UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

SIMONE SAKAGUTE TAVARES

Avaliação da toxicidade da Atrazina livre e Atrazina nanoencapsulada no desenvolvimento e metabolismo mitocondrial em *Drosophila melanogaster*.

Ribeirão Preto
2019

SIMONE SAKAGUTE TAVARES

Avaliação da toxicidade da Atrazina livre e Atrazina nanoencapsulada no desenvolvimento e metabolismo mitocondrial em *Drosophila melanogaster*.

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, ênfase em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Carla Alberici

Ribeirão Preto
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Tavares, Simone Sakagute

Avaliação da toxicidade da Atrazina livre e Atrazina nanoencapsulada no desenvolvimento e metabolismo mitocondrial em *Drosophila melanogaster*. Ribeirão Preto, 2019.

57 p. : il. + 2 CDs

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Carla Alberici, Luciane.

1. Toxicidade. 2. Mitocondria. 3. *Drosophila melanogaster*. 4 Atrazina. 5 Nanocapsula.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Simone Sakagute Tavares

Título: Avaliação da toxicidade da Atrazina livre e Atrazina nanoencapsulada no desenvolvimento e metabolismo mitocondrial em *Drosophila melanogaster*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, ênfase em Bioquímica.

Aprovado em _____ de _____ de 20_____

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição:_____

Julgamento:_____

*Dedico aos meus pais que sempre acreditaram na minha capacidade e
investiram em minha formação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Luciane Carla Alberici, por ter, primeiro, me dado essa oportunidade, segundo, por ter sido sempre compreensiva, gentil e amiga. O aprendizado no mestrado foi além da parte científica e isso, pra mim, com certeza tem um significado imensurável. Muito obrigada, professora.

Agradeço a FAPESP, CNPq e CAPES por todo suporte financeiro.

Para que meu mestrado fosse possível é inevitável não agradecer à todos os mediadores, principalmente professores, que fizeram diferença na minha jornada até aqui. Eles me instigaram, ensinaram, estimularam raciocínio, auxiliaram em meu desenvolvimento. Sem eles o aproveitamento e aprendizado do mestrado não teriam a riqueza que tiveram. Dentre tantos, gostaria de destacar minha orientadora de iniciação científica, Nadia Monesi. Ela me proporcionou uma bagagem importante e essencial para o mestrado.

Agradeço à todos do laboratório que contribuíram durante o mestrado. Destaco alguns: Julia Fernanda com todo seu comprometimento com as nossas moscas, Carlos Dechandt que perdia seus finais de semana para me ajudar nas intermináveis respirações, Carlos Couto que me auxiliou muito em diversos experimentos, e Gustavo Ferrari que além de toda ajuda de bancada e escrita também foi apoio psicológico nas horas do café.

À todos os amigos que me auxiliaram tanto nas minhas lamentações quanto nas construções positivas durante esse processo. Eles foram apoio psicológico. Citar nomes é um tanto perigoso para uma pessoa com pouca memória como a minha. Cada um deles tem um espaço especial.

Não menos importante, tenho muito a agradecer às pessoas que foram importantes no meu desenvolvimento moral e ético. Características óbvias para qualquer área de escolha. Meus pais, Lucia Hitomi Sakagute e Alfredo Luis Ferreira Tavares, que me ensinaram muito sobre valores. Eles me deram a oportunidade de escolher os meus próprios e me apresentaram muitos dos quais acabei escolhendo. Além disso, sempre foram muito preocupados com a minha educação. Quando lembro da minha infância, lembro da minha mãe dizendo que a educação sempre vem em primeiro lugar. E eles trabalharam muito para isso (estudar nesse país não é nada barato). Sempre me incentivaram. Muito obrigada mãe. Muito obrigada pai. Meus avós, José Ribeiro Tavares e Aurea Ferreira Tavares, que sempre me acolheram com muito amor (educação é amor!). Obrigada vô, obrigada vó. Meus irmãos, Rafael Sakagute

Tavares e Natália Sakagute Tavares, meus cúmplices. Cumplicidade é tão importante nesse processo. Amo vocês, meus irmãos. Ao meu marido, Carlos Roberto P. Andrade Filho, que foi e é meu companheiro há muito tempo. Com toda simplicidade possível, conseguiu segurar na minha mão e aguentar comigo mais essa etapa. Muito obrigada, meu amor. E, por último, mas não menos importante, agradeço aos meus “filhos”, uma filha de coração, minha sobrinha Letícia Sakagute Tavares Miranda, e outro filho biológico, João Vitor Sakagute Tavares de Andrade. Eles são meu alicerce. Sem eles, já teria desistido há tempos. Muito obrigada, meus amores.

RESUMO

TAVARES, Simone Sakagute. **Avaliação da toxicidade da Atrazina livre e Atrazina nanoencapsulada no desenvolvimento e metabolismo mitocondrial em *Drosophila melanogaster***. 2019.57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, com ênfase em Bioquímica)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019

Nesta dissertação foi avaliada a toxicidade do herbicida atrazina na forma livre e na forma nanoencapsulada em poli-epsilon-caprolactona. É bem sabido que atrazina livre é um composto que se mostrou tóxico em organismos não alvo estudados. Em alguns países, esse herbicida é proibido devido seu potencial de toxicidade em humanos. Novas estratégias, como nanossistemas, vem sendo desenvolvidas e aplicadas no campo da agroindústria com a finalidade de melhorar a forma de liberação dos agroquímicos e consequente aplicação nas plantações. Porém, poucos estudos foram desenvolvidos no que diz respeito à toxicidade desses compostos nanoencapsulados e as nanocapsulas vazias em organismos não alvo. Os resultados para atrazina livre, 2 ppm, mostraram alterações significativas nos parâmetros de sobrevivência, volume pupal, habilidade de escalada, capacidade fosforilativa e conteúdo mitocondrial, sendo que a nanoencapsulação da atrazina protegeu a *Drosophila* apenas no volume pupal, na habilidade de escalada e na capacidade fosforilativa. atrazina nanoencapsulada, 2 ppm, induziu estresse oxidativo e diminuição da porcentagem de larvas que puparam. A Nanocapsula, 2 ppm, mostrou-se tóxica no volume pupal e conteúdo mitocondrial. Para a concentração de 20 ppm, atrazina livre alterou significativamente a sobrevivência, o volume pupal e o conteúdo mitocondrial, sendo que a sua nanoencapsulação protegeu a *Drosophila* apenas em relação ao conteúdo mitocondrial. Atrazina nanoencapsulada, nessa mesma concentração, foi capaz de alterar apenas a porcentagem de larvas que puparam. Para a nanocapsula, 20 ppm, os parâmetros que sofreram alterações estatísticas foram: sobrevivência, volume pupal e atividade da acetilcolinesterase. Num panorama geral, os resultados mostram que, no modelo de *Drosophila melanogaster*, não há diferença de toxicidade entre atrazina livre e atrazina nanoencapsulada.

Palavras chave: Toxicidade; mitocôndria; *Drosophila melanogaster*, atrazina, nanocapsula,

ABSTRACT

TAVARES, Simone Sakagute. **Assesment of free and nanocapsulated atrazine toxicity on the development and mitochondrial metabolism of *Drosophila melanogaster*.**

2019.57 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019

In the present dissertation the toxicity of the herbicide atrazine was assessed in both free and nanocapsulated in poli-epsilon-caprolactone form. It is well known that atrazine in its free form is toxic for non-target organisms. In some countries this herbicide is forbidden due to its toxic potential in human. New strategies, like nanosystems, are being developed and applied in the agriculture industry in order to improve the liberation form of chemicals and its use on plantations. However, few studies have been conducted in order to analyse the toxic effect of such compounds conjugated with nanocapsules, and also the effects of the nanocapsule vehicle in non-target organisms. The results for free atrazine, 2 ppm, showed significant alterations on the survival parameters, pupae volume, climbing ability, phosphorylating capacity and mitochondrial content, while the nanocapsulated atrazine protected the *Drosophila* regarding the pupae volume, climbing ability and phosphorylating capacity. Nanocapsulated atrazine, 2 ppm, induced oxidative stress and diminished the amount of larvae that pupated. In this concentration, the nanocapsule vehicle was toxic for the pupae volume and mitochondrial content. In the 20 ppm concentration of free atrazine, significant changes on the survival, pupae volume and mitochondrial content were observed, while the nanocapsulated form protected the *Drosophila* only in the mitochondrial content. The nanocapsulated form of atrazine in this concentration changed the percentage of larvae that pupated. Regarding the nanocapsule, 20 ppm, the following parameters demonstrated changes: survival, pupae volume and acetylcholinesterase activity.

In the broad spectrum, the results showed that, in the *Drosophila melanogaster*, there is no difference in the toxic effects of atrazine in its free form when compared to nanocapsulated atrazine.

Keywords: Toxicity; mitochondria, *Drosophila melanogaster*, atrazine, nanocapsule

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 ATRAZINA.....	11
1.2 MODELO <i>DROSOPHILA</i>	14
1.3 NANOCÁPSULA	16
2 OBJETIVO GERAL.....	22
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO.....	50
7 REFERÊNCIAS ¹	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 ATRAZINA

Agroquímicos se tornaram a classe de produto mais extensamente encontrada em sistemas hidrológicos de superfície e subterrâneos, devido ao seu amplo uso na agricultura e em áreas urbanas. Os herbicidas usados na agricultura se tornaram uma indústria global multibilionária e representam 40% do total de pesticidas usados em todo o mundo (GRILLO et al., 2012; MATTOS DE AGUIAR et al., 2016).

Entre muitos herbicidas tóxicos, a atrazina (ATZ) se destaca como um dos mais utilizados mundialmente, e tem se tornado prevalente como contaminante ambiental devido à eficiência, baixo custo e fácil aplicação (GRIBOFF et al., 2014; JABLONOWSKI; SCHÄFFER; BURAUDEL, 2011). Foi introduzido como herbicida em 1957, patenteado na Suíça em 1958 e registrado para uso comercial nos Estados Unidos em 1959. A atrazina é amplamente utilizada para o controle de certas ervas daninhas anuais de folhas largas e gramíneas em diversas plantações, como a de cana-de-açúcar e de milho, destacando-se maior uso nesta última. (VAN DER KRAAK et al., 2014). Um estudo recente mostrou que atrazina foi encontrada em quase todos os locais de amostragem coletadas no Brasil (SPOSITO et al., 2018)

Atrazina (2-chloro-4-ethylamino-6isopropylamino-1,3,5-triazine) é um composto organofosforado da família das triazinas (MARCUS; FIUMERA, 2016), cujas propriedades incluem alto potencial de escoamento, persistência prolongada em solos, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor e moderada adsorção na matéria orgânica do solo (GRILLO et al., 2012). A hidrosolubilidade da atrazina (33 mg / mL a 22 °C), favorece a movimentação da substância química no estado dissolvido das águas do subsolo durante a irrigação ou chuva. Com base nessas propriedades, a ATZ pode ser encontrada em águas superficiais e também subterrâneas. Uma vez que a atrazina esteja dissolvida em água, a hidrólise relativamente pequena e as taxas de fotólise aquosas podem resultar em uma presença prolongada em água estacionária (SOLOMON et al., 1995).

A contaminação de água e alimentos pela atrazina é comum, e a exposição subsequente representa um fator de risco para organismos não-alvo, incluindo seres humanos, de acordo com a espécie, tipo e faixa de concentração de herbicidas, além da forma e tempo de exposição. O uso inadequado de herbicidas pode contaminar o ar, o solo e a água e levar à

extinção de espécies sensíveis (GRILLO et al., 2012; MARCUS; FIUMERA, 2016; SILVA et al., 2011; THORNTON et al., 2010)

Devido ao seu potencial tóxico e por ser regularmente encontrada em solo e água potável, ATZ tornou-se objeto de preocupação contínua. Pesquisas mostram que este composto persiste por décadas no solo. Pesquisadores sugeriram que a ATZ pode ser transportada no ar (VAN DIJK; GUICHERIT, 1999). De fato, a ATZ tem sido encontrada regularmente em águas superficiais e precipita a grandes distâncias de onde é usada, embora em baixas concentrações (VAN DIJK; GUICHERIT, 1999).

Somado à persistência ao solo, há o fato de que grande quantidade desse composto é aplicado anualmente em grandes plantações, representando uma ameaça pontencial a longo prazo para o meio ambiente. Na Europa ATZ já está banida ou estritamente restrito o uso desde 1990. Mais de 18 anos depois de ter sido proibido na Alemanha, a ATZ continua a ser o pesticida mais abundante em amostras de águas subterrâneas (JABLONOWSKI; SCHÄFFER; BURAUDEL, 2011; MARCUS; FIUMERA, 2016). Os limites determinados pelas diretrizes da Agência de Proteção Ambiental dos EUA é 3 mg/L (USEPA, 2014).

Um dos desafios na avaliação de segurança desse composto é que os efeitos biológicos são altamente controversos (MCCOY, 2010). A toxicidade de um composto é avaliada nos organismos aquáticos por serem estas espécies a de primeiro contato e as mais sensíveis à compostos potencialmente tóxicos. Efeitos negativos encontrados nessas espécies são, portanto, forte indicativos de contaminação do meio ambiente. O herbicida ATZ está sob revisão científica e regulatória por mais de uma década devido aos seus efeitos potenciais no crescimento, reprodução e desenvolvimento em vertebrados aquáticos, particularmente anfíbios. A literatura científica contém numerosos estudos ligando respostas à exposição à ATZ, enquanto muitos outros estudos não relatam associação da ATZ com efeitos tóxicos (VAN DER KRAAK et al., 2014).

Embora grande parte dos trabalhos tenham se concentrado em organismos aquáticos, devido à sua maior concentração nesses ambientes, a ATZ também é um potencial tóxico para sistemas terrestres. Experimentos de laboratório mostraram que ratos expostos ao composto apresentaram uma ampla gama de efeitos fisiológicos (LIM et al., 2009). Na caracterização de efeitos com estudos laboratoriais, os parâmetros de medida incluíram respostas tóxicas agudas e crônicas, como sobrevivência, crescimento e reprodução (SOLOMON et al., 1995).

Em *Drosophila*, a ATZ demonstrou alterar a produção de proteínas associadas à produção de energia e ao estresse oxidativo (THORNTON et al., 2010) e afetar a expressão de genes de resposta ao estresse (LE GOFF et al., 2006).

A ATZ não se bioacumula nos organismos e não se biomagnifica através da cadeia alimentar, devido ao seu metabolismo rápido em animais. (VAN DER KRAAK et al., 2014) Essa característica somada a degradação biótica e abiótica amenizam, de certa forma, o fato de serem relativamente persistentes nos ambientes (SOLOMON et al., 1995)

Embora existam divergências nas estimativas da meia-vida, que é influenciada por: temperatura, fonte de luz, tipo de sedimento e concentração, a meia-vida de fotólise aquosa foi relatada como sendo 335 dias sob luz natural e um pH neutro (MCCOY, 2010; SOLOMON et al., 1995).

O principal mecanismo de ação é através da inibição da fotossíntese em fotossistema II. ATZ liga-se irreversivelmente aos sítios de ligação da plastoquinona do complexo fotossistêmico II nas membranas tilacóides dos cloroplastos (Figura 1), inibindo assim o transporte de elétrons (SOLOMON et al., 1995). Como os complexos da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais I e III também possuem sítios de ligação Q semelhantes (Figura 2), hipotetiza-se que a ATZ possa se ligar a esses sítios mitocondriais, resultando em prejuízos na fosforilação oxidativa mitocondrial. (LIM et al., 2009)

Figura 1: Esquema do mecanismo de inibição do fotossistema II, em cloroplastos, do herbicida Atrazina. ATZ se liga em sítios Q da Plastoquinona prejudicando o transporte de elétrons e consequentemente prejudicando a fotossíntese. Como consequência, essa inibição pode levar à morte da planta.

Fonte: (TUCCI et al., 2019)

Figura 2: Figura mostrando a cadeia de transporte de elétrons em mitocôndrias

Fonte: Lehninger

As informações disponíveis na literatura sugerem claramente que levará décadas para a ATZ e os metabólitos acumulados serem degradados no meio ambiente. Dessa forma, estudos contínuos da atrazina e seus metabólitos em águas subterrâneas e superficiais e solos é essencial, não apenas em áreas de aplicação direta, mas também em áreas remotas. Pesquisas adicionais sobre o comportamento ambiental da atrazina e seus produtos de degradação são de ampla relevância (JABLONOWSKI; SCHÄFFER; BURAUDEL, 2011).

1.2 MODELO *DROSOPHILA*

Muitos obstáculos práticos e éticos limitam severamente os experimentos com seres humanos. Muito do que sabemos sobre a biologia subjacente de células e tecidos vem de estudos usando organismos modelo mais simples, como camundongos. A *Drosophila* tem sido usada como um organismo modelo por mais de um século para estudar uma gama de variedade de processos biológicos, incluindo genética e herança, aprendizado, desenvolvimento embrionário, comportamento e envelhecimento. Ficou bem estabelecido que a maioria dos mecanismos biológicos e vias fundamentais que controlam o desenvolvimento e a sobrevivência são conservados através da evolução entre humanos e *Drosophila*, apesar dessas espécies serem visivelmente deferentes (JENNINGS, 2011). Isso foi demonstrado, por

exemplo, para vários comportamentos em *Drosophila*, como ritmos circadianos, aprendizado, memória e sono (GREENSPAN et al., 2004).

Comparações entre os genomas de *Drosophila* e humanos, totalmente seqüenciados, mostraram que aproximadamente 75% dos genes conhecidos de doenças humanas têm uma correspondência reconhecível no genoma das moscas-das-frutas (JENNINGS, 2011). Apesar de ser significativa, ainda não é o suficiente para se fazer uma correlação direta com o ser humano, por isso deve-se ter cautela nas associações. O interessante é que esse modelo seja uma escolha alternativa para triagem de compostos para posterior testes em modelos mamíferos, como camundongos e ratos. Vale destacar que a utilização de *Drosophila* permite um n amostral substancialmente maior do que esses organismos mamíferos superiores, como ratos e camundongos.

A manutenção de *Drosophila* em laboratório é um processo relativamente fácil e barato. Outra vantagem é que há poucas restrições éticas ao uso de *Drosophila*. Cada mosca fêmea pode acumular até 100 ovos por dia por até 20 dias. Leva aproximadamente 10 dias a 25 ° C para um embrião se transformar em uma mosca adulta fértil. Dessa forma, é relativamente fácil gerar um grande número de embriões ou moscas para uma abordagem experimental, caso necessário. Apesar da *Drosophila* ser conhecida popularmente como mosca da fruta por ser freqüentemente encontrada em vinhedos e pomares, ela se alimenta mais de leveduras que crescem na fruta do que a fruta em si. Inicialmente moscas de laboratório foram mantidas em frascos contendo polpa de banana em decomposição, mas atualmente é mais comum mantê-las em frascos contendo alimentos gelatinosos. A geléia precisa ser consistente o suficiente para que as moscas não fiquem presas nela, mas macias o suficiente para as larvas rastejarem e se alimentarem (JENNINGS, 2011). É necessário manter as linhagens de moscas como estoques vivos. Normalmente, os estoques de moscas são mantidos a 18 °C, pois nessa temperatura a vida útil aumenta para até aproximadamente 28 dias (JENNINGS, 2011).

Nos últimos anos, esse modelo vem emergindo como um sistema valioso para uso no processo de descoberta clínica de drogas (Bell, A. J., et al., Fly (2009) 3, 39. 31/ Gia comotto, J. and Segalat, L., (2010) Br J Phar macol 160, 204). Sugere-se que a *Drosophila* seja um excelente modelo para testar os efeitos de novas drogas nas vias bioquímicas conservadas em humanos que controlam muitas atividades celulares, como a divisão celular, diferenciação e movimento. Novas drogas podem ser testadas em *Drosophila* muito mais rápido do que nos modelos de mamíferos. Podem até ser usados para o processo inicial de triagem como

alternativa à cultura de células. O rastreio em um organismo inteiro promove a seleção de compostos que possuem um perfil de segurança aprimorado para testes subsequentes em modelos caros de mamíferos. Além disso, quando se utiliza *Drosophila*, pode se manipular de maneira relativamente fácil a genética para simular uma doença para testar a eficácia de medicamentos ou pesquisas de vias metabólicas conservadas envolvidas no processo. (JENNINGS, 2011). Como exemplo, vários estudos mostram interesse em criar modelos de *Drosophila* para doenças humanas que afetam o sistema nervoso, como a doença de Huntington, a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer. Estes foram criados não apenas com o propósito de tentar entender os mecanismos genéticos e moleculares subjacentes à doença, mas também como uma plataforma para o rastreamento de drogas. Da mesma forma, as respostas da mosca à drogas como etanol, cocaína e nicotina também vem sendo estudadas como possíveis modelos para o vício (GREENSPAN et al., 2004).

Assim, esse organismo modelo têm sido empregado em uma série de estudos, facilitando o desenvolvimento científico dentro da ecologia, comportamento, genética, e biologia molecular (MATTOS DE AGUIAR et al., 2016). Além disso, o uso de insetos como uma poderosa ferramenta toxicológica foi proposto anteriormente (RAND, 2010). Estudos mostram que a *Drosophila* é um excelente modelo para estudar a toxicidade de nanopartículas. (POMPA et al., 2011).

A mosca da fruta assumiu novos papéis surpreendentes como um modelo potencial para a biologia humana e a genética. Todos tentam capitalizar as manipulações genéticas versáteis possíveis na mosca, e então procuram transferibilidade para os seres humanos, seja no nível do mecanismo fundamental, seja no nível da triagem terapêutica preliminar (GREENSPAN et al., 2004).

Embora existam deficiências no modelo de *Drosophila* que o excluem de testes toxicológicos efetivos em certas áreas, a conservação de mecanismos celulares e de desenvolvimento fundamentais entre moscas e o homem é extensiva o suficiente para garantir um papel central para o modelo de *Drosophila* nos testes toxicológicos de hoje (RAND, 2010).

1.3 NANOCÁPSULA

Avanços tecnológicos trouxeram muitos novos e inovadores sistemas de distribuição de medicamentos. Diferentes sistemas carreadores têm sido extensivamente estudados com o

objetivo de controlar a liberação de substâncias ativas e melhorar a eficácia e seletividade das formulações (FLORES et al., 2011). Os sistemas de liberação controlada são projetados para fornecer resposta apropriada no local de ação necessário por períodos de tempo prolongados, melhorando o tratamento (VAUTHIER et al., 2003)

Os sistemas de liberação controlada têm sido amplamente aplicados nas indústrias alimentícia e farmacêutica para a liberação de substâncias ativas, como nutrientes, fármacos e aromas (SILVA et al., 2010).

Determinados sistemas transportadores de drogas apresentam ainda a capacidade de proteção para fármacos, que são instáveis in vivo e que normalmente exigem dosagens em intervalos frequentes (BIZERRA; SILVA, 2016)

Sistemas de liberação nanoestruturados poliméricos representam uma excelente estratégia para incorporação de substâncias ativas e apresentam vantagens que justificam sua aplicação, dentre elas, a boa estabilidade física, química e biológica, e boa reprodutividade, além de serem aplicáveis a uma ampla variedade de substâncias visando melhorar suas propriedades químicas. Em comparação com as cápsulas grandes, as nanocápsulas oferecem as vantagens de um tamanho subcelular, uma área superficial maior por unidade de volume (GRANATA et al., 2018). Um outro fator importante é que o material que compõe as partículas produza metabólitos não-tóxicos e seja degradado facilmente, daí a preocupação para formulações obtidas a partir de polímeros biodegradáveis naturais (SILVA et al., 2010).

Os custos mais elevados que o das formulas farmacêuticas convencionais ocorrem em função dos materiais e processos de microencapsulação utilizados. Por outro lado utiliza uma menor quantidade do princípio ativo, podendo resultar em menor custo.(BIZERRA; SILVA, 2016)

Entre as diferentes abordagens, sistemas nanoestruturados, que são suspensões aquosas coloidais, foram desenvolvidos (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Os principais nanossistemas utilizados para carregamento de fármacos utilizam nanopartículas poliméricas, lipossomas, ciclodextrinas e dendrímeros. As nanopartículas poliméricas apresentam diâmetro inferior a 1 micron, que podem ser denominados nanocápsulas ou nanoesferas, dependendo de sua composição, estrutura e procedimento adotado (BIZERRA; SILVA, 2016; GRILLO et al., 2012; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).). Considerando os métodos de encapsulamento, o fármaco pode ser

aprisionado, disperso, dissolvido ou adsorvido nas nanopartículas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Inúmeros métodos permitem microencapsular um material ativo, sendo estes métodos dependentes do tipo do material, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para sua ação. Para a preparação de nanopartículas encapsuladas, destacam-se os seguintes métodos: método de polimerização em emulsão em fase aquosa contínua, polimerização em emulsão em fase orgânica contínua, polimerização interfacial, disposição interfacial, evaporação de solvente, dessolvatação de macromoléculas e método de diálise (BIZERRA; SILVA, 2016; SINHA et al., 2004).

As nanocápsulas são sistemas do tipo reservatório, sendo essa configuração constituída por um núcleo contendo a substância ativa e revestida por uma membrana polimérica ou parede permeável (Figura 3 a e b). Já as nanoesferas são características dos sistemas matriciais ou monolíticos, nos quais a substância ativa se encontra incorporada ou adsorvida homogeneamente na estrutura de um polímero ou de co-polímeros, de composição química e propriedades variáveis (Figura 3 c e d) (BIZERRA; SILVA, 2016; GRILLO et al., 2012; SILVA et al., 2010; SINHA et al., 2004).

Figura 3 – **Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.** a) ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) ativo adsorvido à parede polimérica nas nanocápsulas; c) ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica

das nanoesferas.

Fonte: Adaptada de: (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003).

A liberação do princípio ativo pode ocorrer por, basicamente, dois mecanismos: difusão ou erosão. A difusão ocorre por meio de gradiente de concentração. No processo de

erosão, o controle químico ocorre por meio da degradação da matriz. A substância bioativa também pode estar ligada covalentemente ao polímero e ser liberada pela ação de enzimas específicas. As taxas de liberação de sistemas poliméricos podem ser controladas pela natureza, composição e estrutura do material. Sistemas tipo reservatórios são adequados para liberação a taxas quase constantes, enquanto que sistemas matriciais são menos dispendiosos (BIZERRA; SILVA, 2016; SINHA et al., 2004).

A taxa de degradação “in vivo” do polímero é um importante fator que influencia na cinética de liberação de fármacos a partir de tais sistemas, além de outros como: a solubilidade e o coeficiente de difusão da droga no polímero e a carga do agente ativo. Para esses sistemas, portanto, é interessante que os polímeros sejam biodegradáveis. Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como o poli- ϵ -caprolactona (PCL), o ácido poli-lático (PLA) e os diferentes tipos de ácido poli-lático glicólico (PLGA) (BIZERRA; SILVA, 2016).

Entre as possíveis nanopartículas, a nanopartícula baseada em poliéster alifático (ϵ -caprolactona) (PCL) encontram aplicações interessantes nos campos médico e alimentar devido à sua eficiência de custo e propriedades físico-químicas favoráveis (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010)

No campo da indústria alimentícia, um exemplo seria Óleos essenciais como importantes antimicrobianos. A nanopartícula é uma boa estratégia para melhorar obstáculos como mascarar o sabor, diminuir a volatilidade, aumentar a solubilidade e a estabilidade física e reduzir a interação com os ingredientes alimentares, melhorando a bioacessibilidade e a biodisponibilidade (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). Nanossistemas são candidatos atraentes para uso no setor de alimentos. Eles podem representar uma alternativa natural aos conservantes químicos na prevenção da disseminação de doenças transmitidas por alimentos e na garantia de maior segurança em alimentos processados (GRANATA et al., 2018).

No campo da indústria farmacêutica, as nanopartículas apresentaram grande capacidade em facilitar o contato de substâncias ativas com o estrato córneo, levando à alta permeação das substâncias transportadas através da pele viável (Jenning et al. al., 2000b; Maia et al., 2000). Elas são capazes de modificar a atividade dos fármacos, atrasar e controlar a liberação, além de aumentar a adesividade ou seu tempo de permanência na pele (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007)

Em comparação com polímeros hidrofílicos, o PCL é capaz de controlar a liberação de ingredientes ativos por mais tempo (GRANATA et al., 2018). A propriedade biodegradável deste polímero sintético foi identificada pela primeira vez em 1973. A degradação do PCL em comparação com o ácido poliglicólico e outros polímeros é lenta, tornando-o adequado para entrega a longo prazo, que se estende ao longo de um período de mais de um ano (DJURDJIC et al., 2015; SINHA et al., 2004). Com relação à degradabilidade, os produtos de degradação são naturalmente metabólitos bioabsorvíveis (MANGEON et al., 2017). Como resultado, vários copolímeros em bloco anfifílicos funcionais com PCL como segmento hidrofóbicos ganharam atenção substancial (DJURDJIC et al., 2015). Isto levou à sua aplicação na preparação de diferentes sistemas de distribuição na forma de microesferas, nanoesferas e implantes. Muitos estudos avaliaram diferentes categorias de drogas encapsuladas em PCL para a liberação direcionada e controlada, como em ingredientes ativos para plantas (A.-L. LE ROY BOEHM, R. ZERROUK, H.; ZERROUK; FESSI, 2000), fármacos de administração ocular (MARCHAL-HEUSSLER et al., 1993), digitoxina (M. GUZMÁN, M. R. ABERTURAS, M. RODR et al., 2000), antineoplásicos (DJURDJIC et al., 2015), esteróides contraceptivos, implantes subdérmicos, dispositivos intra-uterinos (Progestasert) (BIZERRA; SILVA, 2016), e insulina no tratamento de diabetes (SHENOY et al., 2003).

A PCL é solúvel em solventes orgânicos como clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano à temperatura ambiente. Tem uma baixa solubilidade em acetona, 2-butanona, acetato de etilo, dimetilformamida e acetonitrilo e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter dietílico. (GRILLO et al., 2012; SINHA et al., 2004) O PCL é insolúvel em água, resistente a óleo e possui degradação lenta em meio aquoso (GRANATA et al., 2018).

Considerando o amplo uso global de herbicidas, a aplicação de sistemas de liberação controlada é de interesse tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico (GRILLO et al., 2012). Os herbicidas atualmente empregados também apresentam diversos problemas relacionados à estabilidade química, dentre eles: solubilidade, biodisponibilidade, fotodegração e sorção no solo. Além destes aspectos, esses agentes químicos e sua transferência para os sistemas aquáticos através de processos de lixiviação podem contaminar águas superficiais e/ou subterrâneas, influenciar na qualidade da água e trazer consequências adversas ao homem, ambiente e biota. Desta forma, é importante o desenvolvimento de sistemas que permitam a alteração de propriedades físico-químicas e liberação

controlada/adequada de herbicidas sem prejuízos significativos ao ambiente.(SILVA et al., 2010)

Após as inúmeras vantagens apresentadas acima, pode-se sugerir que o sistema de transporte de nanocapsulas tem potencial para ser um método alternativo para a liberação sustentada de herbicidas, como a ATZ. Como vantagens, a literatura sugere que impactos ambientais diminuiriam, pois a quantidade de produtos químicos necessários para o controle de ervas daninhas nas plantações também reduziriam (GRILLO et al., 2012). Apesar disso, a literatura descreve apenas alguns trabalhos relacionados à nanossistemas de liberação controlado de compostos com aplicações em agronegócio (SILVA et al., 2010), como o trabalho recente de pesquisadores que nanoencapsularam ATZ em PLGA (SCHNOOR et al., 2018),

Vale destacar que avaliar a toxicidade desses bioativos nanoencapsulados é necessária, pois, apesar de diminuir a concentração do composto no meio ambiente, esses nanomateriais podem potencializar os riscos à saúde. Há uma falta de avaliação aprofundada do potencial de toxicidade dos nanomateriais e novas tecnologias na literatura. Evidência experimental de alta toxicidade in vivo de material em nanoescala, que é amplamente considerado seguro e biocompatível em sua forma a granel, tem várias implicações e abre questões importantes. Uma maior conscientização desses potenciais problemas, juntamente com uma estratégia séria para a avaliação de risco e segurança são necessários nos próximos anos, já que vários nanomateriais estão sendo cada vez mais explorados. O conceito bem estabelecido de biocompatibilidade está experimentando algumas limitações, devido ao grande advento de materiais em nanoescala e um novo campo, conhecido como nanotoxicologia, vem emergindo nos últimos tempos (POMPA et al., 2011).

2 OBJETIVO GERAL

A agroindústria vem se utilizando da nanotecnologia como uma possível abordagem eficiente para a diminuição dos riscos ambientais de herbicidas tóxicos como Atrazina. Os nanossistemas permitem uma liberação lenta e prolongada desses herbicidas, além de proteger o ativo da degradação, e, dessa forma, a quantidade e frequência de aplicação desse agroquímico nas grandes plantações diminui significativamente. Diminuindo a quantidade de resíduos desses produtos, diminui-se então os impactos ambientais.

Levando em consideração esse novo sistema de liberação e que estudos recentes mostram que os nanossistemas vem apresentando alta toxicidade, o questionamento feito neste estudo foi sobre como seriam os efeitos desse novo composto (Atrazina nanoencapsulada) em organismos não alvo. Para responder a esse questionamento, testou-se então a toxicidade de atrazina em diferentes formas: livre ou nanoencapsulada, e em várias concentrações, no modelo de *Drosophila melanogaster*, por meio de observações comportamentais, de sobrevivência, parâmetros mitocondriais, de estresse oxidativo e atividade neurotransmissora.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se a ATZ livre e/ou ATZ nanoencapsulada alteram:

- o tempo de sobrevivência;
- a porcentagem de larvas que pupam e eclodem, e o volume no estagio pré-pupa;
- a habilidade de escalada;
- o conteúdo e metabolismo mitocondriais em tórax;
- o estado redox intracelular relacionado ao metabolismo mitocondrial;
- o sistema colinérgico por meio da medida da atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo e ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

As linhagens de *Drosophila melanogaster* eram mantidas à temperatura constante de 25°C, temperatura na qual o ciclo de vida dura aproximadamente 12 dias. Eram mantidas em frascos de 500 ml, 250 mL ou de 50 ml contendo cerca de 50 ml, 25 ou 10 ml, respectivamente, de meio padrão de *Drosophila* (Agar 0,5%; dextrose 5,15%; sacarose 2,62%; farinha de milho 8,5%; extrato de levedura de cerveja 1,55%; nipagin 1,15%, ácido propiônico 0,5%; ácido fosfórico 0,02%). Garrafas e frascos eram tampados com espuma ou algodão para evitar que as moscas escapassem e também para manter longe de ácaros e outros animais. Para manipulação das moscas, as mesmas foram anestesiadas com segurança em dióxido de carbono. As moscas eram colocadas em almofadas porosas conectadas a uma fonte de dióxido de carbono e movidas com um pincel de ponta fina, enquanto vistas com um estereomicroscópio.

O ciclo de vida de *Drosophila* compreende a fase embrionária, três estádios larvais e as fases pré-pupal e adulta. Larvas de primeiro estágio (L1), à 25°C, eclodem cerca de 24 horas após a postura e logo começam a se alimentar na superfície do meio, onde permanecem até sofrerem a primeira muda que ocorre cerca de 24 horas após a eclosão. As larvas de segundo estágio (L2) migram para o interior do meio, onde ocorre a segunda muda cerca de 24 horas mais tarde. O terceiro estágio larval (L3) dura cerca de 48 horas, sendo que as larvas permanecem imersas no meio até um pouco antes do final desse estágio (cerca de 110 horas após a postura). No final do terceiro estágio as larvas param de se alimentar, saem do meio e começam a movimentar-se pela parede do frasco de cultura por aproximadamente 12 horas. Ao final deste período ocorre a formação do pupário, que é caracterizado pela observação dos espiráculos anteriores evertidos, imobilidade dos animais e ausência de coloração na cutícula. Este estágio é denominado pré-pupa 0 hora. A ausência de coloração permanece por 30 minutos no máximo e este estágio é utilizado como parâmetro para estagiamento em idades posteriores. O estágio pré-pupa compreende 12 horas. Ao término deste período, inicia-se o estágio denominado de pupa que tem duração de 4 a 4,5 dias e que culmina com o surgimento dos imagos (ASHBURNER, 1989)

Cruzamentos

Todos os cruzamentos deste trabalho foram realizados a 25°C em tubos de cultura individuais (“vials”) ou garrafas de 250 mL, sendo o número de fêmeas virgens duas vezes maior do que o número de machos. Os parentais eram retirados do tubo dois dias após o cruzamento.

Sistema UAS-GAL4 em *D. melanogaster*

O sistema UAS/GAL4 permite a expressão dirigida de sequências gênicas em *D. melanogaster*. O gene GAL4 codifica uma proteína identificada em *S. cerevisiae* como um regulador da expressão de genes induzidos por galactose (LAUGHON et al., 1984). GAL4 regula a transcrição dos genes *gal10* e *gal1* pela ligação direta a quatro sítios relacionados localizados entre estes loci (GINIGER; VARNUM; PTASHNE, 1985) que definem sequências de ativação a montante (Upstream Activating Sequence, ou elemento UAS) essenciais para a ativação transcricional dos genes regulados por GAL4. Fisher e colaboradores (FISCHER et al., 1988) demonstraram que a expressão de GAL4 foi capaz de estimular a transcrição de um gene repórter sob o controle da região promotora UAS em *Drosophila*. Brand e Perrimon (BRAND; PERRIMON, 1993) descreveram o desenvolvimento do sistema UAS/GAL4 para a expressão dirigida in vivo em *Drosophila melanogaster*. Como a expressão do gene de interesse depende da presença de GAL4, a ausência de GAL4 na progênie mantém a progênie num estado silenciado de sua expressão. Para ativar sua expressão a linhagem contendo o gene de interesse controlado por sequências UAS são cruzadas com moscas que expressam GAL4 em um determinado padrão, as quais são denominadas “drivers”, pois dirigem a expressão de GAL4. A progênie resultante, que contém ambos os elementos, expressa o gene de interesse num padrão transcricional que reflete o padrão de expressão do respectivo “driver” de GAL4 (BRAND; PERRIMON, 1993) (Figura 4).

Figura 4: **Figura esquemática do Sistema UAS-GAL4.** Expressão dirigida do gene repórter.

Fonte: (KELLY; ELCHERT; KAHL, 2017)

Sobrevivência, Contagem de pupas e moscas e Volume pupal.

O início do processo de obtenção de L1 consistia na transferência de grandes quantidades de adultos, linhagem Canton S, para frascos de 500 ml contendo meio padrão de *Drosophila*, durante 24 horas, na presença de levedo para permitir o pleno desenvolvimento dos ovários das fêmeas. Passadas as 24 horas, os mesmos adultos eram transferidos para um novo frasco de mesmo volume repetindo as condições do meio e incubação. Ao final desta etapa, os adultos eram transferidos para um béquer de plástico contendo pequenos furos, tampado por uma placa de petri contendo meio de ovoposição (Agar 2,2%; sacarose 8,7%; suco de uva 45,5%; NaOH 50 mM; ácido propiônico 4,88%; ácido fosfórico 4,88%). Nestas condições as fêmeas depositam seus ovos no meio e é possível realizar coletas com tempos determinados. Os adultos eram mantidos por 16h (Over night) e no dia seguinte eram transferidos para um novo béquer de plástico e nova placa de petri contendo meio de ovoposição. Após 4 horas, trocava-se a placa de petri com meio de ovoposição e mantinha-se por mais 4 horas. Após esse tempo as moscas eram descartadas e essa ultima placa era mantida à 25°C para posterior coleta das larvas (L1), baseado na morfologia. Apesar de ter havido 4 horas de diferença entre as larvas, essa variação esteve presente em todos os grupos testados. Foram coletadas de 35 a 45 larvas L1 para cada vial contendo os seguintes tratamentos: meio padrão de *Drosophila*, meio padrão (comida) + Atrazina (concentração

final de 2 ppm), meio padrão + Atrazina (20 ppm), meio padrão + Nanocapsula (2 ppm), meio padrão + Nanocapsula (20 ppm), meio padrão + Atrazina nanoencapsulada (2 ppm), meio padrão + Atrazina nanoencapsulada (20 ppm). Os passos seguintes se diferiam conforme a seguir:

Para o ensaio de sobrevivência: Após eclosão das moscas, as mesmas eram transferidas para meio novo, sendo que os meios eram trocados a cada 3 dias. A contagem das moscas mortas era realizada todos os dias durante 25 dias. Foram feitos 7 blocos de experimentos independentes e simultaneamente para cada tratamento.

Para os ensaios de desenvolvimento: 1) Contagem pupas e moscas. As larvas que pupavam e, posteriormente, as moscas que eclodiam eram contadas. 2) Volume pupal: *Drosophila* no estágio de prepupa eram sexadas e com auxílio de uma câmera acoplada ao estereomicroscópio, utilizando papel milimetrado como referência, eram coletadas as imagens. Os volumes foram calculados utilizando-se o programa ImageJ.

Ensaio de resposta geotática

Os experimentos geotáticos foram realizados num aparato contracorrente (fig. 5). Esse aparato é uma adaptação do método proposto inicialmente por Benzer (1967) (BENZER, 1967).

O aparato consiste em 5 conjuntos de tubos (10 cm cada) verticalmente opostos. Os tubos eram mantidos em uma estrutura de madeira que permitia que os mesmos se movessem horizontalmente pelo aparato. Inicialmente foram feitos testes com linhagem Canton S para padronizar o tempo em que as moscas escalassem cada conjunto de tubos. O tempo determinado foi então 15 segundos. Cerca de 15 moscas, com 15 dias, separadas por sexo, por tratamento, foram usadas por rodada. As moscas eram condicionadas no primeiro tubo e se esperava 1 minuto para que elas se ambientassem. Iniciava-se então a rodada. O aparato era batido levemente sobre uma superfície macia para que as moscas fossem para a parte inferior do tubo. Após 15 segundos, o conjunto de tubos superiores eram deslizados para a direita e novamente se batia o aparato para que as moscas que tivessem escalado até o tubo superior fossem para a parte inferior do tubo adjacente. Então se repetia esse processo até que os 5 sets se completassem. Para cada rodada, uma pontuação era dada para quantificar a habilidade de escalada das moscas. Para o cálculo, primeiro era multiplicado a quantidade de moscas dos

tubos 1, 2, 3, 4, 5 por 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0, respectivamente. Depois esses valores eram somados obtendo-se assim a pontuação (BENZER, 1967; BOYLE et al., 2010).

Figura 5: Foto do aparato adaptado para ensaio de geotaxia negativa.

Fonte: foto tirada pela própria autora.

Consumo de oxigênio mitocondrial

Para avaliação do consumo de oxigênio mitocondrial foi utilizado o sistema de respirometria de alta resolução Oxygraph-2k (O2k, Oroboros Instruments). Os procedimentos experimentais foram precedidos da lavagem das 2 câmaras do sistema pelo menos 3 vezes com álcool 70% e com água deionizada e pelo menos 1 vez com álcool 98%, e da estabilização do sinal à temperatura de 25°C após adição de meio MIR05 (EGTA 0.5 mM, MgCl₂ 3 mM, K-lactobionato 60 mM, taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, sacarose 110 mM, albumina bovina sérica livre de ácidos gráxos 1 g/L, pH 7,1). Foram adicionados 5 tórax de adultos, com 15 dias, separados por sexo, por tratamento, em cada câmara contendo 2 mL de tampão MIR05. Após o fechamento das câmaras, foram fornecidos substratos oxidáveis para suprir elétrons à cadeia respiratória: 12 µL de Piruvato 1,3 M, 4 µL de Malato 1 M, 10 µL Glutamato 1,8 M. A respiração máxima acoplada (Estado P) foi estimulada pela adição de 10 µL adenosina difosfato (ADP 43,75 mM), substrato da ATP-sintase, e posteriormente inibida com 1 µL de Oligomicina 5 mM (Estado L, *leak*). Após estabilização, a respiração máxima desacoplada (Estado E) foi estimulada pela adição de 2 µL de CCCP 0,5 mM (carbonilcianeto-m-clorofenilidrazina), um ácido fraco de caráter

hidrofóbico que quando protonado consegue atravessar a membrana interna mitocondrial carregando prótons para a matriz. Por fim, foram adicionados 2 µL de antimicina A (500 µg/mL), inibidor do complexo III, e dessa forma mensurava-se o consumo de oxigênio não relacionado à respiração mitocondrial (Estado Rox) (GNAIGER; PESTA; GNAIGER, 2012).

Após termino da respiração, o conteúdo de cada câmara era coletado em tubos contendo 500 µl de KOH 5M para posterior quantificação proteica.

Quantificação proteica

A quantificação proteica foi feita através do método de Bradford que permite determinar a concentração de proteínas totais das amostras (BRADFORD, 1976).

A curva padrão foi feita com albumina de soro bovino (do inglês, BSA) nas concentrações: 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 e 0,05 mg/ml. Como branco, foram utilizados os tampões em que cada amostra analisada estava solubilizada (tampão MIR05 para as amostras analisadas no Oxígrafo, tampão de homogeneização para as que foram utilizadas na análise da Citrato sintase, tampão fosfato para as utilizadas na análise da Acetilcolinesterase). Em todas as amostras foram adicionados 200µl do reagente de Bradford (BioRad). A leitura foi feita utilizando um comprimento de onda de 595nm, em leitora de microplaca, modelo Epoch2, marca BioTek.

Atividade da Citrato Sintase

Para análise da atividade da citrato sintase, foram utilizados um total de 5 tórax de adultos, com 15 dias, separados por sexo, por tratamento. O tecido foi solubilizado em tampão de homogeneização (Tris 20mM, KCl 40mM e EGTA 2mM, pH7,4), e macerados com auxílio de pistilo para microtubos. Um volume de 5 µL do homogenato foi incubado à 37°C em 200µL de tampão (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, Triton X-100 0,1% e DTNB -ácido 5,5-ditiobis-[2-nitrobenzóico]-100µM) e 2,5µL acetil-CoA 10mM (preparado na hora do uso). A reação foi iniciada adicionando-se 2,5µL de ácido oxaloacético 10mM. A absorbância foi monitorada em espectrofotômetro a 412 nm por 5 minutos (SPINAZZI et al., 2012). A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford, e a quantidade de enzima foi determinada pela fórmula abaixo.

$$\text{Unidades } (\mu\text{mols/min/mL}) = ((\Delta A_{412}/\text{min}) \times V(\text{mL}) \times \text{dil}) / (\epsilon^{\text{mM}} \times L \times V_{\text{enz}})$$

Onde:

$\Delta A_{412}/min = (\text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial}) / (\text{tempo final} - \text{tempo inicial})$;
 $V(mL)$ = Volume do teste: em placa de 96 poços (0,2 mL); dil = Volume do teste (mL)/
 volume da amostra (mL); ϵ^{mM} = Coeficiente de extinção molar (13,6 mM⁻¹. cm⁻¹); L = Caminho
 ótico: em placa de 96 poços (0,552cm); V_{enz} = volume da amostra.

Atividade da Acetilcolinesterase

Para análise da atividade enzimática da Acetilcolinesterase, foram coletadas 30 cabeças de adultos, com 15 dias, separadas por sexo, por tratamento. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Para homogeneização foi utilizado Sonicador, nas configurações: 15 segundos, 30%. As amostras homogeneizadas eram então centrifugadas (9000g, 20 minutos, 4°C). O sobrenadante foi coletado em novo tubo. A atividade enzimática foi medida utilizando 36µL desse sobrenadante e 180µL de mix (15 mL tampão Fosfato 0,1M, pH 7,4; 500 µL DTNB 10mM; 100 µL de Acetilcolina 0,075M). (MAHARAJAN et al., 2018; MATTOS DE AGUIAR et al., 2016) A absorbância foi monitorada em espectrofotômetro a 412 nm por 10 minutos (ELLMAN et al., 1961). O cálculo foi feito a partir da fórmula a seguir:

$$R = 5,74 \cdot 10^{-14} (\Delta A / Co)$$

onde:

R= taxa, em mols de substratos hidrolizados por minuto por grama de tecido;

ΔA = variação da absorbância por minuto;

Co= concentração (proteína) original do tecido.

Análise de Estresse Oxidativo

Para análise do estresse oxidativo foi utilizado método baseado em Laker (LAKER et al., 2014). Machos da linhagem transgênica *UAS-Mitotimer* foram cruzadas com fêmeas virgens da linhagem *Mef-Gal4*. Cerca de 40 larvas de primeiro estágio (L1) foram transferidas para vials contendo meio com os tratamentos. Após a eclosão das moscas, trocava-se os meios a cada 3 dias. Adultos com 15 dias foram então separados por sexo, por tratamento. As moscas foram dissecadas em tampão PBS 1x, sendo que foi feito um corte sagital no tórax. O tecido foi fixado com paraformaldeído 4% por 30 min. Após fixação, foram realizadas três

lavagens com PBS 1x, sendo cada lavagem de 5 minutos. Os tórax foram transferidos para lamina e cobertos com Fluoromount™.

O gene repórter pMitoTimer, adicionado a sequência de direcionamento mitocondrial do gene da subunidade VIII do citocromo c oxidase ao terminal N da região codificadora de Timer, sob o controle de promotor constitutivo, codifica um mutante DsRed (DsRed1-E5) que possui fluorescência verde quando recém-sintetizado, e desloca o espectro fluorescente irreversivelmente para vermelho quando ocorre desidrogenação no resíduo Tyr-67. Como o espectro de fluorescência muda com a oxidação, MitoTimer, acionado por um promotor constitutivamente ativo, apresenta um histórico cumulativo redox das mitocôndrias marcadas (LAKER et al., 2014). As imagens foram adquiridas por microscopia confocal e os sinais de fluorescência, assim como as razões vermelho:verde foram analisados no programa Matlab.

Materiais biológicos

Neste trabalho foram utilizados embriões, larvas, pupas e adultos de *Drosophila melanogaster*, mantidas em cultura no Laboratório de Análise de Metabolismo Mitocondrial e Exercício da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto–USP. As linhagens transgênicas, linhagens balanceadoras *, “drivers” de GAL4 e as linhagens selvagens utilizadas nesse trabalho encontram-se relacionadas abaixo.

- Canton Special (CS): linhagem selvagem. Obtida do Laboratório do Dr. Spyros Artavanis-Tsakonas, Yale University (E.U.A.).
- Mef2-GAL4(y1 w*; P{GAL4-Mef2.R}3): linhagem em que a expressão de GAL4 é modulada pelo promotor do gene Mef2 (Myoblast enhance factor 2), o qual é expresso somente em células miogênicas. Disponível no “Bloomington *Drosophila* Stock Center #BL23790”.
- UAS-mitotimer (w[1118]; P{w[+mC]=UAS-MitoTimer}3): linhagem em que há expressão sob o controle de UAS de uma variante DsRed direcionada para mitocôndria que muda de verde para vermelha, irreversivelmente, quando oxidada e pode ser usada para avaliar o envelhecimento mitocondrial e o estresse oxidativo.

Nanocápsulas

As nanocápsulas de PCL foram preparadas por Grillo (2012) de acordo com a deposição interfacial do método de polímero pré-formado, descrito pela primeira vez por Fessi (1989) (FESSI et al., 1989), que envolve a mistura de uma fase orgânica em uma fase aquosa.

Análise dos dados

Foram utilizados o software Graph Pad Prism (versão 5.0) e programa R (versão 3.4.1) para a análise dos dados desse estudo. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

Para o teste de sobrevivência os dados foram apresentados como distribuições de sobrevivência de Kaplan-Meier. A análise estatística utilizou teste de Log-Rank (Mantel-Cox)

A análise estatística para os ensaios de desenvolvimento, habilidade de escalada, repirometria e atividades de citrato sintase e Acetilcolinesterase foi realizada utilizando ANOVA de uma via. Os valores das variáveis quantitativas são expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

Para a análise dos dados de estresse oxidativo, utilizou-se o programa cell profile (versão 3.1.5) para processamento das imagens e o programa Matlab para cálculo dos sinais de fluorescência e razões vermelho:Verde. A análise estatística utilizou ANOVA de uma via.

4 RESULTADOS

Sobrevivência e Desenvolvimento

O primeiro teste de toxicidade realizado foi o de sobrevivência. Foram escolhidos três tratamentos: Atrazina livre (ATZ), Nanocápsula de PCL (NC) e Atrazina nanoencapsulada (ATZ-NC). Para cada tratamento, utilizamos duas concentrações: 2 ppm e 20 ppm (9,3 e 93 μ M, respectivamente). As concentrações utilizadas se basearam em trabalhos sobre toxicidade em modelo de *Drosophila* utilizando ATZ livre (FIGUEIRA; AGUIAR; ROSA, 2017; MARCUS; FIUMERA, 2016; MATTOS DE AGUIAR et al., 2016).

Figura 6- **Curva de sobrevivência de *Drosophila melanogaster***. Curva de sobrevivência nas concentrações de 2 ppm (A) e 20 ppm (B), para os tratamentos: Controle (CTRL), Atrazina (ATZ), Nanocapsula de PCL (NC) e Atrazina Nanoencapsulada (ATZ-NC). (*) representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Como pode ser visto na figura 6, todos os tratamentos diminuíram a sobrevivência de *Drosophila* no tempo determinado. Para a concentração de 2 ppm foram encontradas diferenças estatísticas no grupo ATZ e ATZ-NC. Já para a concentração de 20 ppm, todos os grupos apresentaram diferenças em relação ao controle.

O próximo passo foi verificar qual o efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento de *Drosophila*. Para isso, foram medidas a porcentagem de larvas que pupavam e a porcentagem de pupas que eclodiam (Figuras 7A e 7B). Além disso, também foram medidos os volumes das pré pupas (Figura 7C e D)

Figura 7- Efeitos da exposição à ATZ, NC e ATZ-NC durante o desenvolvimento embrionário e larval de *Drosophila melanogaster*. Porcentagem de larvas que puparam (A), porcentagem de moscas que eclodiram (B), volume pupal -concentração de 2 ppm (C), concentração de 20 ppm (D). Dados apresentados em média $\pm$ Erro padrão da média. (*) representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Pode-se observar na figura 7A que ATZ-NC diminuiu significativamente a porcentagem de larvas que puparam, sendo que na concentração de 20 ppm observa-se um efeito ainda maior. Quanto à eclosão das moscas, não houveram diferenças estatísticas em nenhuma concentração (Figura 7B). Em relação ao volume pupal, observa-se aumento no tratamento na concentração de 2 ppm para ATZ (mais evidente) e NC, tanto em macho quanto

em fêmea. Nos tratamentos com a concentração de 20 ppm, observamos diferenças em ATZ e ATZ-NC em machos, e em todos os grupos para as fêmeas (Figura 7D).

Teste comportamental

Testes comportamentais são muito utilizados em testes de toxicidade. O teste de escalada é bem validado para o modelo de *Drosophila* (BENZER, 1967) e é um teste relativamente simples de ser executado. Conforme podemos observar na figura 8, para os machos houve redução significativa na habilidade de escalada somente no grupo tratado com ATZ na concentração de 2 ppm. Para as fêmeas, apesar de não haver diferença estatística, o gráfico mostra que há uma tendência, em todos os tratamentos, de prejuízos na geotaxia desses animais.

Figura 8- **Resposta geotática de *Drosophila melanogaster***. Geotaxia de *Drosophila*, separada por sexo, nas concentrações de 2 ppm (A) e 20 ppm (B), para os tratamentos: Controle (CTRL), Atrazina (ATZ), Nanocapsula de PCL (NC) e Atrazina Nanoencapsulada (ATZ-NC). Dados apresentados em média $\pm$ Erro padrão da média. (*) representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Análise da função mitocondrial.

Na literatura diversos trabalhos mostram que ATZ leva a prejuízos na função mitocondrial e ao estresse oxidativo (GRIBOFF et al., 2014; HASE et al., 2008; LIM et al., 2009; MA et al., 2018; SAGARKAR et al., 2016a; ZHANG et al., 2018). Dessa forma, testamos os efeitos na respiração mitocondrial de tórax para os diferentes tratamentos propostos nesse estudo (Figura 9). Após medirmos as taxas respiratórias nos estados de fosforilação oxidativa (P), não-fosforilante (L) e máxima capacidade de transporte de elétrons (E), calculamos as razões de controle de fluxo, as quais indicam vazamento de H^+ como fração da máxima capacidade de transporte de elétrons (L/E), capacidade de fosforilação em relação ao vazamento de H^+ (P/L) e fosforilação como fração da máxima capacidade de transporte de elétrons (P/E). Para esses dados, observa-se que houve uma melhora na razão de P/E para ATZ 2 ppm, o que demonstra uma maior capacidade fosforilativa. Os demais grupos não apresentaram diferença significativa.

Figura 9- **Análise de respirometria em tórax de *Drosophila melanogaster***. Dados apresentados em razões, A) L/E (Voligo/Vccp), B) P/E (Vadp/Vcccp), C) P/L (Vadp/Voligo), nas concentrações de 2 ppm e 20 ppm, para os tratamentos: Controle (CTRL), Atrazina (ATZ), Nanocapsula de PCL (NC) e Atrazina Nanoencapsulada (ATZ-NC). Dados apresentados em média $\pm$ Erro padrão da média. (*)representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Para avaliar o conteúdo mitocondrial, foi medida a atividade da enzima Citrato Sintase em tórax de *Drosophila* de todos os grupos. O resultado (Figura 10) mostra que somente o grupo ATZ na concentração de 20 ppm em fêmeas apresentou aumento significativo em relação ao conteúdo mitocondrial.

Figura 10- **Atividade da Citrato Sintase de *Drosophila melanogaster***. Atividade da citrato sintase em tórax de *Drosophila*, separada por sexo, nas concentrações de 2 ppm (A) e 20 ppm (B), para os tratamentos: Controle (CTRL), Atrazina (ATZ), Nanocapsula de PCL (NC) e Atrazina Nanoencapsulada (ATZ-NC). Dados apresentados em média $\pm$ Erro padrão da média. (*)representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Para uma segunda avaliação do conteúdo mitocondrial e análise do estresse oxidativo, utilizamos o gene repórter MitoTimer. MitoTimer pode ser usado para relatar o conteúdo mitocondrial, estrutura, estresse e dano in vivo sob condições fisiológicas e patológicas (LAKER et al., 2014). A baixa intensidade de fluorescência verde observada nos machos que ingeriram 2 ppm de ATZ ou ATZ-NC, e fêmeas ATZ-NC, indica reduzido conteúdo mitocondrial (Figura 11), enquanto em fêmeas que ingeriram NC foi observado aumento desse conteúdo. O cálculo da razão entre Mito Timer oxidado (vermelho) pelo total (verde) mostra que somente ATZ-NC, 2 ppm, fêmea, apresentou aumento significativo do estresse oxidativo (Figura 12).

Figura 11- **Expressão do gene repórter mitotimer em mitocôndrias.** A análise por microscopia confocal da expressão do gene repórter MitoTimer foi realizada em tórax de *Drosophila*. O gráfico mostra a intensidade de fluorescência verde nos grupos: Controle (CTRL), Atrazina (ATZ), Nanocapsula de PCL (NC) e Atrazina Nanoencapsulada (ATZ-NC), separados por sexo. (*)representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Figura 12- **Análise do Estresse oxidativo em *Drosophila melanogaster*.**- Quantificação da razão vermelho:verde de intensidade de fluorescência em machos (A) e fêmeas (B). Imagens de microscopia confocal de tórax de *Drosophila*- C) expressão do gene mito timer-fluorescência verde; D) oxidação da proteína codificada por Mitotimer, fluorescência vermelha. A análise por microscopia confocal da expressão do gene repórter MitoTimer foi realizada em tórax de *Drosophila*. As moscas são expostas aos compostos desde L1 até adulto 15 dias. Grupos: Controle (CTRL), Atrazina (ATZ), Nanocapsula de PCL (NC) e Atrazina Nanoencapsulada (ATZ-NC), 2 ppm. (*)representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Acetilcolinesterase

Verificamos também se a diminuição da habilidade de escalada da mosca estaria relacionada à atividade da Acetilcolinesterase, visto que um trabalho recente sugeriu a inibição desta enzima como mecanismo de toxicidade para ATZ (MLADENOVIC et al.,

2018a). Nossos dados mostram que a atividade de AChE foi aumentada para NC, em ambas as concentrações, 2 e 20 ppm, e não houve diferença nos demais tratamentos (Figura 12)

Figura 13- **Atividade da enzima Acetilcolinesterase**. Atividade da Acetilcolinesterase em cabeça de *Drosophila*, nas concentrações de 2 ppm (A) e 20 ppm (B), para os tratamentos: Controle (CTRL), Atrazina (ATZ), Nanocapsula de PCL (NC) e Atrazina Nanoencapsulada (ATZ-NC). (*) $p < 0,05$.

Resumo dos resultados.

A tabela a seguir mostra um resumo dos resultados.

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos no presente estudo. Osinal (-) significa que não houve diferença estatística em relação ao controle e as flechas indicam que houve diferença significativa com aumento (flecha voltada para cima) ou diminuição do efeito (flecha voltada para baixo).

	ATRAZINA						NANOCAPSULA						ATRAZINA NANOENCAPSULADA					
	2 ppm		20 ppm		Macho + Femea		2 ppm		20 ppm		Macho + Femea		2 ppm		20 ppm		Macho + Femea	
	♂	♀	♂	♀	2 ppm	20 ppm	♂	♀	♂	♀	2 ppm	20 ppm	♂	♀	♂	♀	2 ppm	20 ppm
Sobrevivência					↓	↓					-	↓					↓	↓
% Pupa					-	-					-	-					↓	↓
Volume Pupal	↑	↑	↑	↑			↑	↑	-	↑			-	-	↑	↑		
% Ecloração					-	-					-	-					-	-
Escalada	↓	-	-	-			-	-	-	-			-	-	-	-		
Ache	-	-	-	-			-	-	-	↑			-	-	-	-		
Estresse oxidativo	-	-					-	-					-	↑				
Citrato Sintase	-	-	-	↑			-	-	-	-			-	-	-	-		
P/L			-	-			-	-					-	-				
P/E			↑	-			-	-					-	-				
L/E			-	-			-	-					-	-				

5 DISCUSSÃO

Sobrevivência e Desenvolvimento

Análises de sobrevivência e desenvolvimento são importantes para avaliação da toxicidade de compostos como os agroquímicos (MARCUS; FIUMERA, 2016; MIRANDE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014; PAKYARI; ENKEGAARD, 2013; RUSSELL; SCHULTZ, 2010). A exposição a pesticidas leva à redução da sobrevida em diversas espécies de insetos (MIRANDE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014; PAKYARI; ENKEGAARD, 2013; POMPA et al., 2011). No presente estudo, moscas mantidas em alimentos com ATZ, livre ou nanoencapsulada, tiveram vida útil reduzida em ambas as concentrações testadas (2 e 20 ppm). Esse resultado é consistente com um prévio estudo que mostrou o potencial tóxico de ATZ, nas mesmas concentrações utilizadas neste estudo, com efeito na diminuição de sobrevida de *Drosophila* (MARCUS; FIUMERA, 2016).

Diversos ativos, destacando os agroquímicos, que são nanoencapsulados ou nanoparticulados podem aumentar seu potencial de toxicidade com diminuição da sobrevivência de organismos não alvo (AHAMED et al., 2010; HAN et al., 2014; SABAT et al., 2016). Existem poucos estudos que foram realizados com a PCL nanocapsula e herbicidas. Apesar de alguns estudos apontarem que herbicidas nanoencapsulados em PCL apresentaram menor toxicidade que na forma livre (GRILLO et al., 2012), os resultados de sobrevivência do presente estudo, para os grupos tratados com ATZ-NC, em ambas as concentrações testadas (2 e 20 ppm), mostraram que houve também prejuízos na sobrevida da mesma forma que ATZ livre.

O tamanho da partícula é uma característica que pode influenciar nos efeitos tóxicos dos compostos, sendo que aqueles que são biocompatíveis na sua forma a granel apresentaram efeitos negativos quando formulados como nanossistemas (HAN et al., 2014). Na mesma lógica, a idéia foi avaliar se, apesar do polímero PCL ser biodegradável e biocompatível, o tamanho da partícula poderia ter efeito negativo para o organismo modelo testado. No presente estudo, a NC apresentou uma redução na longevidade somente na concentração de 20 ppm. Esse resultado mostra que nanocápsulas de PCL podem ser tóxicas e que essa toxicidade é dependente da concentração.

Uma explicação para a redução observada na sobrevida de moscas adultas pode ser devido à hipótese sugerida de que a ATZ interage com o sistema de transporte de elétrons

mitocondrial. Sabe-se que ATZ se liga irreversivelmente aos sítios de ligação da plastoquinona do complexo fotossistêmico II nas membranas tilacóides dos cloroplastos, inibindo assim o transporte de elétrons (SOLOMON et al., 1995). Como resultado, há um prejuízo na fotossíntese e consequentemente morte da planta. Sugere-se que na mitocôndria ATZ se ligue aos complexos I e III por possuírem sítios de ligação Q semelhantes, resultando na supressão da fosforilação oxidativa (OXPHOS). Dessa forma podendo interferir na função mitocondrial (LIM et al., 2009).

Esta hipótese é corroborada por trabalhos que mostraram que a exposição à ATZ provoca alterações nos níveis de proteínas para genes conhecidos por responderem ao estresse mitocondrial em *D. melanogaster* (THORNTON et al., 2010) e trabalhos que mostram que a atrazina está associada com prejuízos mitocondriais em ratos (LIM et al., 2009). Essa disfunção mitocondrial pode levar à superprodução de espécies reativas de oxigênio que podem gerar um quadro de estresse oxidativo. Diversos estudos mostram que o estresse oxidativo tem se mostrado um componente significativo do envelhecimento e expectativa de vida (BECKMAN; AMES, 1998; FINKEL; HOLBROOK, 2000; HARSHMAN; HABERER, 2000).

Assim como a sobrevivência, o desenvolvimento também é afetado quando organismos são expostos à compostos tóxicos, como os pesticidas e herbicidas (FIGUEIRA; AGUIAR; ROSA, 2017; MARCUS; FIUMERA, 2016; MIRANDE et al., 2010). Sabe-se que a exposição à ATZ é tóxica para embriões e larvas de *Drosophila*, podendo afetar o desenvolvimento e o metabolismo energético (FIGUEIRA; AGUIAR; ROSA, 2017). Em relação ao desenvolvimento, aqui foi avaliada a toxicidade da ATZ, livre e nanoencapsulada, em larvas e pupas. Para a porcentagem de larvas que puparam, apesar da literatura mostrar que ATZ diminui essa taxa em *Drosophila* (FIGUEIRA; AGUIAR; ROSA, 2017; MARCUS; FIUMERA, 2016), nossos resultados mostraram que, embora o grupo exposto à ATZ livre tenha apresentado uma diminuição nessa porcentagem, somente o grupo ATZ-NC apresentou essa mesma alteração com diferença estatística. Para o estágio larval então, pode-se observar nos resultados obtidos que ATZ livre é menos tóxica do que ATZ-NC. Reduções na viabilidade larval da mosca da fruta observadas são prováveis conseqüências do estresse oxidativo induzido pela exposição à atrazina (FIGUEIRA; AGUIAR; ROSA, 2017). Nesse sentido, para este ensaio, pode-se dizer que a ATZ nanoencapsulada teve a toxicidade potencializada, quando comparada a ATZ livre.

Em relação à porcentagem de eclosão das pupas, não observamos diferenças nos tratamentos propostos, apesar de estudos mostrarem que a taxa de eclosão diminui em *Drosophila* expostas à ATZ em ambas as concentrações 10 e 100 μ M (FIGUEIRA; AGUIAR; ROSA, 2017; MARCUS; FIUMERA, 2016). Já o volume pupal apresentou bastante alteração, sendo que somente para a ATZ-NC na concentração de 2 ppm não foi encontrada diferença significativa. Para os demais grupos, incluindo os tratados com 20 ppm, o volume pupal aumentou significativamente, demonstrando que somente quando em baixa concentração (2 ppm) a toxicidade da ATZ é menor quando nanoencapsulada. Na concentração de 20 ppm, estudo prévio já havia mostrado que há um aumento no tamanho corporal em moscas expostas à ATZ (MARCUS; FIUMERA, 2016).

Existem várias hipóteses de mecanismos possíveis para os efeitos da atrazina no desenvolvimento. Uma delas é que a ATZ pode interagir com a ecdisona e, portanto, com a via de sinalização da insulina, causando assim a aceleração no tempo de desenvolvimento e a alteração no tamanho corporal. Isso poderia ser mediado por uma alteração na ingestão de alimentos, uma vez que as larvas de *Drosophila* podem alterar sua ingestão de alimentos em resposta a uma variedade de toxinas em seu ambiente (MUELLER; BARTER, 2015). Fiumera (2016) sugere que mudanças no tamanho corporal podem estar relacionadas à ação da ATZ na ruptura endócrina (EDC), consequentemente afetando alguns componentes do sistema endócrino, como a via de sinalização da insulina. Outra hipótese é de que durante o desenvolvimento embrionário e larval as moscas apresentem aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e desequilíbrio redox, podendo acarretar em prejuízos no desenvolvimento quando expostas à ATZ (FIGUEIRA; AGUIAR; ROSA, 2017; MARCUS; FIUMERA, 2016).

Comportamental

O efeito comportamental de diferentes formas de exposição crônica de ATZ em *Drosophila melanogaster* foi avaliado. O teste de escalada permite observar o quanto o composto altera a capacidade locomotora desses animais. Alguns estudos mostram que avaliar as características comportamentais são importantes marcadores para avaliação de toxicidade de compostos (BARDULLAS; GIORDANO; RODRÍGUEZ, 2011; BELLONI et al., 2011; FIGUEIRA et al., 2017; HORZMANN et al., 2018).

É reconhecido que os poluentes ambientais podem causar alterações comportamentais nas moscas. A exposição crônica ao bisfenol A, por exemplo, induz um aumento no número de episódios de higiene em *D. melanogaster* (KAUR et al., 2015). Além disso, moscas expostas a nanopartículas de titânio durante o desenvolvimento demonstraram uma diminuição nos ensaios de escalada (SABAT et al., 2016).

Sabe-se que ATZ altera a locomoção de diferentes organismos. A administração da ATZ resulta em comprometimento da coordenação motora e maior atividade locomotora espontânea, além de levar a alterações comportamentais e neuroquímicas, em exposição crônica, em ratos (BARDULLAS; GIORDANO; RODRÍGUEZ, 2011; MA et al., 2018; WALTERS et al., 2015). A exposição a ATZ, mesmo em uma dosagem muito baixa, afetou claramente a expressão de alguns perfis comportamentais críticos em camundongos jovens e adultos (BELLONI et al., 2011). Organismos aquáticos, como zebra fish, também alteraram a locomoção quando expostos à ATZ (HORZMANN et al., 2018). Em *Drosophila* mostrou-se que ATZ, nas mesmas concentrações utilizada neste estudo, prejudica a habilidade de escalada em ensaios de geotaxia negativa (FIGUEIRA et al., 2017).

Como pode ser visto, os resultados deste estudo são consistentes com Figueira (2017) para o grupo tratado com ATZ 2 ppm, macho. Este grupo apresentou uma perda da habilidade de escalada significativa. Os demais grupos também diminuíram a habilidade de escalada, porém esse efeito não foi significativo.

A dose pode ser particularmente relevante porque, em alguns casos, a menor exposição à ATZ (1 µg/Kg/dia) se apresentou mais efetiva do que a exposição mais alta (100 µg/Kg/dia) na modificação de resposta comportamental (BELLONI et al., 2007).

Sendo assim, para o teste comportamental escolhido neste estudo, habilidade de escalada, ATZ-NC mostrou-se menos tóxica do que ATZ livre.

Há evidências na literatura que suportam a hipótese de que modulações comportamentais podem estar relacionadas a alterações no sistema neurológico causadas por compostos tóxicos (FIGUEIRA et al., 2017).

Atividade da Acetilcolinesterase

Considerando que a exposição à atrazina e situações associadas ao estresse oxidativo provavelmente levam a distúrbios neurológicos, a atividade da AChE pode ser útil para monitorar os efeitos associados aos compostos neurotóxicos (BOILY et al., 2013).

É bem sabido que agroquímicos exercem efeitos neurotóxicos em organismos não alvo (COBAN; FILIPOV, 2007; FIGUEIRA et al., 2017; LI et al., 2018; SONG et al., 2015).

Abordagens baseadas em ligante e baseadas em estrutura in silico confirmaram os modos de ligação e a farmacologia de alguns compostos e concluíram que os pesticidas e herbicidas, em sua maioria, inclusive a ATZ, exercem toxicidade inibindo reversivelmente a enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima atua na fenda sináptica e nas junções neuromusculares, causando a quebra da acetilcolina (ACh), um neurotransmissor essencial no sistema nervoso central (SNC) de insetos, roedores e humanos, em seus compostos base, o acetato e a colina. Os inibidores competitivos da AChE interrompem a fisiologia dos gânglios autonômicos, bem como das junções efetoras neuromusculares, parassimpáticas e simpáticas, controladas pela ACh (MLADENović et al., 2018b). A inibição da AChE resulta no acúmulo de neurotransmissores e subsequente interferência com a via colinérgica, causando hiperestimulação muscular e distúrbios no movimento. Consequentemente, processos comportamentais, como fuga, podem ser afetados (MATTOS DE AGUIAR et al., 2016). Diversos estudos associam alterações de comportamento com disfunções neurológicas (BELLONI et al., 2011; LI et al., 2018; MIRANDE et al., 2010). Dessa maneira, a alteração observada nos ensaios de geotaxia negativa poderiam ser explicados por possíveis alterações no sistema colinérgico.

Os resultados do presente estudo mostraram que a atividade da AChE aumentou no grupo NC, fêmea, nas concentrações de 2 e 20 ppm. O resultado foi inesperado, já que, pelas evidências da literatura, esperar-se-ia observar alterações nos grupos tratados com ATZ. Além disso, a alteração observada na habilidade de escalada para ATZ 2 ppm não foi correspondido então pelos ensaios de AChE.

Uma possível explicação para os resultados observados está no fato de que a inibição da AChE pela ATZ é dependente da dose, sendo que doses maiores que 0,5 µg/mL de ATZ não exercem nenhum efeito sobre a inibição de AChE (MLADENović et al., 2018b).

Aumento na atividade da AChE pode levar a diminuição da concentração da ACh interferindo na via colinérgica no sentido de diminuir a estimulação muscular. Para o grupo NC 20 ppm, fêmea, que teve a atividade de AChE aumentada, esperaríamos ver uma resposta

diminuída na habilidade de escalada. Porém não foi esse resultado observado. Todavia, é importante ressaltar que não só a via colinérgica é responsável por modular respostas musculares e, dessa forma, outras vias podem estar interferindo para explicar os resultados observados no teste de escalada. Sabe-se, por exemplo, que ATZ está associada ao aumento de produção de EROS em moscas adultas (FIGUEIRA et al., 2017), podendo, dessa forma, levar ao estresse oxidativo em tecidos musculares resultando em alterações na locomoção desses animais.

Interessantemente, se observarmos os resultados do teste de sobrevivência, veremos que o grupo NC diminuiu a sobrevida justamente nessa concentração de 20 ppm. Esse resultado fornece pistas de possíveis associações de toxicidade da NC. Porém mais estudos devem ser realizados para se chegar a alguma conclusão consistente.

Mitocôndria

A outra hipótese para explicar a alteração comportamental observada está no fato de que a exposição à ATZ pode causar efeitos deletérios sobre a função mitocondrial em diferentes células de diferentes organismos (LIM et al., 2009; MA et al., 2018; SAGARKAR et al., 2016a; ZHANG et al., 2018). Consequentemente, vários parâmetros bioquímicos e fisiológicos podem ser afetados após a exposição à atrazina (FIGUEIRA et al., 2017). Estudos mostram que genes que estão relacionados com a disfunção mitocondrial foram alterados quando linhagens de células musculares foram expostas à ATZ, mostrando uma associação positiva entre esse herbicida e disfunção mitocondrial (SAGARKAR et al., 2016a). Outro estudo apoia o papel da atrazina em afetar o transporte de elétrons na mitocôndria de *Drosophila melanogaster* (THORNTON et al., 2010). Em músculos de ratos, a administração crônica de ATZ (30 e 300 µg/Kg/dia) prejudica tanto a função respiratória mitocondrial quanto sua morfologia (LIM et al., 2009).

Nos resultados apresentados em relação à respiração mitocondrial, observa-se diferença significativa apenas em ATZ 2 ppm na razão P/E, o que demonstra uma maior capacidade fosforilativa. No entanto, observamos uma redução (estatisticamente não significativa) sob alta concentração (20 ppm), o que vai ao encontro de trabalhos anteriores que mostram que ATZ afeta negativamente a fosforilação oxidativa (OXPHOS) em músculo esquelético de ratos (LIM et al., 2009) e em células de músculo e fígado de ratos na concentração de 10-450 µM (SAGARKAR et al., 2016b). A atividade da citrato sintase

mostrou que fêmeas expostas à ATZ 20 ppm apresentaram aumento significativo do conteúdo mitocondrial, o qual pode estar relacionado à uma resposta à diminuição da capacidade fosforilativa (razão P/E) vista na respiração mitocondrial, apesar desta diminuição não ser uma diferença estatística. Embora não haja diferenças estatísticas no ensaio da atividade da cintrato sintase para os tratamentos na concentração de 2 ppm, os dados da intensidade de fluorescência de GFP indicam que houve uma redução do conteúdo mitocondrial em ATZ-NC 2 ppm tanto para machos como para fêmeas, diminuição para machos ATZ 2 ppm e aumento desse conteúdo em fêmeas NC 2 ppm.

Estresse oxidativo

Distúrbios no meio ambiente, como aplicação frequente de herbicidas e pesticidas, comumente afetam os organismos ao induzir uma situação fisiológica que é chamada de estresse oxidativo (MONSERRAT et al., 2007). Esta situação é definida como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema de defesa antioxidante, em favor do primeiro, culminando na geração de dano oxidativo. A geração de estresse oxidativo representa um mecanismo de toxicidade que tem sido sugerido para herbicidas à base de glifosato em organismos não-alvo (MATTOS DE AGUIAR et al., 2016). Além disso, o herbicida atrazina também induz estresse oxidativo ao interferir com diferentes desfechos e produção de EROs em diversas espécies (ABARIKWU et al., 2010; FIGUEIRA et al., 2017; LIU et al., 2006; POMPA et al., 2011; SPOSITO et al., 2018; THORNTON et al., 2010).

Somado ao aumento de EROs, vários estudos mostram a diminuição da defesa antioxidante quando organismos são expostos a ATZ (FIGUEIRA; AGUIAR; ROSA, 2017; GRIBOFF et al., 2014; SEMREN; ŽUNEC; PIZENT, 2018; YANG et al., 2013). Essa combinação de aumento de ROS e diminuição da defesa antioxidante, causado pela ATZ, pode levar ao quadro de estresse oxidativo.

Apesar de vários estudos mostrarem associação positiva entre ATZ e estresse oxidativo, somente o grupo ATZ-NC 2 ppm, fêmea, apresentou um aumento significativo. Para esse resultado, podemos concluir que ATZ-NC se apresentou mais tóxica do que ATZ livre na concentração de 2 ppm.

Talvez se a concentração de ATZ fosse maior, veríamos diferenças no estresse oxidativo. Lim 2009 diz que os resultados dele puderam ser vistos, diferente dos outros trabalhos, porque ele usou uma dose bem mais alta (LIM et al., 2009).

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que diante os efeitos tóxicos estatisticamente significativos promovidos por ATZ livre, na concentração de 2 ppm, sobre parâmetros de sobrevivência (ambos), habilidade de escalada (macho), volume pupal (ambos), capacidade fosforilativa (ambos) e conteúdo mitocondrial (macho), a nanoencapsulação da ATZ protegeu a *Drosophila melanogaster* apenas da diminuição na habilidade de escalada, do aumento volume pupal e aumento na capacidade fosforilativa. De forma independente, 2 ppm ATZ nanoencapsulada induziu o estresse oxidativo mitocondrial (fêmeas) e diminuiu a porcentagem de larvas que puparam. A nanocapsula de PCL, na concentração de 2 ppm, demonstrou efeito tóxico aumentando o volume pupal (ambos) e o conteúdo mitocondrial (fêmeas).

Já à 20 ppm, dos efeitos tóxicos estatisticamente significativos promovidos pela ATZ livre sobre parâmetros de sobrevivência (ambos), volume pupal (ambos), e conteúdo mitocondrial (fêmeas), a nanoencapsulação da ATZ protegeu a *Drosophila melanogaster* apenas do conteúdo mitocondrial. De forma independente, ATZ nanoencapsulada, 20 ppm, diminuiu a porcentagem de larvas que puparam. À 20 ppm, a nanocápsula de PCL demonstrou efeito tóxico, diminuindo a sobrevivência (ambos), aumentando o volume pupal (fêmeas) e aumentando a atividade da AChE (fêmeas).

Analisando o conjunto de dados, pode-se concluir que não houve diferença de toxicidade entre a ATZ livre e ATZ nanoencapsulada, nos ensaios realizados, quando utiliza-se como modelo animal *Drosophila melanogaster*.

7 REFERÊNCIAS¹

A.-L. LE ROY BOEHM, R. ZERROUK, H., A. L.; ZERROUK, R.; FESSI, H. Poly epsilon-caprolactone nanoparticles containing a poorly soluble pesticide: formulation and stability study. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n. 2, p. 195–205, 29 jan. 2000.

ABARIKWU, S. O. et al. Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, atrazine. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 3, p. 874–882, 2010.

AHAMED, M. et al. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 242, n. 3, p. 263–269, 1 fev. 2010.

ASHBURNER, M. **Drosophila. A laboratory handbook**. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

BARDULLAS, U.; GIORDANO, M.; RODRÍGUEZ, V. M. Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. **Neurotoxicology and Teratology**, 2011.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The Free Radical Theory of Aging Matures. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 2, p. 547–581, abr. 1998.

BELLONI, V. et al. Effects of low doses of atrazine on the neurobehavioural development of mice. **Ethology Ecology and Evolution**, v. 19, n. 4, p. 309–322, 2007.

BELLONI, V. et al. Early exposure to low doses of atrazine affects behavior in juvenile and adult CD1 mice. **Toxicology**, v. 279, n. 1–3, p. 19–26, 11 jan. 2011.

BENZER, S. **BEHAVIORAL MUTANTS OF DROSOPHILA ISOLATED BY COUNTERCURRENT DISTRIBUTION**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC335755/pdf/pnas00679-0316.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

BIZERRA, A.; SILVA, V. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1–12, 7 jul. 2016.

BOILY, M. et al. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental**

Science and Pollution Research, v. 20, n. 8, p. 5603–5614, 27 ago. 2013.

BOYLE, P. A. et al. Effect of a Purpose in Life on Risk of Incident Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment in Community-Dwelling Older Persons. **Arch Gen Psychiatry**, v. 67, n. 3, p. 304–310, 2010.

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.

BRAND, H.; PERRIMON, N. **Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/content/develop/118/2/401.full.pdf>>. Acesso em: 16 fev. 2019.

COBAN, A.; FILIPOV, N. M. Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. **Journal of Neurochemistry**, 2007.

DJURDJIC, B. et al. Synthesis and self-assembly of amphiphilic poly(acrylicacid)–poly(ε-caprolactone)–poly(acrylicacid) block copolymer as novel carrier for 7-ethyl-10-hydroxy camptothecin. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n. 6, p. 867–881, 10 jan. 2015.

ELLMAN, G. L. et al. **A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY** **Biochemical Pharmacology**. [s.l.] Pergamon Press Ltd, 1961. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/0006295261901459/1-s2.0-0006295261901459-main.pdf?_tid=305643ea-23bb-4982-8d2a-900f936cb0f2&acdnat=1547815360_dc8f96a0e84dcd70c14eee7bd23008f9>. Acesso em: 18 jan. 2019.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1 out. 1989.

FIGUEIRA, F. H. et al. Exposure to atrazine alters behaviour and disrupts the dopaminergic system in *Drosophila melanogaster*. v. 202, p. 94–102, nov. 2017.

FIGUEIRA, F. H.; AGUIAR, L. M. DE; ROSA, C. E. DA. Embryo-larval exposure to atrazine reduces viability and alters oxidative stress parameters in *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 191, p. 78–85, jan. 2017.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 9 nov. 2000.

FISCHER, J. A. et al. GAL4 activates transcription in Drosophila. **Nature**, v. 332, n. 6167, p. 853–856, 28 abr. 1988.

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968–972, 2011.

GINIGER, E.; VARNUM, S. M.; PTASHNE, M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. **Cell**, v. 40, n. 4, p. 767–74, abr. 1985.

GNAIGER, E.; PESTA, D.; GNAIGER, E. **Mitochondrial Bioenergetics**. [s.l: s.n.]. v. 810

GRANATA, G. et al. Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. **Food Chemistry**, v. 269, p. 286–292, 15 dez. 2018.

GREENSPAN, R. J. et al. ‘ Am not I a fly like thee ?’ From genes in fruit flies to behavior in humans. v. 13, n. 2, p. 267–273, 2004.

GRIBOFF, J. et al. Oxidative stress response induced by atrazine in Palaemonetes argentinus: The protective effect of vitamin E. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2014.

GRILLO, R. et al. Poly(ϵ -caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231–232, p. 1–9, 15 set. 2012.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug target insights**, v. 2, p. 147–57, 2007.

HAN, X. et al. Monitoring the developmental impact of copper and silver nanoparticle exposure in Drosophila and their microbiomes. **Science of The Total Environment**, v. 487, p. 822–829, 15 jul. 2014.

HARSHMAN, L. G.; HABERER, B. A. Oxidative stress resistance: a robust correlated response to selection in extended longevity lines of Drosophila melanogaster? **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 55, n. 9, p.

B415-7, set. 2000.

HASE, Y. et al. Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2008.

HORZMANN, K. A. et al. Embryonic atrazine exposure elicits proteomic, behavioral, and brain abnormalities with developmental time specific gene expression signatures. **Journal of proteomics**, v. 186, p. 71–82, 30 ago. 2018.

JABLONOWSKI, N. D.; SCHÄFFER, A.; BURAUDEL, P. Still present after all these years: Persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 2, p. 328–331, 2011.

JENNINGS, B. H. Drosophila-a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, v. 14, n. 5, p. 190–195, 2011.

KAUR, K. et al. Effect of bisphenol A on Drosophila melanogaster behavior - A new model for the studies on neurodevelopmental disorders. **Behavioural Brain Research**, 2015.

KELLY, S. M.; ELCHERT, A.; KAHL, M. Dissection and Immunofluorescent Staining of Mushroom Body and Photoreceptor Neurons in Adult Drosophila melanogaster Brains. **Journal of Visualized Experiments**, n. 129, 6 nov. 2017.

LAKER, R. C. et al. A novel MitoTimer reporter gene for mitochondrial content, structure, stress, and damage in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 17, p. 12005–15, 25 abr. 2014.

LAUGHON, A. et al. Identification of two proteins encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. **Molecular and cellular biology**, v. 4, n. 2, p. 268–75, fev. 1984.

LE GOFF, G. et al. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 8, p. 674–82, ago. 2006.

LI, J. et al. Developmental Exposure to Atrazine Impairs Spatial Memory and Downregulates the Hippocampal D1 Dopamine Receptor and cAMP-Dependent Signaling Pathway in Rats. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 8, p. 2241, 31 jul. 2018.

LIM, S. et al. Chronic exposure to the herbicide, atrazine, causes mitochondrial dysfunction and insulin resistance. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 2009.

LIU, X.-M. et al. Cytotoxic effects and apoptosis induction of atrazine in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line. **Environmental Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 80–89, fev. 2006.

M. GUZMÁN, M. R. ABERTURAS, M. RODR, M. et al. Effect of Nanoparticles on Digitoxin Uptake and Pharmacologic Activity in Rat Glomerular Mesangial Cell Cultures. **Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 215–222, 29 jan. 2000.

MA, K. et al. LC3-II may mediate ATR-induced mitophagy in dopaminergic neurons through SQSTM1/p62 pathway. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 50, n. 10, p. 1047–1061, 1 out. 2018.

MAHARAJAN, K. et al. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 132–145, mar. 2018.

MANGEON, C. et al. Networks based on biodegradable polyesters: An overview of the chemical ways of crosslinking. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 760–770, 1 nov. 2017.

MARCHAL-HEUSSLER, L. et al. Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules in carteolol ophthalmic delivery. **Pharmaceutical research**, v. 10, n. 3, p. 386–90, mar. 1993.

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

MATTOS DE AGUIAR, L. et al. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. 2016.

MCCOY, J. R. R. AND K. A. Atrazine meta-analysis on fish and amphibians. 2010.

MIRANDE, L. et al. Side-effects of glyphosate on the life parameters of *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) in Argentina. **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v. 75, n. 3, p. 367–72, 2010.

MLADENović, M. et al. The targeted pesticides as acetylcholinesterase inhibitors: Comprehensive cross-organism molecular modelling studies performed to anticipate the pharmacology of harmfulness to humans in vitro. **Molecules**, v. 23, n. 9, 2018a.

MLADENović, M. et al. The Targeted Pesticides as Acetylcholinesterase Inhibitors:

Comprehensive Cross-Organism Molecular Modelling Studies Performed to Anticipate the Pharmacology of Harmfulness to Humans In Vitro. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2192, 30 ago. 2018b.

MONSERRAT, J. M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1–2, p. 221–234, 1 jul. 2007.

MUELLER, L. D.; BARTER, T. T. A model of the evolution of larval feeding rate in *Drosophila* driven by conflicting energy demands. **Genetica**, v. 143, n. 1, p. 93–100, 2015.

OLIVEIRA, R. A. et al. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 10, p. 1122–1133, out. 2014.

PAKYARI, H.; ENKEGAARD, A. Lethal and sublethal effects of fenpropathrin on the biological performance of *Scolothrips longicornis* (Thysanoptera: Thripidae). **Journal of economic entomology**, v. 106, n. 6, p. 2371–7, dez. 2013.

POMPA, P. P. et al. In Vivo toxicity assessment of gold nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. **Nano Research**, v. 4, n. 4, p. 405–413, 22 abr. 2011.

RAND, M. D. **Drosophotoxicology: The growing potential for Drosophila in neurotoxicology** *Neurotoxicology and Teratology*, 2010.

RUSSELL, C.; SCHULTZ, C. B. Effects of grass-specific herbicides on butterflies: an experimental investigation to advance conservation efforts. **Journal of Insect Conservation**, v. 14, n. 1, p. 53–63, fev. 2010.

SABAT, D. et al. Investigation of titania nanoparticles on behaviour and mechanosensory organ of *Drosophila melanogaster*. **Physiology & Behavior**, v. 167, p. 76–85, 2016.

SAGARKAR, S. et al. Atrazine exposure causes mitochondrial toxicity in liver and muscle cell lines. **Indian journal of pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 200–7, 2016a.

SAGARKAR, S. et al. Atrazine exposure causes mitochondrial toxicity in liver and muscle cell lines. **Indian journal of pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 200–7, 2016b.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. **CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS**

NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

Quim. Nova. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v26n5/17209.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SCHNOOR, B. et al. Engineering Atrazine Loaded Poly (lactic- *co* -glycolic Acid) Nanoparticles to Ameliorate Environmental Challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 30, p. 7889–7898, 24 ago. 2018.

SEMREN, T. Ž.; ŽUNEC, S.; PIZENT, A. Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 69, n. 2, p. 109–125, 1 jun. 2018.

SHENOY, D. B. et al. Potential Applications of Polymeric Microsphere Suspension as Subcutaneous Depot for Insulin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, n. 5, p. 555–563, 5 jan. 2003.

SILVA, M. DOS S. et al. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1868–1873, 2010.

SILVA, M. DOS S. et al. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1–3, p. 366–374, 15 jun. 2011.

SINHA, V. R. et al. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1–23, 18 jun. 2004.

SOLOMON, K. R. et al. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 10–11, 1995.

SONG, X.-Y. et al. Atrazine Causes Autophagy- and Apoptosis-Related Neurodegenerative Effects in Dopaminergic Neurons in the Rat Nigrostriatal Dopaminergic System. **Int. J. Mol. Sci**, v. 16, p. 13490–13506, 2015.

SPINAZZI, M. et al. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1235–1246, 2012.

SPOSITO, J. C. V et al. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 209, p. 696–704, out. 2018.

THORNTON, B. J. et al. Proteomic analysis of atrazine exposure in *Drosophila*

melanogaster (Diptera: Drosophilidae). **Chemosphere**, v. 81, n. 2, p. 235–41, set. 2010.

TUCCI, M. et al. Microbial amperometric biosensor for online herbicide detection: Photocurrent inhibition of *Anabaena variabilis*. **Electrochimica Acta**, v. 302, p. 102–108, 10 abr. 2019.

VAN DER KRAAK, G. J. et al. Effects of Atrazine in Fish, Amphibians, and Reptiles: An Analysis Based on Quantitative Weight of Evidence. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 44, n. sup5, p. 1–66, 6 dez. 2014.

VAN DIJK, H. F. G.; GUICHERIT, R. Atmospheric Dispersion of Current-Use Pesticides: A Review of the Evidence from Monitoring Studies. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 115, n. 1/4, p. 21–70, 1999.

VAUTHIER, C. et al. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 55, n. 4, p. 519–48, 25 abr. 2003.

WALTERS, J. L. et al. The effects of gestational and chronic atrazine exposure on motor behaviors and striatal dopamine in male Sprague-Dawley rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 289, n. 2, p. 185–92, 1 dez. 2015.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 1 out. 2010.

YANG, Y. Q. et al. pH-sensitive micelles self-assembled from multi-arm star triblock co-polymers poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(2-(diethylamino)ethyl methacrylate)-b-poly(poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate) for controlled anticancer drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7679–7690, ago. 2013.

ZHANG, C. et al. Atrazine induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in quail (*Coturnix C. coturnix*) kidney via modulating Nrf2 signaling pathway. **Chemosphere**, v. 212, p. 974–982, dez. 2018.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).