered nanomaterials in the

environment: bioaccumulation, biomagnification and biotransformation.

Environmental Chemistry Letters, n. 0123456789, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10311-019-00947-0>>.

ULM, L. et al. Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 24, p. 19990–19999, 2015.

VALE, G. et al. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 162–174, 2016.

VAN BRUGGEN, A. H. C. et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of the Total Environment**, v. 616–617, p. 255–268, 2018.

VANNINI, A. et al. Bioaccumulation, physiological and ultrastructural effects of glyphosate in the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. **Chemosphere**, v. 164, p. 233–240, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.058>>.

VAZ, V. P. **Avaliação da Interação Toxicológica de Misturas: Nanoplástico de Poliestireno e Hormônio 17 α -Ethinilestradiol**. 2020. Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.

VÁZQUEZ, D. E. et al. Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. **Environmental Pollution**, v. 261, 2020.

VICENTINI, D. S. et al. Toxicological impact of morphology and surface functionalization of amorphous SiO₂ nanomaterials. **NanoImpact**, v. 5, p. 6–12, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.impact.2016.11.003>>.

VICENTINI, D. S. et al. Toxicological Evaluation and Quantification of Ingested Metal-Core Nanoplastic by *Daphnia magna* Through Fluorescence and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Methods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 10, p. 2101–2110, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/etc.4528>>.

VIEIRA, M.; SOARES, A. M. V. M.; NUNES, B. Biomarker-based assessment of the toxicity of the antifungal clotrimazol to the microcrustacean *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 71, n. February, p. 103210, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103210>>.

VILLA, S. et al. Natural molecule coatings modify the fate of cerium dioxide nanoparticles in water and their ecotoxicity to *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 257, p. 113597, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113597>>.

VÖLKER, C. et al. Comparative Toxicity Assessment of Nanosilver on Three *Daphnia*

Species in Acute, Chronic and Multi-Generation Experiments. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

VRČEK, I. V. et al. Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 6, p. 679–692, 1 jun. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/tox.22081>>.

WALTERS, C. R.; POOL, E. J.; SOMERSET, V. S. Ecotoxicity of silver nanomaterials in the aquatic environment: A review of literature and gaps in nano-toxicological research. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 49, n. 13, p. 1588–1601, 2014.

WANG, L. et al. Synergistic effect of co-exposure to cadmium (II) and 4-n-nonylphenol on growth inhibition and oxidative stress of *Chlorella sorokiniana*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 154, n. February, p. 145–153, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.039>>.

WANG, M. et al. Controlled Synthesis of Silver Micro / Nano Leaves for Oxygen Reduction and CO 2 Reduction. v. 18, n. 8, p. 5763–5769, 2018b.

WANG, P. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Metabolite changes behind faster growth and less reproduction of *Daphnia similis* exposed to low-dose silver nanoparticles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 163, n. April, p. 266–273, 2018c. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.080>>.

WANG, Y. et al. Characterization and toxicology evaluation of chitosan nanoparticles on the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, p. 204–210, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.012>>.

WANG, Y. et al. Joint Toxicity of Arsenic, Copper and Glyphosate on Behavior, Reproduction and Heat Shock Protein Response in *Caenorhabditis elegans*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 98, n. 4, p. 465–471, 2017.

WANG, Y.; TANG, M. Review of in vitro toxicological research of quantum dot and potentially involved mechanisms. **Science of the Total Environment**, v. 625, p. 940–962, 2018.

WEBER, C. I. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Cincinnati, Ohio: EPA, 1991.

WEI, L. et al. Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 595–601, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>>.

WEI, L. et al. Silver nanoparticles : synthesis , properties , and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 595–601, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>>.

WEN, Y. et al. Co-exposure of silver nanoparticles and chiral herbicide imazethapyr to *Arabidopsis thaliana*: Enantioselective effects. **Chemosphere**, v. 145, p. 207–214, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.035>>.

WILKE, C. M. et al. Synergistic Bacterial Stress Results from Exposure to Nano-Ag and Nano-TiO₂ Mixtures under Light in Environmental Media. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 3185–3194, 2018.

WONG, B. S. E.; HU, Q.; BAEG, G. H. Epigenetic modulations in nanoparticle-mediated toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691517303733>>.

WU, J. et al. Foliar versus root exposure of AgNPs to lettuce : Phytotoxicity , antioxidant responses and internal translocation *. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 114117, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114117>>.

WU, L. et al. Physiological effects of the herbicide glyphosate on the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 178, p. 72–79, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.07.010>>.

XIE, F. et al. Assessment of the toxicity of mixtures of copper, 9,10-phenanthrenequinone, and phenanthrene to *Daphnia magna*: evidence for a reactive oxygen mechanism. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 613, 2006.

XIONGHUI, C. A. I.; AIXIA, Z. Preparation of micro-sized silver crystals with different morphologies by a wet-chemical method. **RARE METALS**, v. 29, n. 4, 2010.

XU, J. et al. Glyphosate contamination in grains and foods : An overview. v. 106, n. March, 2019.

XU, X. et al. Effects of Perfluorooctane sulfonate on immobilization, heartbeat, reproductive and biochemical performance of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 168, p. 1613–1618, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.147>>.

XU, Y. et al. Ag nanoparticle-functionalized ZnO micro-flowers for enhanced photodegradation of herbicide derivatives. **Chemical Physics Letters**, v. 679, p. 119–126, 2017b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261417304177>>.

YETISEN, A. K. et al. Nanotechnology in Textiles. 2016.

YIN, C. et al. Changes of the acute and chronic toxicity of three antimicrobial agents to *Daphnia magna* in the presence/absence of micro-polystyrene. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114551, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114551>>.

YOUNUS, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. **International journal of health sciences**, v. 12, n. 3, p. 88–93, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29896077>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5969776>>.

YUSOF, S.; ISMAIL, A.; ALIAS, M. S. Effect of glyphosate-based herbicide on early life stages of Java medaka (*Oryzias javanicus*): A potential tropical test fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 2, p. 494–498, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.022>>.

ZAFAR, N. et al. Journal of Materials Science & Technology Antibacterial Action of Chemically Synthesized and Laser Generated Silver Nanoparticles against Human Pathogenic Bacteria. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 32, n. 8, p. 721–728, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmst.2016.05.009>>.

ZEBRAL, Y. D. et al. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. **Chemosphere**, v. 196, p. 260–269, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.196>>.

ZHANG, C.; HU, Z.; DENG, B. Silver nanoparticles in aquatic environments: Physiochemical behavior and antimicrobial mechanisms. **Water Research**, v. 88, p. 403–427, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.025>>.

ZHANG, L. et al. Mutation Research-Reviews in Mutation Research Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma : A meta-analysis and supporting evidence. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, v. 781, n. September 2018, p. 186–206, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.001>>.

ZHANG, Q. et al. The combined toxicity effect of nanoplastics and glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth *. v. 243, p. 1106–1112, 2018.

ZHANG, W. et al. Fate and toxicity of silver nanoparticles in freshwater from laboratory to realistic environments: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 8, p. 7390–7404, 2019b.

ZHANG, W.; XIAO, B.; FANG, T. Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity. **Chemosphere**, v. 191, n. 7, p. 324–334, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.016>>.

ZHANG, X.-F. et al. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1534, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/17/9/1534>>.

ZHANG, Z. et al. Sunlight-driven reduction of silver ion to silver nanoparticle by organic matter mitigates the acute toxicity of silver to *Daphnia magna*. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 35, p. 62–68, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.03.007>>.

ZHAO, Y. et al. Superhydrophobic and UV-blocking cotton fabrics prepared by layer-by-layer assembly of organic UV absorber intercalated layered double hydroxides.

Applied Surface Science, v. 286, p. 364–370, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.09.092>>.

ZHENG, Y. et al. Transcriptome alterations in female Daphnia (*Daphnia magna*).

Environmental Pollution, v. 261, p. 114208, 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114208>>.

ZHONG, G. et al. Separate and combined effects of glyphosate and copper on growth and antioxidative enzymes in *Salvinia natans* (L.) All. **Science of The Total Environment**, v. 655, p. 1448–1456, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.213>>.

ZHOU, C. F. et al. Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). **Environmental Pollution**, v. 180, p. 71–77, 2013.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.016>>.

ZHOU, T. et al. Effects of LaCoO₃ perovskite nanoparticle on: *Daphnia magna*:

Accumulation, distribution and biomarker responses. **RSC Advances**, v. 9, n. 42, p. 24617–24626, 2019.

ANEXO A – Artigos publicados em coautoria

JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH, PART A
https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1761496



Check for updates

Toxicity of binary mixtures of Al_2O_3 and ZnO nanoparticles toward fibroblast and bronchial epithelium cells

Jéssica Schweitzer Köerich , Diego José Nogueira , Vitor Pereira Vaz , Carmen Simioni ,
Marlon Luiz Neves Da Silva , Luciane Cristina Ouriques , Denice Schulz Vicentini ,
and William Gerson Matias

⁵ *Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; [†]Department Of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

ABSTRACT

The objective of this study was to examine the cytotoxic effects of binary mixtures of Al_2O_3 and ZnO NPs using mouse fibroblast cells (L929) and human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) as biological test systems. The synergistic, additive, or antagonistic behavior of the binary mixture was also investigated. In toxicity experiments, cellular morphology, mitochondrial function (MTT assay), apoptosis, nuclear size and shape, clonogenic assays, and damage based upon oxidative stress parameters were assessed under control and NPs exposure conditions. Although Abbott modeling results provided no clear evidence of the binary mixture of Al_2O_3 and ZnO NPs exhibiting synergistic toxicity, some specific assays such as apoptosis, nuclear size and shape, clonogenic assay, activities of antioxidant enzymatic enzymes catalase, superoxide dismutase, and levels of glutathione resulted in enhanced toxicity for the mixtures with 1 and 1.75 toxic units (TU) toward both cell types. Data demonstrated that co-presence of Al_2O_3 and ZnO NPs in the same environment might lead to more realistic environmental conditions. Our findings indicate cytotoxicity of binary mixtures of Al_2O_3 and ZnO NPs produced greater effects compared to toxicity of either individual compound.

KEYWORDS

Binary toxicity; nanoparticles; aluminum oxide; zinc oxide; *in vitro* cytotoxicity

Introduction

The global market for nanoparticles (NPs) has experienced growth over the past two decades in diverse fields including aerospace, automotive, energy, cosmetics, electronics and optics industries, biosensors, and diagnostics (Alim et al. 2018; Angell et al. 2018; Kaweeteerawat et al. 2017). In addition, these substances are used in electrochemistry to obtain catalysts, coatings, paints, pigments, composites, filtration and purification systems, textiles, and many other products (Alim et al. 2018; Kengar et al. 2019; Wang and Nowack 2018). Due to unique characteristics associated with reduced particle size NPs exhibit a wide range of potential applications in nanomedicine, oral care, and restorative dentistry and as antimicrobials NPs (Callister et al. 2020; Duran et al. 2016; Kaweeteerawat et al. 2017; Kermanizadeh et al. 2016; Su et al. 2018; Zhao and Castranova 2011). Consequently, humans may be

exposed to NPs during production processes or through ingestion of contaminated water and food or exposure to dermal products (Wiesner et al. 2006). Further, Donaldson et al. (2001) reported that ultrathin metal-containing particles present in the air exerted harmful effects on health. While incorporating NPs into products improves our quality of daily life, concerns regarding the consequences for human health and environment are growing (Alaraby et al. 2016; Niska et al. 2018).

Among the most important NPs in production are those comprised of zinc oxide (ZnO) and aluminum oxide (Al_2O_3) (Balasubramanyam et al. 2009; Kermanizadeh et al. 2016). Al_2O_3 NP possesses important properties including good thermal conductivity, reduced size and shape capability, and high strength and stiffness (Kar et al. 2008). Thus, Al_2O_3 NPs are used in the production of abrasives, refractories, ceramics, electrical insulators, catalysts, paper, spark plugs,

CONTACT William Gerson Matias william.g.matias@ufsc.br Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil
 Supplemental data for this article can be accessed on publisher's website.

© 2020 Taylor & Francis

ANEXO B – Artigos publicados em coautoria

Environmental Research 182 (2020) 108987



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envresCrystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward *Daphnia magna* and ecological risk assessmentDiego José Nogueira^a, Vitor Pereira Vaz^a, Oswaldo Savoldi Neto^a, Marlon Luiz Neves da Silva^a, Carmen Simioni^b, Luciane Cristina Ouriques^b, Denice Shulz Vicentini^a, William Gerson Matias^{a,*}^a Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-970, Brazil^b Laboratory of Plant Cell Biology, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88049-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Aluminum oxide
Nanoparticles
Toxicity
Crystalline phase
Risk assessment

ABSTRACT

Aluminum oxide nanoparticles (Al₂O₃ NPs) can be found in different crystalline phases, and with the emergence of nanotechnology there has been a rapid increase in the demand for Al₂O₃ NPs in different engineering areas and for consumer products. However, a careful evaluation of the potential environmental and human health risks is required to assess the implications of the release of Al₂O₃ NPs into the environment. Thus, the objective of this study was to investigate the toxicity of two crystalline phases of Al₂O₃ NPs, alpha (α-Al₂O₃ NPs) and eta (η-Al₂O₃ NPs), toward *Daphnia magna* and evaluate the risk to the aquatic ecology of Al₂O₃ NPs with different crystalline phases, based on a probabilistic approach. Different techniques were used for the characterization of the Al₂O₃ NPs. The toxicity toward *Daphnia magna* was assessed based on multiple toxicological endpoints, and the probabilistic species sensitivity distribution (PSSD) was used to estimate the risk of Al₂O₃ NPs to the aquatic ecology. The results obtained verify the toxic potential of the NPs toward *D. magna* even in sublethal concentrations, with a more pronounced effect being observed for η-Al₂O₃ NPs. The toxicity is associated with an increase in the reactive oxygen species (ROS) content and deregulation of antioxidant enzymatic/non-enzymatic enzymes (CAT, SOD and GSH). In addition, changes in MDA levels were observed, indicating that *D. magna* was under oxidative stress. The most prominent chronic toxic effects were observed in the organisms exposed to η-Al₂O₃ NPs, since the lowest LOEC was 3.12 mg/L for all parameters, while for α-Al₂O₃ NPs the lowest LOEC was 6.25 mg/L for longevity, growth and reproduction. However, the risk assessment results indicate that, based on a probabilistic approach, Al₂O₃ NPs (alpha, gamma, delta, eta and theta) only a very limited risk to organisms in surface waters.

1. Introduction

The global demand for products based on nanotechnology has been increasing continuously due to their differentiated properties, which result mainly from the small particle size and large surface area (Schirmer and Behra, 2013). Among the different forms of materials produced at the nanoscale are nanoparticles (NPs), seen as one of the main facilitators for a whole new generation of industrialized products, such as cosmetics, clothing, electronics, pigments, pharmaceuticals, pesticides and fertilizers (Vilchez et al., 2015). Metal NPs can be obtained through physical (bottom-up) or chemical (top-down) methods; however, most NPs are obtained by chemical methods (Cao and Wang, 2011). In addition, NPs can be produced from polymers (polystyrene)

(Rao and Geckeler, 2011), metals (Ag and Au) (Melo et al., 2012) or metal oxides (Subramanian et al., 2016).

Notable NPs produced from metal oxides are those obtained from aluminum oxide (Al₂O₃), which present different crystalline phases: α (alpha), β (beta), γ (gamma), δ (delta), η (eta), θ (theta), κ (kappa) and χ (chi). Initially, the research and application of Al₂O₃ NPs were focused only on abrasives and resistant coatings in the automotive and metallurgy industry, but in recent decades research has been carried out in several areas seeking new applications for Al₂O₃ NPs, including personal care products, fire retardants, antifungal agents, insecticides and catalysts (Federation of Aluminum Consumers in Europe, 2017). Analysis of the consumer market for Al₂O₃ NPs indicates a growth in production, with 42,000 tonnes Al₂O₃ NPs produced in 2010 and

* Corresponding author. Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Mailbox 476, CEP 88.010-970, Florianópolis, SC, Brazil.

E-mail address: william.g.matias@ufsc.br (W.G. Matias).

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108987>

Received 26 September 2019; Received in revised form 29 November 2019; Accepted 29 November 2019

Available online 02 December 2019

0013-9351/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO C – Artigos publicados em coautoria

Environmental Toxicology and Chemistry—Volume 38, Number 10—pp. 2101–2110, 2019

Received: 3 May 2019 | Revised: 2 June 2019 | Accepted: 19 June 2019

2101

Environmental Chemistry

Toxicological Evaluation and Quantification of Ingested Metal-Core Nanoplastic by *Daphnia magna* Through Fluorescence and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Methods

Denise Schulz Vicentini,^a Diego José Nogueira,^a Sílvia Pedroso Melegari,^b Miriam Arl,^a Jéssica Schweitzer Köerich,^a Luiza Cruz,^a Naiara Mottim Justino,^a Bianca Vicente Oscar,^a Rodrigo Costa Puerari,^a Marlon Luiz Neves da Silva,^a Carmen Simioni,^c Luciane Cristina Ouriques,^c Marcelo Seleme Matias,^d Armando Borges de Castilhos Junior,^d and William Gerson Matias^{a,*}

^aLaboratory of Environmental Toxicology, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^bCenter for Marine Studies, Federal University of Paraná, Pontal do Paraná, Paraná, Brazil

^cLaboratory of Plant Cell Biology, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^dSolid Waste Research Laboratory, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Abstract: There are few studies on nanoplastic that propose quantification of the amount ingested combined with evaluation of the toxic effects on aquatic organisms. We propose 2 methods to quantify the amount of polystyrene nanoplastic (PSNP) ingested by *Daphnia magna*: fluorescence intensity, where a fluorescent monomer (F) is added to the PSNP and quantified through fluorescence light microscopy, and total aluminum quantification, where PSNP is synthesized with Al₂O₃ metal-core nanoparticles and used for quantification of the nanoplastic ingested by the organism *Daphnia magna* using inductively coupled plasma-mass spectrometry. In addition, the PSNP was functionalized with palmitic acid to simulate the environmental conditions leading to biological and chemical transformations. Acute and chronic toxicity tests were performed with fluorescent PSNP (PSNP/F) and palmitic acid-functionalized PSNP/F (PSNP/F-PA). The ingestion quantified was higher by factors of 2.8 and 3.0 for PSNP/F-PA and 1.9 and 1.7 for PSNP/F applying the fluorescence intensity and total Al quantifying methods, respectively, when compared to PSNP. These results are consistent with the data obtained in the toxicity tests, which showed an approximately 3 times increase in the adverse effect of PSNP/F-PA on the mobility and reproduction of the organisms. Thus, the strong inhibition of *D. magna* reproduction caused by PSNP/F-PA in the chronic toxicity tests could be associated with a greater amount of this nanoplastic being ingested by the organisms. *Environ Toxicol Chem* 2019;38:2101–2110. © 2019 SETAC

Keywords: Nanoplastic; Polystyrene; Palmitic acid; Ingestion quantification; *Daphnia magna*; Toxicity

INTRODUCTION

The impact of plastic pollutants is recognized as a threat to ecosystems and to the sustainability of life on earth. Most plastics are composed of synthetic polymers, additives, and other chemicals (polymerization catalysts, initiators, and accelerators) used during the plastic production process (da Costa et al. 2016; Wan et al. 2018). Plastics are widely used in transportation, packaging, construction, and the medical and

health-care industries because of their ease of manufacture, low cost, and unique properties (durability, light weight, transparency, low toxicity, and resistance to water, impact, corrosion, chemicals, and temperature; da Costa et al. 2016; Wan et al. 2018).

However, concerns have been raised about the ecotoxicology not only of the macroform of plastic but also the plastic debris products in the form of micro- and nanometric scale particles (Martins and Guilhermino 2018; Mattsson et al. 2018). There are divergences regarding the definition of particle size applied to classify microplastics and nanoplastics (Alimi et al. 2018; Hartmann et al. 2019). However, a broad classification defines particles <5 mm as microplastics and <1 µm as nanoplastics (da Costa et al. 2016; Rist et al. 2017; Alimi et al. 2018;

This article contains online-only Supplemental Data.

* Address correspondence to william.g.matias@ufsc.br

Published online 24 June 2019 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/etc.4528