



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

MAYARA MELO FORTE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Moringa oleifera* L. NA
FITORREMEDIAÇÃO DE ÁGUAS CONTAMINADAS PELO HERBICIDA
ATRAZINA**

FORTALEZA – CEARÁ

2016

MAYARA MELO FORTE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Moringa oleifera* L. NA FITORREMEDIAÇÃO
DE ÁGUAS CONTAMINADAS PELO HERBICIDA ATRAZINA

Monografia apresentada ao curso Bacharelado em Biotecnologia, do Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Co-orientador: Me. Tiago Deiveson Pereira Lopes

FORTALEZA – CE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F842a Forte, Mayara Melo.

Avaliação do potencial de Moringa oleifera na fitorremediação de águas contaminadas pelo herbicida atrazina / Mayara Melo Forte. – 2016.

70 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.

Coorientação: Prof. Me. Tiago Deiveson Pereira Lopes.

1. Moringa oleifera. 2. fitorremediação. 3. atrazina. I. Título.

CDD 661

MAYARA MELO FORTE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Moringa oleifera* L. NA FITORREMEDIAÇÃO
DE ÁGUAS CONTAMINADAS PELO HERBICIDA ATRAZINA

Monografia apresentada ao Curso
Bacharelado em Biotecnologia, do
Centro de Ciências, do Departamento
de Bioquímica e Biologia Molecular
da Universidade Federal do Ceará,
como requisito para obtenção do
Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ms. Tiago Deiveson Pereira Lopes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Lucas Pinheiro Dias
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Pedro Filho Noronha de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus,

Aos meus pais, Mariana e Alvaro,

Aos meus tios, Mariluse, Diluse e Hélio,

A todos os colegas e professores

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida e todas as oportunidades que me foram concedidas e mesmo pelos momentos ruins, que me tornaram uma pessoa mais forte;

À **minha mãe Mariana e ao meu pai Alvaro**, por serem os meus pilares de força por todos esses anos, mesmo nas dificuldades, não me deixando desistir nunca;

A **toda a minha família, aqui representada pelos meus tios Mariluse, Diluse e Hélio**, sem os quais eu não teria conseguido chegar até esse momento;

À **professora Daniele** por ter aceitado me orientar, pela oportunidade, pela paciência e apoio durante todo esse tempo e por ser amiga, além de orientadora, para todos os seus alunos;

À **professora Ilka**, pelo suporte, sugestões e pela disponibilidade do seu laboratório, sem os quais esse trabalho não poderia ter sido concluído;

Aos **professores Hermógenes David de Oliveira e Dirce Fernandes de Melo**, pessoas que admiro e tenho enorme carinho, pelo apoio e exemplo que me deram ao longo dessa caminhada acadêmica;

Ao **Pedro**, por toda a ajuda e comprometimento para a finalização desse projeto;

Ao **professor Tadeu e todos os colegas do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa**: Rodolpho, Thiago, Raíssa, Ivna, Ana Lídia, Dhel, Thaís e Fredy, pela ajuda nos experimentos e por todo o apoio e companheirismo;

A todos os **colegas do Labtox**: Pâmella, Nadine, Helen, Mariana, Hallison, Tiago, Xavier, Marina, Ana Paula, Lady, Felipe, Paulo, Lucas, Yara, Mirella, Tarcymara e Amanda, pela ajuda e paciência de todos durante os dias de trabalho e por terem me acolhido nessa família maravilhosa;

A todos os **colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**, pelas contribuições durante o desenvolvimento deste projeto.

Minha sincera gratidão!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os trabalhos experimentais que compõem esta dissertação foram realizados com o apoio dos seguintes Programas/Instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Toxinas Vegetais-LABTOX**, sob a coordenação da Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

INSTITUIÇÕES DE FOMENTO E APOIO À PESQUISA COMO: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), que contribuem para a melhoria nas condições experimentais e na formação de recursos humanos dentro do programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

" Trabalha como se tudo dependesse de ti e confia como se tudo dependesse de Deus."

Santo Inácio de Loyola

RESUMO

A fitorremediação é uma técnica emergente, de baixo-custo, que utiliza plantas para remover, transformar ou estabilizar contaminantes presentes no solo, no ar e na água. Algumas plantas apontadas como boas candidatas para a remediação de solos e águas têm sido avaliadas quanto aos processos bioquímicos e genéticos envolvidos na captação, transporte e armazenamento dos poluentes. *Moringa oleifera* apresenta algumas das características importantes na escolha de espécies vegetais fitorremediadoras. Dentre elas destacam-se suas propriedades coagulantes/floculantes, boa adaptabilidade às condições climáticas do Ceará, rápida taxa de crescimento e grande resistência a pragas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de fitorremediação dessa espécie em águas contaminadas por atrazina, um herbicida amplamente utilizado mundialmente. Para isso, plantas de *M. oleifera* foram postas em contato com águas artificialmente contaminadas com atrazina, nas concentrações de 0,2, 1,0, 2,0 e 20 mg/L. O potencial de fitorremediação foi avaliado através de parâmetros de crescimento vegetal, atividades enzimáticas e capacidade de diminuir a concentração de atrazina na água. Os resultados mostraram que as plantas foram intolerantes às concentrações de 2 e 20 mg/L de atrazina. Porém, as plantas tratadas com as concentrações de 0,2 e 1 mg/L sobreviveram até o final do experimento, apesar de terem apresentado sinais de fitotoxicidade. A dosagem das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo mostrou que folhas e raízes de plantas tratadas com atrazina apresentaram perfil distinto de expressão dessas moléculas. De maneira geral, foram observados aumentos significativos de peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX) principalmente em raízes de plantas submetidas ao tratamento com atrazina. A avaliação dos teores de atrazina no meio hidropônico mostrou que com apenas dois dias de tratamento, as plantas de moringa conseguiram reduzir em 43% os teores de atrazina. Já com 10 dias de tratamento, a taxa de remoção foi de 89%. Os resultados obtidos indicam que a *M. oleifera* é uma espécie que apresenta um grande potencial para a fitorremediação de ambientes contaminados com atrazina e/ outros compostos de interesse ambiental.

Palavras-chave: *M. oleifera*, fitorremediação, atrazina.

ABSTRACT

Phytoremediation is a low-cost emerging technique, which uses plants to remove, transform or stabilize soil, air and water contaminants. Some plants, counted as good candidates for soil and water remediation, have been evaluated regarding the genetics and biochemistry processes involved in the capitation, transport and storage of the pollutants. *Moringa oleifera* presents some of the important characteristics in the selection of plant species for phytoremediation. Among them, stand out its coagulating/flocculating properties, good adaptability to Ceará state's climatic conditions, fast growth rate and high resistance to diseases. Thus, the present work aims to evaluate the potential of *M. oleifera* for the phytoremediation of water contaminated by atrazine, an herbicide widely used in the world. For this, *M. oleifera* plants were put in contact with water artificially contaminated by atrazine in the 0.2, 1, 2 and 20 mg/L concentrations. The phytoremediation potential was evaluated through vegetal growth parameters, enzymatic activities and the capacity to reduce the atrazine concentration in water samples. The results demonstrate that the plants were intolerant to the 2 and 20 mg/L atrazine dosages. However, the plants submitted to the 0.2 and 1 mg/L dosages could survive until the end of the experiment, even though they presented evidence of phytotoxicity. The measure of enzymatic activity related to oxidative stress proved that treated plant's leaves and roots presented distinct profile of molecules. Overall, were observed a significant increase of peroxidase enzymes (POX and APX), especially in roots of plants submitted to atrazine treatment. The evaluation of the levels of atrazine in the hydroponic medium showed that within two days of treatment, the moringa plants reduced atrazine levels by 43%. After 10 days of treatment, the degradation rate was 89%. The results indicate that *M. oleifera* is a species with great potential for phytoremediation of environments contaminated with atrazine and other compounds of environmental relevance.

Key words: *M. oleifera*, phytoremediation, atrazine.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Estrutura molecular da atrazina	05
Figura 2 - Plantas de <i>Moringa oleifera</i> em casa de vegetação, tratadas com atrazina (0,2, 2 e 20 mg/L) em sistema de hidroponia.....	15
Figura 3 - Esquema de extração de proteínas dos tecidos vegetais de <i>M. oleifera</i>	17
Figura 4 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE dos extratos de folhas de plantas de <i>M. oleifera</i> tratadas com soluções de atrazina por um período de 10 dias.....	28
Figura 5 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE dos extratos de raízes de <i>M. oleifera</i> tratadas com soluções de atrazina em várias concentrações por um período de 10 dias.....	28
Figura 6 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE dos extratos foliares de <i>M. oleifera</i> no tratamento de 1mg/L de atrazina, em diversos tempos.....	29
Figura 7 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE dos extratos radiculares de <i>M. oleifera</i> no tratamento de 1 mg/L de atrazina, em diversos tempos.....	29
Figura 8 - Atividade catalásica do tecido radicular de plantas de <i>Moringa oleifera</i> tratadas com atrazina em diferentes concentrações por um período de 10 dias.....	31
Figura 9 - Atividade peroxidásica (POX) do tecido radicular de plantas de <i>M. oleifera</i> tratadas com atrazina em diferentes concentrações por um período de 10 dias.....	33
Figura 10 - Atividade peroxidásica (POX) do tecido foliar de <i>M. oleifera</i> tratada com atrazina em diferentes concentrações por um período de 10 dias.....	33
Figura 11 - Atividade ascorbato peroxidásica (APX) do tecido radicular de <i>M. oleifera</i> tratada com atrazina em diferentes concentrações pelo período de 10 dias.....	35
Figura 12 - Atividade ascorbato peroxidásica (APX) do tecido foliar de <i>M. oleifera</i> tratada com diferentes concentrações de atrazina por um período de 10 dias.....	35
Figura 13 - Perfil cromatográfico da atrazina padrão e da amostra de água em sistema de HPLC.....	38
Figura 14 - Curva de calibração da atrazina.....	39
Figura 15 - Teores de atrazina antes e após contato com <i>M. oleifera</i> , em diferentes tempos.....	39

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Condições cromatográficas para detecção de atrazina em amostras de água	22
Tabela 2	Ganho de biomassa de plantas de <i>Moringa oleifera</i> tratadas com atrazina no período de 10 dias.....	24
Tabela 3	Ganho de biomassa de plantas de <i>Moringa oleifera</i> tratadas com atrazina (1 mg/L) durante o período de 2, 5 e 10 dias.....	24
Tabela 4	Relação de massa parte aérea/Raiz de plantas de <i>Moringa oleifera</i> tratadas com atrazina.....	24
Tabela 5	Concentração de proteínas solúveis (mg/mL) em raízes e folhas de plantas de <i>Moringa oleifera</i> tratadas com atrazina nas concentrações de 0,2, 1, 2 e 20 mg/L por um período de 10 dias.....	26
Tabela 6	Comparação da taxa de degradação de atrazina por <i>M. oleifera</i> em relação a outras espécies em relação ao tempo de experimento.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APX	Atividade ascorbato peroxidásica
ATZ	Atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina)
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Atividade catalásica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (do inglês, <i>High Protein Liquid Chromatography</i>)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
POX	Atividade Peroxidásica guaiacol dependente
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Atividade da superóxido dismutase
TCA	Ácido Tricloroacético (do inglês <i>Trichloroacetic acid</i>)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UA/mgP	Unidade de atividade por miligrama de proteína
UA/gMF	Unidade de atividade por grama de massa fresca do tecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Poluentes ambientais	2
2.2 Atrazina: uso desenfreado e problemas relacionados	2
2.3 Fitorremediação: uma técnica em ascensão.....	6
2.4 <i>Moringa oleifera</i> Lamarck.....	8
3 HIPÓTESE	11
4 OBJETIVOS	12
4.1 Objetivo Geral	12
4.2 Objetivos específicos	12
5 MATERIAIS	133
5.1 Material vegetal.....	133
5.2 Reagentes químicos	133
6 MÉTODOS	13
6.1 Germinação das sementes e plantio em casa de vegetação	133
6.2 Tratamento com atrazina	14
6.3 Preparo dos extratos de <i>M. oleifera</i>	16
6.4 Quantificação de proteínas	16
6.5 Caracterização bioquímica dos extratos	18
6.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	18
6.5.2 Ensaio enzimáticos.....	18
6.5.2.1 Atividade Catalásica.....	18
6.5.2.2 Atividade peroxidásica guaiacol dependente.....	19
6.5.2.3 Atividade ascorbato peroxidase.....	19
6.5.2.4 Atividade superóxido dismutase.....	19
6.5.2.5 Atividade lacásica.....	20
6.6 Avaliação da capacidade de remediação de águas contaminadas com atrazina por plantas de <i>Moringa oleifera</i>	20
6.6.1 Extração de atrazina das amostras de água.....	21

6.6.2 Análise cromatográfica.....	21
6.7 Análise estatística.....	21
7 RESULTADOS.....	2323
7.1 Avaliação do desenvolvimento de <i>M. oleifera</i>	23
7.2 Caracterização bioquímica dos extratos	25
7.2.1 Quantificação de proteínas	25
7.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	27
7.2.3 Ensaio enzimáticos.....	30
7.2.3.1 Atividade Catalásica.....	30
7.2.3.2 Atividade peroxidásica guaiacol dependente.....	32
7.2.3.3 Atividade de ascorbato peroxidase.....	34
7.2.3.4 Atividade superóxido dismutase.....	36
7.2.3.5 Atividade lacásica.....	36
7.3 Avaliação da capacidade de remediação de águas contaminadas com atrazina por plantas de <i>Moringa oleifera</i>	36
8 DISCUSSÃO	40
9 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental é caracterizada pelo lançamento de resíduos na atmosfera, água ou solo (NASCIMENTO, 1996). Este problema tem se tornado cada vez mais frequente, sendo considerado um impasse, tanto para os países desenvolvidos como para as nações em desenvolvimento. O Brasil encontra-se entre os 15 países mais poluidores do mundo, com um alto índice de crescimento para esse parâmetro (UNFCCC, 2014). Além de resíduos orgânicos residenciais, as redes de saneamento básico de grandes cidades também acumulam muitos resíduos industriais, que acabam contaminando águas e solos.

O uso indiscriminado de agrotóxicos é uma das facetas mais preocupantes no Brasil, uma vez que o agronegócio tem uma expressiva participação na economia do país e representava, já em 2012, aproximadamente 22,15% do PIB (ECOAGRO, 2016), tendo projeções de aumento de cerca de 58,8 milhões de toneladas desse ano até 2025/2026, somente na produção de grãos (SPA, 2016). Desde 2008, o Brasil é considerado o país mais consumidor de pesticida do mundo (SOUSA *et al.*, 2016; MILHOME *et al.*, 2015). Dentre os estados do Brasil, o Ceará destaca-se como um importante produtor de frutos tropicais, principalmente, na região do baixo Jaguaribe. Apesar da importância econômica, como consequência do agronegócio e indústria têxtil, o Ceará foi considerado de alto risco em relação ao nível de gerenciamento de áreas contaminadas no panorama nacional (ARAÚJO; CAFFARO, 2015).

Dentre os agrotóxicos químicos mais utilizados no mundo está a atrazina, um herbicida que inibe a fotossíntese. Esse composto encontra-se em segunda posição na lista de comercialização de pesticidas, tanto a nível nacional (VSPEA, 2016) quanto em vários locais do Ceará (GAMA *et al.*, 2013). Em alguns municípios do Estado, como Lavras da Mangabeira e Crateús, o índice de contaminação verificado está bem acima da concentração permitida (SOUSA *et al.*, 2016), gerando um elevado risco à saúde da população e ecossistema locais.

As estratégias para a remediação de compostos virtualmente tóxicos do ambiente são difíceis de serem empregadas devido às diversas classes e tipos de compostos existentes. Várias técnicas voltadas para recuperação de áreas contaminadas empregam métodos de natureza mecânica e química. Contudo, além de serem intrusivas, essas técnicas nem sempre são eficazes além de

demandarem elevados custos para serem empregadas (KENSA, 2011). Assim, a busca por estratégias de remediação empregando organismos vivos para a descontaminação ou remediação de águas, solos e ar tem sido crescente nos últimos anos (GUPTA, 2016). Como exemplo de organismos capazes de imobilizar, captar, transformar ou degradar compostos tóxicos, destacam-se as plantas. A fitorremediação é uma estratégia bastante promissora tendo em vista que apresenta baixo consumo de energia e alto grau de eficiência já bastante relatada na literatura. Apesar disso, poucas espécies vegetais têm sido, de fato, empregadas com esse intuito.

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como foco a avaliação do potencial de fitorremediação de águas contaminadas pelo herbicida atrazina por uma espécie vegetal bastante adaptada às condições climáticas do estado do Ceará, denominada *Moringa oleifera*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Poluentes ambientais

Os poluentes ambientais podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos. Os primeiros são produzidos pelo homem e podem ser tóxicos e/ou carcinogênicos, causando danos aos organismos. Estes compostos são liberados no ambiente através do derramamento de combustíveis e solventes, das atividades militares e de atividades agrícolas, pelo uso de inseticidas, fungicidas, herbicidas e fertilizantes, ou das indústrias químicas (PILON-SMITS, 2005).

Já os poluentes inorgânicos ocorrem naturalmente na superfície do planeta ou na atmosfera. Atividades como industrialização, mineração e agricultura, por exemplo, provocam sua liberação no ambiente de forma desordenada. Esses contaminantes não podem ser degradados das formas convencionais, mas podem ser sequestrados e/ou estabilizados por plantas que são tratadas posteriormente. Alguns exemplos disso são os nutrientes não essenciais às plantas como, cádmio, mercúrio e isótopos radioativos e também macronutrientes, como fosfato, cobre e zinco, que são essenciais na constituição de enzimas vegetais, e que, contudo, tornam-se tóxicos em níveis elevados (PILON-SMITS, 2005).

2.2 Atrazina: Uso desenfreado e problemas relacionados

Os contaminantes orgânicos representam compostos como hidrocarbonetos de petróleo, solventes clorados, hidrocarbonetos halogenados e explosivos. Essas substâncias são consideradas menos tóxicas para as plantas em relação aos contaminantes inorgânicos, por serem menos reativas e não se acumularem rapidamente. De acordo com suas estruturas moleculares e uma série de propriedades, podem ser degradadas por plantas em sua zona radicular e, quando absorvidas, podem ser sequestradas, degradadas ou volatilizadas pelas mesmas (CRUVINIL, 2009; VIEIRA *et al.*, 2011).

O herbicida atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)- s-triazina), é um contaminante orgânico não ácido e levemente hidrofílico pertencente à classe das s-triazinas, que inibe o fotossistema II pelo bloqueio do transporte de elétrons, conduzindo à necrose dos tecidos vegetais das espécies sensíveis a ela. Esse herbicida é reconhecidamente efetivo e veementemente indicado para controle de plantas daninhas em culturas de grande importância econômica no nosso país, como a cana-de-açúcar e o milho (EMBRAPA, 2006). Os herbicidas dessa classe classificam-se em três grupos, de acordo com o grupo substituinte da posição 2 do anel aromático, que poderá ser um cloro (Cl), no caso das clorotriazinas, um grupo SCH₃, para as metiltiotriazinas ou OCH₃, para metoxitriazinas. A molécula da atrazina está incluída no primeiro grupo, sendo considerada uma clorotriazina (Figura1).

Devido a esse seu uso indiscriminado na agricultura, desde a década de 50, e a um extenso período de meia-vida, o que acaba por exceder a capacidade de degradação natural do solo, esse composto e seus resíduos têm se tornado um dos principais e mais persistentes contaminantes liberados no meio ambiente (SOUSA *et al.*, 2016). Além disso, os processos de escoamento e lixiviação podem estender a contaminação do solo a fontes de água subterrâneas aumentando o efeito negativo deste herbicida e seus metabólitos sobre a vida selvagem e a saúde humana (YANG SONG, 2014; HOUJUAN XING *et al.*, 2014; MELA *et al.*, 2013).

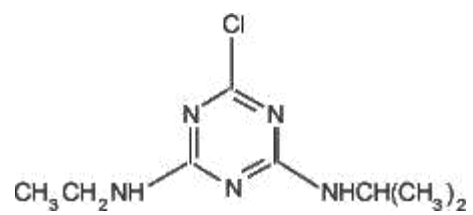
Vários trabalhos mostram a toxicidade da atrazina para diversas espécies de algas, macrófitas e fitoplâncton (BELDEN; COATS, 2004) e animais, como

ratos (FILIPOV, 2007), camundongos (COBAN; FILIPOV, 2007), anfíbios (LIN *et al.*, 2008; RALSTON-HOOPER *et al.*, 2009), peixes (FORTIN *et al.*, 2008) e insetos (MURPHY e COATS, 2011). Além disso, tem sido encontrada uma relação entre a exposição a esse herbicida e o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, em mamíferos (BIRADAR; RAYBURN, 1995; PATLAK, 1996; SATHIAKUMAR *et al.*, 2011; POWELL *et al.*, 2011).

Devido a essas e outras complicações, esse pesticida é considerado de alto risco, tendo limites máximos de detecção em águas de consumo regulamentados nos Estados Unidos e Europa, sendo que neste último, seu uso já está proibido em diversos países, como é o caso da França, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Áustria e Itália (RAS, 2011).

Além de toda essa problemática envolvida com o uso da atrazina na agricultura, outra questão preocupante é que muitos produtos comerciais trazem em sua composição não apenas essa substância em sua forma pura, mas também ingredientes inertes, não especificados quimicamente e que, muitas vezes, incluem outros contaminantes ambientais, como, por exemplo, metais pesados (JACQUES, AVILA e SOARES, 2014).

Figura 1. Estrutura molecular da atrazina.



2.3 Fitorremediação: uma técnica em ascensão

A fitorremediação é uma tecnologia verde em ascensão, na qual utiliza-se plantas e a flora microbiana presente na rizosfera destas para remediar diversos ambientes, como solos, águas de superfície e lençóis freáticos contaminados por metais pesados, compostos orgânicos e radionuclídeos (SHARMA; SING; MANCHANDA, 2015). Trata-se de uma tecnologia sustentável bastante efetiva e não-intrusiva, com custos muito baixos, além de ser esteticamente agradável, o que a faz mais socialmente e ecologicamente aceitável quando comparada a alguns métodos alternativos, como a remediação mecânica e/ou química (CHIRAKKARA; CAMESELLE; REDDY, 2016).

A remediação de ambientes mediada pelas plantas pode ser realizada tanto para compostos orgânicos como inorgânicos. Para o caso dos orgânicos, vários fatores influenciam na captação, distribuição e transformação desses compostos. Dentre esses fatores destacam-se as propriedades físicas e químicas do composto (solubilidade em água, massa molecular, coeficiente de partição octanol-água), as condições ambientais (temperatura, pH, matéria orgânica, umidade etc) e as características das plantas (tamanho das raízes, presença de enzimas etc) (TRUUA *et al.*, 2015).

A extração dos contaminantes do meio e seu subsequente acúmulo nos tecidos vegetais é denominada **fitoextração**, e envolve espécies denominadas hiperacumuladoras. Essas plantas são capazes de concentrar elementos inorgânicos em níveis até cem vezes maiores que outras espécies, sob as mesmas condições ambientais. Após a aplicação desse método, a fim de evitar a dispersão do contaminante na cadeia alimentar, se faz necessária a extração da planta do local antes que haja a queda das folhas ou a morte e decomposição dessa, uma vez que esse composto fica acumulado nos tecidos vegetais. Em seguida à colheita, a biomassa obtida deve passar por um processo de extração e recolhimento da maior parte dos contaminantes (KANG, 2014).

A **fitovolatilização** baseia-se na obtenção da forma volátil do contaminante, após absorção e incorporação desses nos tecidos da planta. Esse tipo de fitorremediação é de grande eficácia em alguns compostos inorgânicos, como selênio e mercúrio, os quais podem existir na forma volátil, bem como para compostos orgânicos voláteis como o tricloroetileno (TCE). Esta técnica é

bastante atrativa, pelo fato de a volatilização remover o poluente do local integralmente na forma gasosa, sem que haja a necessidade de extrair a planta do local após o procedimento. Contudo, embora alguns estudos não tenham demonstrado riscos em relação aos níveis desses gases fitovolatilizados, os resquícios do contaminante lançados na atmosfera pela planta durante o processo podem vir a ser tóxicos e considerado elementos de risco para uma nova fonte de contaminação (LI *et al.*, 2003).

A **fitoestimulação** é caracterizada pela degradação de poluentes orgânicos estimulada por exsudatos de plantas, que atuam como fonte de elementos como carbono e nitrogênio para os microrganismos do solo. Ambientes contaminados por compostos orgânicos hidrofóbicos, que não podem ser absorvidos pela planta, mas podem ser degradados por microrganismos como bifenilas policloradas (PCB) e outros hidrocarbonetos de petróleo, são os mais beneficiados por esse processo (KAIMI *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que a associação de espécies vegetais a microrganismos presentes no solo, como micorrizas, pode influenciar significativamente a fitoestabilização de compostos nesses meios. Particularmente em relação a metais pesados, isso pode ocorrer devido a formação de ligações entre contaminantes, como zinco e cádmio e os micélios desses fungos, promovendo uma maior retenção desses elementos nas raízes da planta em detrimento das partes aérea, e protegendo, assim, o crescimento do organismo como um todo (RUFYIKIRI; THIRY; DECLERCK, 2003; RUFYIKIRI *et al.*, 2002).

Na **fitodegradação**, as plantas degradam contaminantes através da ação de complexos enzimáticos, como glutatona e citocromo P-450 monooxigenases. Esse tipo de processo é bastante utilizado para contaminantes orgânicos. É o caso de compostos como trinitrotolueno e TCE e herbicidas como a atrazina. Essa estratégia utilizada por algumas plantas visa transformar os contaminantes em intermediários estáveis, que serão armazenados na planta, ou para mineralizá-los completamente a compostos inorgânicos como, cloro, dióxido de carbono e água.

Embora esse processo seja comumente atribuído à planta, em determinadas situações alguns microrganismos endofíticos podem estar envolvidos (BARAC *et al.*, 2004). É o caso, por exemplo, de quando a degradação acontece na rizosfera. Esse método, denominado **rizodegradação**,

utiliza a relação simbiótica com organismos do solo tais como bactérias, fungos e leveduras para que ocorra o processo de degradação (MYRESIOTIS *et al.*, 2012).

Apesar da fitorremediação ser considerada uma técnica ambientalmente benéfica e multifuncional de remediação, sua eficiência pode ser limitada por efeitos sazonais ou pela insuficiente habilidade de tolerar, detoxificar e acumular poluentes em áreas contaminadas. Além disso, o sucesso da fitorremediação normalmente demanda um tempo muito longo, as vezes de décadas, o que torna muito difícil a avaliação de seu sucesso em curto intervalo de tempo (KANG, 2014).

Diante desse contexto, inúmeros trabalhos têm sido realizados a fim de prospectar espécies de plantas que apresentem maior tolerância e maior capacidade de degradar ou acumular compostos orgânicos e/ou inorgânicos, além de apresentar crescimento rápido. Além disso, a Biotecnologia tem auxiliado bastante nos progressos que vêm sendo alcançados na adaptação e/ou melhoria de plantas para remediação de áreas poluídas (KAWAHIGASHI, 2009; SHARMA; SING; MANCHANDA, 2015).

2.4 *Moringa oleifera* Lamark

Moringa oleifera, da família *Moringaceae*, é uma planta de pequeno a médio porte e de crescimento rápido originária do nordeste da Índia. É adaptada a diversos tipos de condições climáticas, desde as subtropicais até tropicais secas e florestas úmidas. Atualmente esta espécie encontra-se distribuída nas Filipinas, América Central, América do Norte e América do Sul (MAKKAR; BECKER, 1997). No Brasil, onde foi introduzida nos anos de 1950, é encontrada na região Nordeste, principalmente nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará (MATOS, 1998).

M. oleifera é considerada uma planta de múltiplas utilidades. Devido ao seu elevado valor nutricional, todas as partes da planta podem ser consumidas, especialmente suas folhas, por serem ricas em proteínas, vitaminas e sais minerais (WADHWA *et al.*, 2013). Há também vários relatos das propriedades terapêuticas dessa planta devido às suas propriedades bactericidas, diuréticas, hipoglicemiante, analgésica, antipirética, etc. (DUBEY *et al.*, 2013). Além disso, estudos demonstram diversas aplicações para *M. oleifera*, incluindo a produção

de biomassa, forragem para animais, biogás, agente de limpeza doméstica, fertilizantes e clarificador de mel e de caldo de cana-de-açúcar (FOIDL; MAKKAR; BECKER, 2001). Contudo, a proposta mais habitual de utilização desta planta consiste na purificação de água.

É sabido que sementes de *M. oleifera* possuem proteínas catiônicas com massa molecular em torno de 13,0 kDa e ponto isoelétrico entre 10 e 11, as quais são consideradas agentes ativos de coagulação nos processos de clarificação de água para consumo (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995; ADELAJA *et al*, 2011). Outro peptídeo catiônico, com massa molecular aparente de 6,5 kDa, rico em resíduos de arginina e prolina e possuindo ponto isoelétrico em torno de 10, foi isolado também de sementes de *M. oleifera*. Esse peptídeo, por ter alta densidade de cargas, demonstrou ter excelente atividade coagulante (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995). Posteriormente, outro grupo de pesquisadores reportou que frações enriquecidas dessas proteínas coagulantes - altamente termoestáveis, mesmo quando aquecidas a 96 °C, por 5 horas - tinham a capacidade de aglutinar material em suspensão, além de agregar e inibir o crescimento de microrganismos como *Escherichia coli* e *Bacillus thurigiensis*. (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005).

Moringa oleifera reúne características importantes na escolha de espécies vegetais fitorremediadoras, tais como sua adaptabilidade às condições climáticas do Brasil, em especial do Ceará, rápida taxa de crescimento e resistência a pragas, além de apresentar as propriedades coagulantes/floculantes citadas anteriormente.

A capacidade dessa espécie vegetal para remoção de contaminantes da água é reconhecida há bastante tempo (OLSEN, 1987). Muitos estudos com *M. oleifera* demonstram seu potencial na remediação de ambientes contaminados com metais pesados, como cádmio (SAJIDU *et al.*, 2006; SHARMA, 2007), chumbo (MATAKA *et al.*, 2006; ADELAJA *et al*, 2011) e arsênico (KUMARI *et al.*, 2006), contudo não existem muitos estudos sobre a remediação de compostos orgânicos para essa espécie vegetal.

Com esse levantamento, surgiram as seguintes perguntas de partida: É possível que exemplares de *M. oleifera* Lam. sejam capazes de absorver doses significativas do herbicida atrazina, retirando-o do meio? Em caso positivo, que

influências a presença dessa substância teria no desenvolvimento e nas características bioquímicas da planta?

3. HIPÓTESE

Tendo em vista estudos sobre a aplicação de *Moringa oleifera* na fitorremediação de compostos como metais pesados, bem como sua utilização tradicional no tratamento e clarificação de águas, levantou-se a hipótese de que essa espécie é também capaz de captar e metabolizar compostos orgânicos do meio.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de fitorremediação de *Moringa oleifera* em águas contaminadas por atrazina, um composto orgânico tóxico.

4.2 Objetivos específicos

- Otimizar, em casa de vegetação, o plantio hidropônico de plantas de *M. oleifera*;
- Avaliar, durante o ciclo de desenvolvimento das plantas, os parâmetros de crescimento, fisiológicos e sinais de fitotoxicidade;
- Mensurar, nos tecidos vegetais, indicadores de estresse do sistema antioxidante enzimático;
- Avaliar os níveis residuais de atrazina na água após o cultivo de *M. oleifera*.

5. MATERIAIS

5.1 Material vegetal

Sementes de *Moringa oleifera* Lamarck foram coletadas de plantas localizadas no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, Ceará. As sementes, após seleção quanto ao tamanho, forma e ausência de injúria mecânica, foram acondicionadas à temperatura ambiente, em frascos hermeticamente fechados. A coleta se deu entre os anos de 2014 e 2016, sempre no período compreendido entre os meses de setembro e janeiro, período no qual ocorria a frutificação dessa espécie.

5.2 Reagentes químicos

Metanol (grau HPLC), atrazina (padrão cromatográfico), acrilamida e N,N-metileno-bisacrilamida foram obtidos da Sigma Aldrich. Atrazina comercial foi obtida da empresa Syngenta. Cartuchos de extração em fase sólida do tipo C18 (500 mg), com capacidade para 3 mL, foram obtidos da empresa Thermo Scientific. Persulfato de amônio e marcadores de massa molecular foram obtidos da GE Healthcare, USA.

6. MÉTODOS

6.1 Germinação das sementes e plantio em casa de vegetação.

A metodologia utilizada foi uma adaptação da descrita por Aragão (2008), para sementes de feijão caupi. As sementes foram primeiramente desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio 0,25% (v/v), agitadas por 5 minutos, lavadas por 3 vezes com água destilada e embebidas em água deionizada por uma hora. Após o período de embebição, as sementes foram distribuídas em folhas de papel *Germitest TM* (280 x 380 mm), previamente umedecidas com água destilada, na proporção de 2,5 vezes em relação à massa do papel e ao final cobertas com outra folha também previamente umedecida, envolvendo as sementes de forma a obter um rolo. Os rolos foram cobertos com sacos plásticos desinfetados com etanol 70% (v/v) e acondicionados em câmara de crescimento na posição vertical, onde permaneceram incubados durante um período de sete dias a $27^{\circ}\text{C} \pm 2$, sob fotoperíodo de 12 h. Após a germinação, as plântulas foram

transferidas para casa de vegetação, em recipientes plásticos contendo solução de *Hoagland* 1x concentrada (HOAGLAND e ARNON, 1959). O processo de plantio aplicado foi uma adaptação da metodologia descrita por Torbati, Khataee e Movafeghi (2014).

6.2 Tratamento com atrazina

Após um período de aclimação de 3 dias as plantas foram pesadas e, posteriormente, colocadas em contato, inicialmente, com soluções de atrazina nas concentrações de 0,2, 2,0 e 20,0 mg/L. Tais soluções foram preparadas utilizando água destilada. As plantas controle foram colocadas em água destilada contendo apenas solução de Hoagland. Foram utilizadas 9 plantas (n=9) por tratamento. Os experimentos tiveram duração de 10 dias (Figura 2).

Passados os dias do experimento, as plantas foram retiradas do sistema de hidroponia, lavadas, secas em papel toalha, para retirada do excesso de água, e pesadas.

Posteriormente, foram separadas em raiz e parte aérea, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para posterior análise.

Figura 2 – Plantas de *Moringa oleifera* em casa de vegetação, controle e tratadas com atrazina (0,2, 2 e 20 mg/L) em sistema de hidroponia.



6.3 Preparo dos extratos de *M. oleifera*

Amostras de folhas e raízes pertencentes a cada grupo experimental foram maceradas em nitrogênio líquido. As farinhas obtidas após maceração foram submetidas, separadamente, a extração em diferentes tampões de extração (Figura 3), dependendo do tipo de ensaio enzimático a ser realizado posteriormente. Para isso, cada amostra foi posta em contato com o tampão de extração por um período de 2 h.

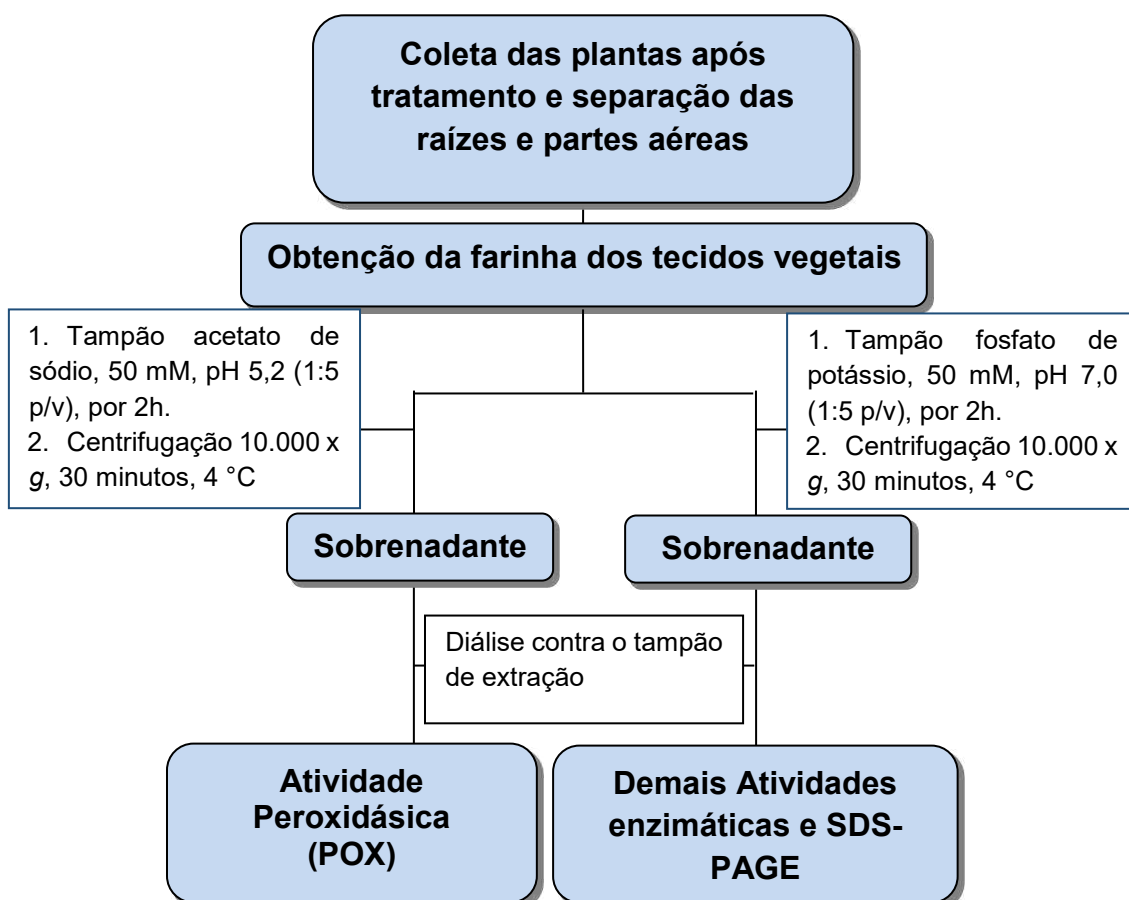
Em seguida, cada amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante, após separação do precipitado e diálise contra os respectivos tampões de extração, em membrana de 12 kDa, foi denominado extrato total.

Os extratos obtidos foram submetidos a dosagem de proteína, eletroforese em gel de poliacrilamida e aos ensaios enzimáticos.

6.4 Quantificação de proteínas

A dosagem de proteínas solúveis foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A uma alíquota de 100 µL do material a ser quantificado foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi levemente agitada e, após 10 minutos, foram realizadas as leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro.

A concentração foi estimada em relação a uma curva padrão obtida utilizando diferentes concentrações de BSA.

Figura 3. Esquema de extração de proteínas dos tecidos vegetais de *M. oleifera*

6.5 Caracterização bioquímica dos extratos

6.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Com o intuito de comparar o perfil eletroforético das proteínas dos extratos de plantas tratadas e não tratadas com atrazina, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (12,5%), seguindo a metodologia estabelecida por Laemmli (1970). A corrida eletroforética foi conduzida em sistema vertical contínuo, a uma voltagem de 200 V e amperagem de 20 mA. Os extratos foram dissolvidos em tampão de amostra, consistindo de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, contendo SDS, em condições não redutoras. Azul de bromofenol 0,1 % foi utilizado como corante de rastreo da corrida eletroforética. As amostras foram primeiramente precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) e lavadas com acetona 100%, a fim de obter-se um maior número de bandas proteicas, reprodutibilidade e maior resolução dos géis (DAMERVAL *et al.*, 1986). Após isso, as amostras foram dissolvidas em tampão de amostra foram aquecidas a 100 °C por 5 min e, posteriormente, centrifugadas a 10.000 x *g* por 5 min. Como marcadores de massa molecular foram utilizados fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), albumina do ovo (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). A coloração das bandas proteicas foi feita com prata (BLUM, BEIER e GROSS, 1987) e/ou *Coomassie Brilliant Blue G-250* (WANG, LI e LI, 2007).

6.5.2 Ensaio enzimáticos

De posse dos extratos, partiu-se para a caracterização das proteínas bioativas presentes no extrato total a partir da farinha de folhas e raízes de *M. oleifera* tratadas ou não com atrazina.

As enzimas analisadas foram catalases, peroxidases guaiacol dependentes, ascorbato peroxidases, superóxido dismutases e lacases.

6.5.2.1 Atividade catalásica

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 300 μ L da amostra a 700 μ L de meio de reação, constituído por tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,0 e peróxido de hidrogênio 112,5 mM (URBANEK *et al.*, 1991). O decréscimo na absorbância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm,

a temperatura ambiente. A atividade catalásica foi expressa como unidade de atividade (UA) por g de tecido (folha ou raiz).

6.5.2.2 Atividade peroxidásica guaiacol dependente

A atividade peroxidásica do extrato foi determinada segundo Urbanek e colaboradores (1991), utilizando-se como meio de reação: 500 μ L de guaiacol 20 mM (Vetec; 97% v/v); 500 μ L de H₂O₂ 60 mM (Vetec, PA); 100 μ L de amostra (mantida em banho de gelo) e 900 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2. A reação foi acompanhada, durante 5 minutos, com intervalos de 30 segundos, a 30 °C, em espectrofotômetro do tipo Novapesc II, Pharmacia LKB, a 480 nm.

Para o cálculo, uma unidade da atividade peroxidásica foi considerada a oxidação de 1 μ mol de guaiacol em 1 minuto nas condições de ensaio, equivalendo a uma unidade de absorvância.

Os resultados obtidos foram expressos em unidades de atividade por g de massa fresca (UA/gMF).

6.5.2.3 Atividade ascorbato peroxidase

O procedimento realizado foi baseado no método aplicado por Peixoto *et al.* (1999), com adaptações, onde adicionou-se 100 μ L da amostra a 900 μ L de meio reacional, constituído por peróxido de hidrogênio 2 Mm e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo ácido L-ascórbico 0,5 mM. O decréscimo na absorvância a 290 nm foi medido no primeiro minuto de reação, a 25 °C. Os resultados obtidos foram expressos em unidades de atividade por g de massa fresca (UA/gMF).

6.5.2.4 Atividade superóxido dismutase

A atividade de dismutases de superóxido (SOD) foi determinada segundo o método utilizado por von Rossum *et al.* (1997), adaptado para uso em micropoços de placas do tipo ELISA. O meio reacional utilizado foi constituído de 10 μ L de tampão fosfato de potássio 1 M, pH 7,8, 20 μ L de EDTA 1 mM, 10 μ L de Triton X-100 0,25%, 20 μ L de L-metionina 130 mM, 100 μ L da amostra, 20 μ L de nitroazul de tetrazólio (NBT) 750 μ M e 20 μ L de riboflavina 100 mM, usando 100 μ L de água deionizada como controle negativo.

As leituras foram feitas a 630 nm, com intervalos de 1 minuto, com um total de 5 minutos de reação, alternadas por períodos em câmara luminosa. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

6.5.2.5 Atividade lacásica

A determinação da atividade lacásica dos extratos foi feita de acordo com o método descrito por Manole *et al.* (2008), com adaptações, utilizando-se como meio reacional: 2,20 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e 500 µL de amostra, tendo como controle positivo 500 µL de uma solução de lacase com 25-50 U/mL (L2157-10KU Sigma). A reação foi iniciada pela adição de 300 µL de siringaldazina (S7896 Sigma) 0,216 mM em metanol 100%, que foi utilizada como substrato.

A reação foi acompanhada, durante 10 minutos, a 30 °C em espectrofotômetro do tipo Novapesc II, Pharmacia LKB, a 530 nm. Uma unidade de atividade corresponde a quantidade de enzima capaz de converter 1 µmole de siringaldazina em pH 7.0 and 25 °C

6.6 Avaliação da capacidade de remediação de águas contaminadas com atrazina por plantas de *Moringa oleifera*

A próxima etapa do trabalho foi a avaliação da capacidade de degradação de atrazina por plantas de *M. oleifera*. Para isso, alíquotas de águas contaminadas artificialmente com atrazina na concentração de 1 mg/L foram coletadas no início (0 h) e no final dos 10 dias do tratamento das plantas de moringa. Após coleta, as alíquotas de água foram congeladas em freezer a -20 °C até serem analisadas.

O método de extração utilizado para extração de atrazina das amostras de água foi o de extração em fase sólida (SPE). Já a concentração de atrazina nas amostras foi determinada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os detalhes tanto da extração como da quantificação de atrazina estão descritos nos itens abaixo.

6.6.1 – Extração de atrazina das amostras de água

A extração de atrazina das amostras de água foi realizada de acordo com o método de Pinto e Jardim (2000), com modificações. Para isso, um volume de 250 mL de cada amostra de água foi acidificado com ácido fosfórico até pH inferior a 2,0 a fim de aumentar a retenção da atrazina no cartucho C18 (SPE). Em seguida, esse volume de amostra foi percolado, com auxílio de uma bomba peristáltica, no cartucho C18 a um fluxo de 3 mL/min. Antes da aplicação, o cartucho foi condicionado com 10 mL de metanol e equilibrado com 10 mL de água grau Milli-Q. O eluato foi descartado e o cartucho contendo o material retido foi seco em dissecador sob vácuo por um período de 5 minutos. Em seguida, o analito (atrazina) foi eluído com 1 mL de metanol 99,9% e submetido a análise em sistema de HPLC.

6.6.2 – Análise cromatográfica

A curva de calibração bem como a quantificação de atrazina em amostras de água foram realizadas em sistema HPLC (Jasco, LC-Net II/Plus) de acordo com as seguintes condições (Tabela 1).

A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol (grau HPLC) e água grau Milli-Q (50:50) a qual foi filtrada e deaerada antes do processo de análise. Uma solução estoque de atrazina (padrão cromatográfico – Sigma Aldrich) foi preparada em metanol (grau HPLC) na concentração de 100 mg/L. A partir dessa solução foram preparadas soluções filhas nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,0 e 2,0 mg/L também em metanol (grau HPLC). Volumes de 50 µL dessas soluções foram aplicados na coluna C₁₈ (4,6 x 250 mm, Waters), nas condições descritas na Tabela 1 para a construção da curva de calibração.

As amostras provenientes de águas contaminadas com atrazina também foram aplicadas nas mesmas condições do padrão cromatográfico.

6.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a significância das diferenças entre as médias determinada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o programa MSTACT.

Tabela 1 – Condições cromatográficas para detecção de atrazina em amostras de água

Condições	
Temperatura	40 °C
Coluna	C ₁₈ (4,6 x 250 mm, Waters)
Detector	PDA
Comprimentos de onda	200, 220, 230 e 240 nm
Fluxo	1 mL/min
Volume de injeção	50 µL
Tempo de corrida	18 minutos

7. RESULTADOS

7.1 Avaliação do desenvolvimento de *M. oleifera*

Ao final dos 10 dias de experimento pôde-se observar que as plantas controle apresentaram um ganho de biomassa com média de 200,9% em relação ao peso inicial. Já as plantas tratadas com atrazina na concentração de 0,2 mg/L apresentaram um ganho de massa, de 8,1% ao longo do experimento. As demais plantas tratadas com atrazina nas concentrações de 2 e 20 mg/L, apresentaram perda de massa ao longo dos 10 dias de experimento. Além disso, todas as plantas tratadas com atrazina apresentaram sinais de fitotoxicidade (necroses foliares, murchamento, clorose e diminuição de biomassa) que foram proporcionais a concentração de atrazina administrada.

Assim, apenas duas plantas tratadas com atrazina na dose de 2 mg/L (que não foram consideradas para análise estatística) e nenhuma planta tratada na concentração de 20 mg/L sobreviveram até o final do experimento (Tabela 2).

Em virtude da não sobrevivência das plantas tratadas com atrazina até o final dos dez dias de experimento, resolveu-se realizar um novo experimento, desta vez tratando as plantas com atrazina na concentração de 1 mg/L e, avaliando-se o ganho de biomassa por um período de 2, 5 e 10 dias (Tabela 3). Foi observado que as plantas conseguiram sobreviver até o final do experimento, entretanto, ainda apresentaram ao final dos 10 dias de experimento, perda de biomassa em torno de 20% e sinais de fitotoxicidade.

Outro parâmetro avaliado ao final dos 10 dias de experimento foi a relação parte aérea/raiz das plantas tratadas com atrazina (Tabela 4). Com relação a esse parâmetro, não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais e o grupo controle.

Tabela 2. Ganho de biomassa de plantas de *Moringa oleifera* tratadas com atrazina no período de 10 dias

Tratamento (mgATZ/L)	Ganho de biomassa (%)
Controle*	200,9 ± 30,6 ^a
0,2	8,1 ± 3,8 ^b
2,0	-
20,0	-

*Controle: Água destilada

Tabela 3. Ganho de biomassa de plantas de *Moringa oleifera* tratadas com atrazina (1 mg/L) durante o período de 2, 5 e 10 dias

Tratamento (mgATZ/L)	Tempo (dias)	Ganho de biomassa (%)
Controle*	10	173,9 ± 11,6
1,0	2	19,0 ± 1,8
1,0	5	21,2 ± 8,6
1,0	10	- 20,0 ± 8,0

*Controle: Água destilada

Tabela 4. Relação de massa parte aérea/Raiz de plantas de *Moringa oleifera* tratadas com atrazina

Tratamento (mgATZ/L)	Parte aérea/raiz
Controle*	1,25 ± 0,3 ^a
0,2	1,34 ± 0,3 ^a
1,0	1,29 ± 0,2 ^a
2,0	1,30 ± 0,3 ^a
20,0	-

*Controle: Água destilada

7.2 Caracterização bioquímica dos extratos

7.2.1 Quantificação de proteínas

Os teores de proteínas solúveis encontrados para as folhas de plantas tratadas com atrazina nas concentrações de 0,2, 1,0 e 2,0 mg/L, por 10 dias, foram de 0,757, 4,210 e 1,274 mgP/mL, respectivamente. As folhas de plantas controle apresentaram uma concentração de proteína de 0,875 mgP/mL. Já nos extratos de raízes de plantas tratadas com atrazina nas concentrações de 0,2, 1,0 e 2 mg/L as concentrações de proteína encontrados foram 0,269, 1,345 e 0,255 mgP/mL, respectivamente. Em plantas controle a concentração foi 0,195 mgP/mL (Tabela 5). Os dados para as plantas de moringa tratadas com atrazina na dose de 20 mg/L não foram calculados tendo em vista que as plantas não sobreviveram até o final do experimento.

Tabela 5. Concentração de proteínas solúveis (mg/mL) em raízes e folhas de plantas de *Moringa oleifera* tratadas com atrazina nas concentrações de 0,2, 1, 2 e 20 mg/L por um período de 10 dias

Tratamento (mgATZ/mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	
	Folhas	Raízes
Controle*	0,875 ± 0,02	0,195 ± 0,00
0,2	0,757 ± 0,03	0,269 ± 0,03
1,0	4,210 ± 0,07	1,345 ± 0,06
2,0	1,274 ± 0,10	0,255 ± 0,03
20,0	-	-

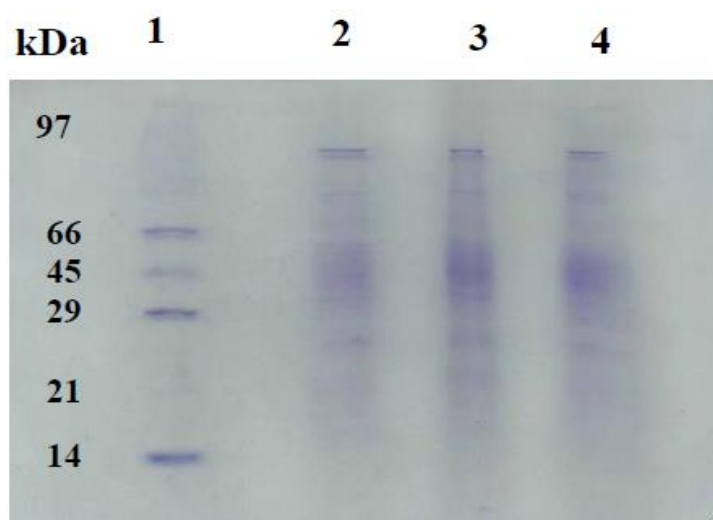
*Controle: Água destilada

7.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As Figuras 4 e 5 mostram o perfil eletroforético dos extratos totais obtidos a partir da farinha de folhas e raízes de plantas tratadas e não tratadas com atrazina no período de 10 dias, respectivamente. Pode-se observar que em relação as folhas, não há diferença no perfil de bandas proteicas. Porém, analisando a eletroforese dos extratos de raízes, verifica-se que há uma diferença no perfil de bandas dos extratos de plantas tratadas com atrazina em relação ao controle. Particularmente, as raízes tratadas com atrazina na dose de 0,2 mg/L apresentam perfil com uma banda proeminente de massa molecular abaixo de 29 kDa. Já no tratamento de 2 mg/L pode-se também observar uma intensidade de bandas maior do que o existente no controle.

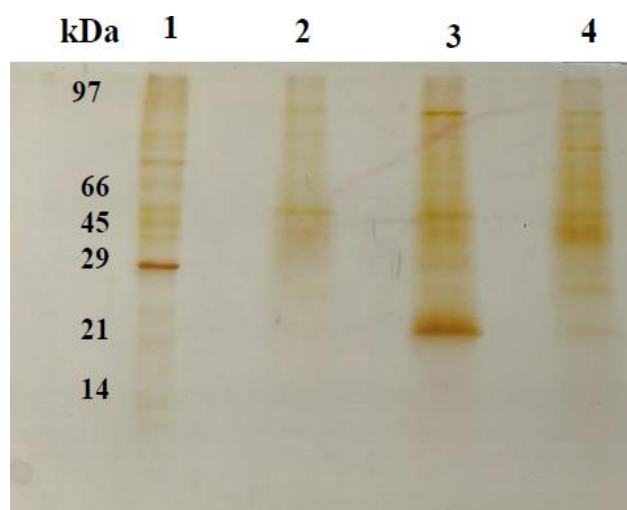
As Figuras 6 e 7 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de folhas e raízes de plantas controle e plantas tratadas com 1 mg/L de atrazina nos tempos de 2, 5 e 10 dias. Pode-se observar que não houve diferença aparente entre os perfis de proteínas para os diferentes tratamentos com atrazina tanto quando se considera os extratos de folhas como os de raízes.

Figura 4. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE dos extratos de folhas de plantas de *M. oleifera* tratadas com soluções de atrazina por um período de 10 dias.



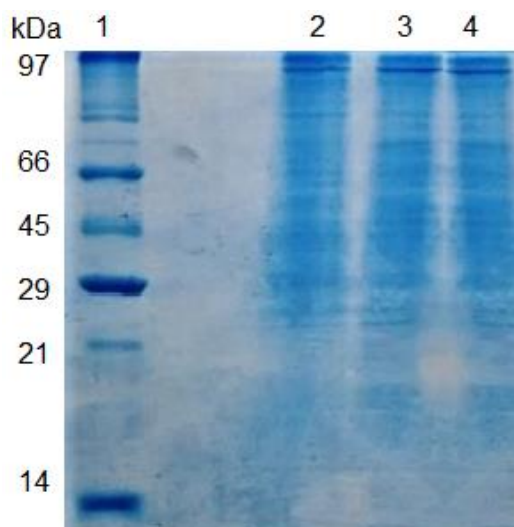
Raia 1 – Marcadores de massa molecular; Raia 2 – Extrato proteico de folhas de *M. oleifera* controle; Raia 3 - Extrato proteico de folhas de *M. oleifera* tratadas com atrazina na dose de 0,2 mg/L; Raia 4 - Extrato proteico de folhas de *M. oleifera* tratadas com atrazina na dose de 2 mg/L. Foram aplicados 5 ug de proteína por poço. As bandas proteicas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue G-250.

Figura 5. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE dos extratos de raízes de *M. oleifera* tratadas com soluções de atrazina em várias concentrações por um período de 10 dias.



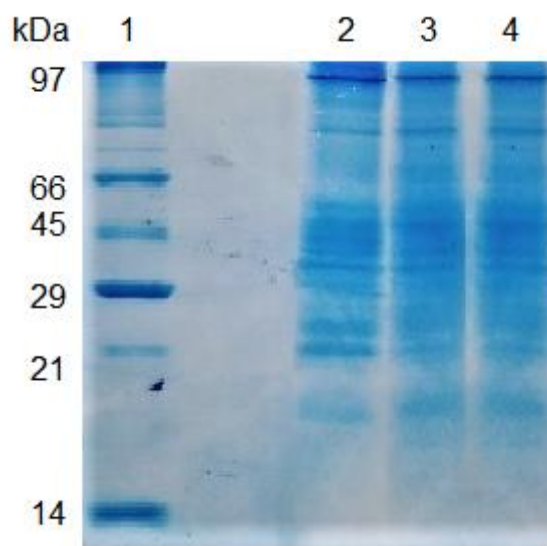
Raia 1 – Marcadores de massa molecular; Raia 2 – Extrato proteico de raízes de *M. oleifera* controle; Raia 3 - Extrato proteico de raízes de *M. oleifera* tratadas com atrazina na dose de 0,2 mg/L; Raia 4 - Extrato proteico de raízes de *M. oleifera* tratadas com atrazina na dose de 2 mg/L. Foram aplicados 5 ug de proteína por poço. As bandas proteicas foram reveladas pela prata.

Figura 6. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE dos extratos foliares de *M. oleifera* no tratamento de 1 mg/L de atrazina, em diversos tempos.



Raia 1 – Marcadores de massa molecular; Raia 2 – Extrato proteico de folhas de *M. oleifera* tratadas no tempo de 48 horas; Raia 3 - Extrato proteico de folhas de *M. oleifera* tratadas no tempo de 5 dias; Raia 4 - Extrato proteico de folhas de *M. oleifera* tratadas no tempo de 10 dias. Foram aplicados 7 ug de proteína por poço. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

Figura 7. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE dos extratos radiculares de *M. oleifera* no tratamento de 1 mg/L de atrazina, em diversos tempos.



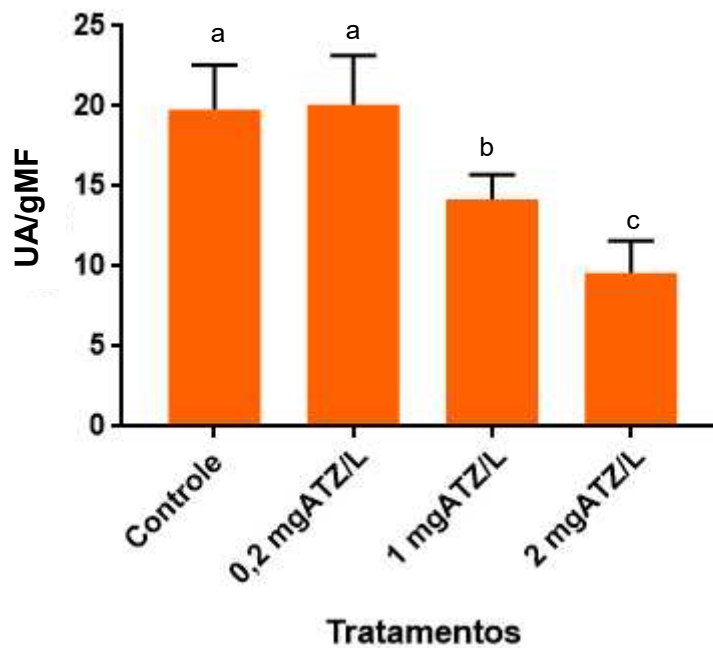
Raia 1 – Marcadores de massa molecular; Raia 2 – Extrato proteico de raízes de *M. oleifera* tratadas no tempo de 48 horas; Raia 3 - Extrato proteico de raízes de *M. oleifera* tratadas no tempo de 5 dias; Raia 4 - Extrato proteico de raízes de *M. oleifera* tratadas no tempo de 10 dias. Foram aplicados 7 ug de proteína por poço. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

7.2.3 Ensaio enzimáticos

7.2.3.1 Atividade catalásica

A Figura 8 mostra os resultados dos ensaios de atividade catalásica (CAT) dos extratos de raízes de *M. oleifera* tratados ou não com atrazina. Pode-se observar que as raízes de plantas tratadas na concentração de 2 mg/L foram as que apresentaram menor atividade catalásica ($9,6 \pm 1,1$ UA/gMF) quando comparadas às plantas controle ($19,8 \pm 1,4$ UA/gMF), tratadas na concentração de 0,2 mg/L ($20,1 \pm 1,8$ UA/gMF) e de 1 mg/L ($14,8 \pm 0,7$ UA/gMF). Os dados referentes a atividade catalásica de folhas não foram mostrados pois este tecido não apresentou atividade catalásica.

Figura 8. Atividade catalásica do tecido radicular de plantas de *Moringa oleifera* tratadas com atrazina em diferentes concentrações por um período de 10 dias.



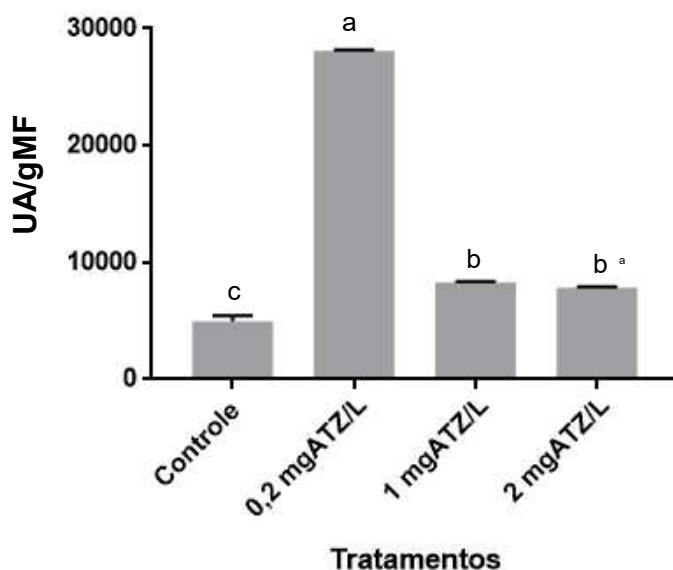
A atividade catalásica está expressa em Unidades de Atividade (UA) por grama de massa fresca da raiz (gMF). Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

7.2.3.2 Atividade peroxidásica guaiacol dependente

As Figura 9 e 10 mostram as atividades peroxidásicas (POX) de folhas e raízes de plantas de *M. oleifera* controle e tratadas com atrazina nas concentrações de 0,2, 1 e 2 mg/L. Pode-se observar que, de maneira geral, a atividade peroxidásica nas raízes foi consideravelmente superior àquela encontrada nas folhas. Em se tratando de raízes, aquelas tratadas com atrazina na concentração de 0,2 mg/L apresentaram o maior teor de peroxidase (28.080 ± 55 UA/gMF). Já as raízes tratadas na concentração de 1 e 2 mg/L apresentaram teores 8301 ± 27 e 7830 ± 11 UA/gMF. Quanto as plantas controle estas apresentaram 4964 UA/gMF.

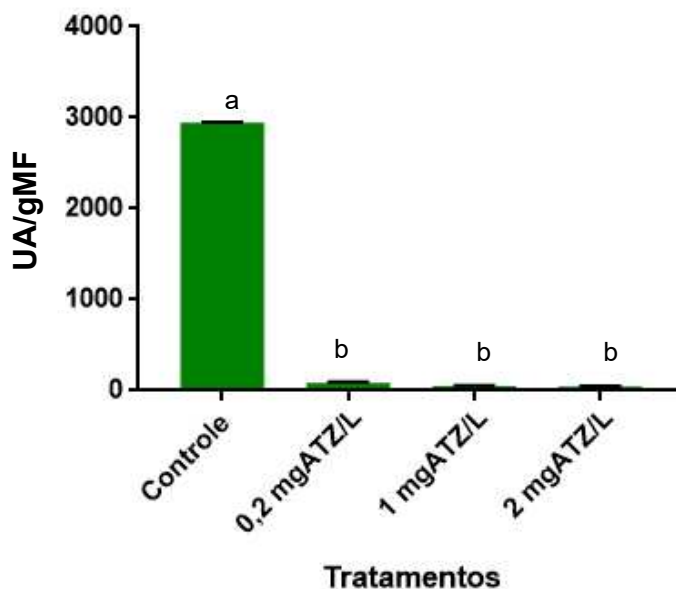
Com relação as folhas, observou-se que o tratamento das plantas com atrazina causou uma diminuição nos teores de peroxidase, uma vez que em plantas controle (cultivadas em água destilada e solução de *Hoagland*), a atividade peroxidásica foi de $2948,4 \pm 27$ UA/gMF e nos tratamentos com atrazina na concentração de 0,2 mg/L essa atividade foi de $88,5 \pm 5,3$ UA/gMF enquanto que nas concentrações de 1 e 2 mg/L as atividades foram de $51,69 \pm 2,3$ e $48,6 \pm 2,9$ UA/gMF, respectivamente.

Figura 9. Atividade peroxidásica (POX) do tecido radicular de plantas de *M. oleifera* tratadas com atrazina em diferentes concentrações por um período de 10 dias.



A atividade peroxidásica (POX) está expressa em Unidades de Atividade (UA) por grama de massa fresca da raiz (gMF). Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 10. Atividade peroxidásica (POX) do tecido foliar de *M. oleifera* tratada com atrazina em diferentes concentrações por um período de 10 dias.

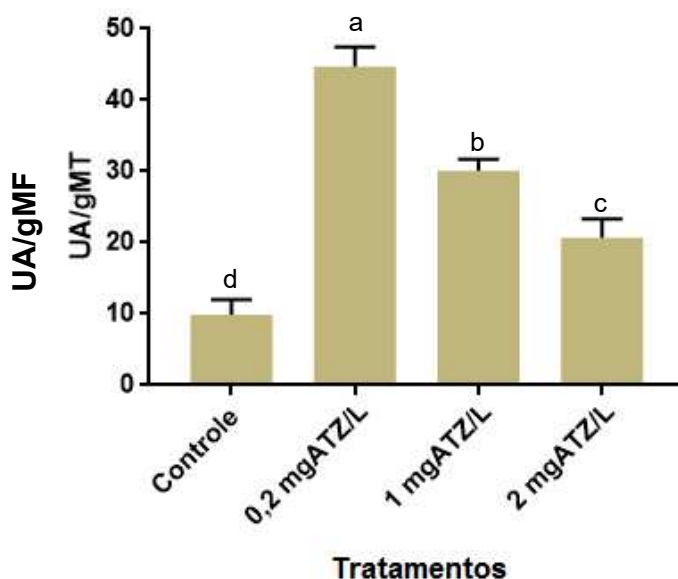


A atividade peroxidásica (POX) está expressa em Unidades de Atividade (UA) por grama de massa fresca da folha (gMF). Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

7.2.3.3 Atividade de ascorbato peroxidase

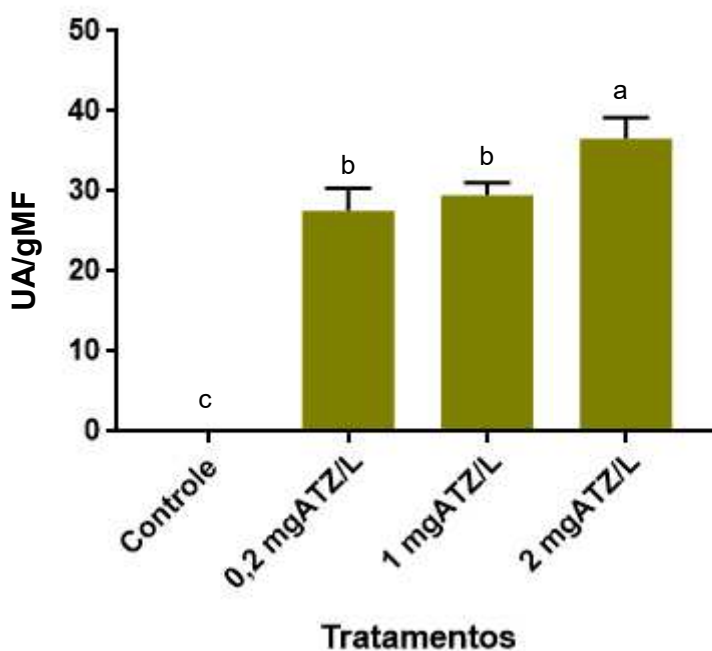
A atividade de ascorbato peroxidase (APX) observada para folhas e raízes de plantas tratadas e não tratadas com atrazina está mostrada nas Figuras 11 e 12. Tanto folhas como as raízes de plantas tratadas com atrazina apresentaram teores superiores às plantas controle. Em relação as raízes, foi observado que o tratamento de 0,2 mg/L apresentou um teor de $44,7 \pm 1,9$ UA/gMF enquanto que o de 1 e 2 mg/L de atrazina apresentaram teores $28,9 \pm 0,5$ e $20,7 \pm 0,7$ UA/gMF, respectivamente. Já para as folhas aconteceu o oposto pois o tratamento com atrazina na dose de 2 mg/L foi o que apresentou o maior teor de APX ($36,6 \pm 1,9$ UA/gMF), seguido do tratamento com 1 mg/L ($29,3 \pm 0,6$ UA/gMF) e 0,2 mg/L ($27,6 \pm 1,3$ UA/gMF). Não foi detectada a presença de APX em folhas de plantas controle. Já nas raízes, o teor de APX encontrado foi de $9,9 \pm 0,6$ UA/gMF.

Figura 11. Atividade ascorbato peroxidásica (APX) do tecido radicular de *M. oleifera* tratada com atrazina em diferentes concentrações pelo período de 10 dias.



A atividade ascorbato peroxidásica (APX) está expressa em Unidades de Atividade (UA) por grama de massa fresca da raiz (gMF). Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 12. Atividade ascorbato peroxidásica (APX) do tecido foliar de *M. oleifera* tratada com diferentes concentrações de atrazina por um período de 10 dias.



A atividade ascorbato peroxidásica (APX) está expressa em Unidades de Atividade (UA) por grama de massa fresca da folha (gMF). Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

7.2.3.4 Atividade superóxido dismutase

Com relação a atividade de superóxido dismutase (SOD), foi observado que, aparentemente, as folhas e raízes de *M. oleifera* controle e tratadas com atrazina nas concentrações de 0,2, 1 e 2 mg/L não diferiram em relação aos teores dessa enzima. Entretanto, os resultados gerados não foram conclusivos em virtude dos altos desvios padrões e valores de coeficientes de variação observado. Posteriormente, esse ensaio será repetido.

7.2.3.5 Atividade lacásica

Não foi detectada atividade lacásica nem em tecidos (folhas e raízes) de plantas controle, nem naqueles de plantas tratadas com atrazina nas diferentes concentrações utilizadas.

7.3 Avaliação da capacidade de remediação de águas contaminadas com atrazina por plantas de *Moringa oleifera*

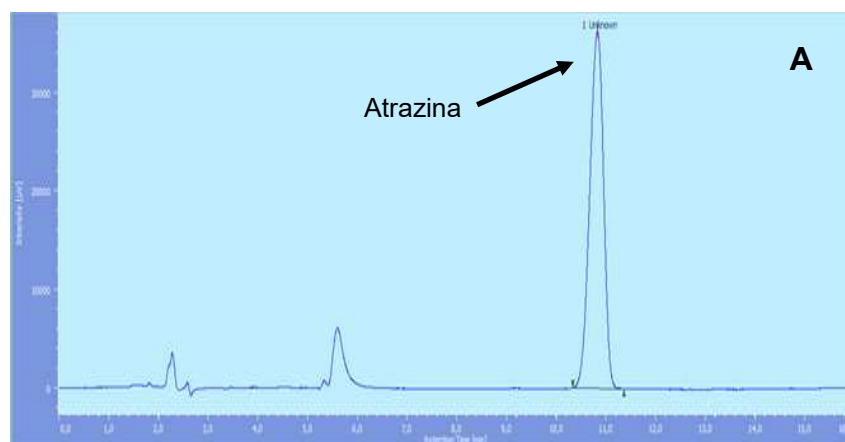
Para a avaliação da capacidade de fitorremediação de *Moringa oleifera*, amostras de água foram artificialmente contaminadas com 1 mg/L de atrazina, que foi a maior concentração testada em que as plantas tiveram um bom crescimento. Em seguida, plantas de moringa foram postas em contato com essas soluções por um período de até 10 dias. Ao final do experimento, as plantas foram retiradas do meio hidropônico e alíquotas de água de cada amostra utilizadas para a avaliação da percentagem de remoção de atrazina pelas plantas. Entretanto, alíquotas de água após o contato das plantas por um período de 48 h também foram obtidas para análise. Essa quantificação foi realizada através do uso de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

A Figura 13 mostra um exemplo do perfil cromatográfico obtido após injeção do padrão cromatográfico de atrazina na concentração de 2 mg/L (Sigma Aldrich) utilizando as condições cromatográficas descritas anteriormente na Tabela 1. O tempo de retenção (TR) observado para a atrazina nas condições empregadas foi de 10,8 minutos. Após a definição do TR foi construída uma curva de calibração utilizando atrazina nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,0 e 2,0 mg/L.

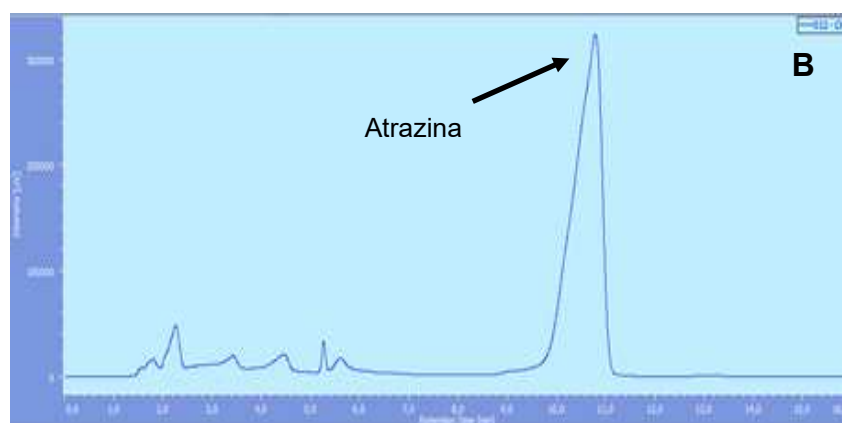
A Figura 14 mostra a curva de calibração obtida. Pode-se observar que a curva apresentou um R^2 de 0,999, indicando que a faixa de concentração de atrazina utilizada está dentro da faixa de linearidade do método.

A extração de atrazina das amostras de água foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 5.6.1. Foi verificado que a técnica de extração em fase sólida empregada apresentou uma taxa de recuperação de 65%. De posse desse resultado, a próxima etapa foi a extração de atrazina das amostras de água e sua posterior quantificação. Foi observado que os teores de atrazina na água após o contato com plantas de moringa por 48 h foram reduzidos em 47%. Já após 10 dias de contato, as plantas de moringa foram capazes de reduzir em 89% os teores de atrazina da água (Figura 15).

Figura 13 – Perfil cromatográfico da atrazina padrão e da amostra de água em sistema de HPLC.



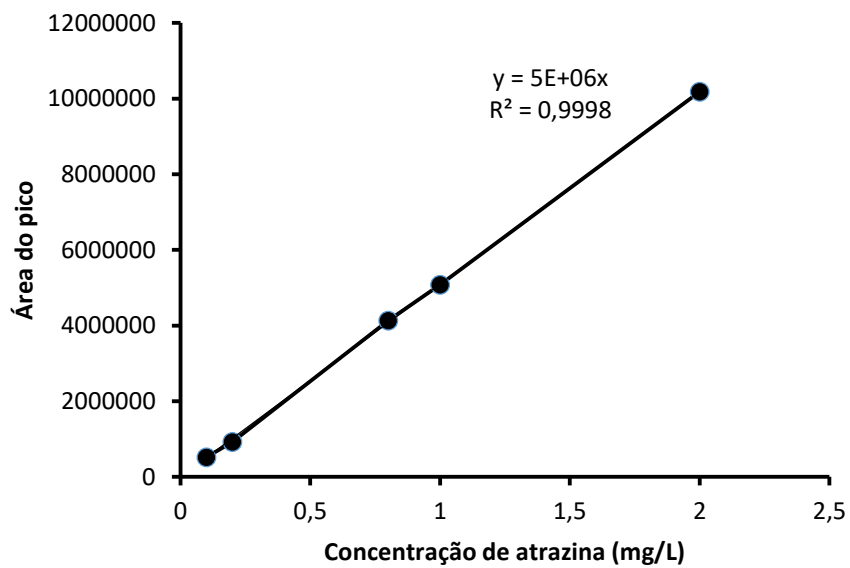
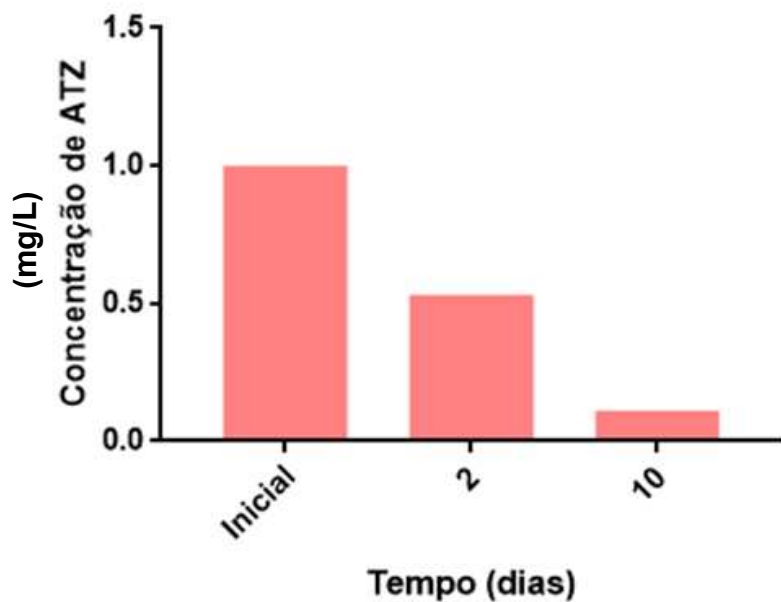
Tempo (min)



Tempo (min)

(A) Padrão cromatográfico aplicado na concentração de 2 mg/L. (B) Amostra de meio hidropônico após o processo de extração de atrazina em fase sólida; Coluna utilizada: C₁₈ (4,6 x 250 mm, Waters); temperatura de 40 °C; volume de aplicação 50 µL; detector PDA; Comprimento de onda de 220 nm; fluxo de 1 mL/min

Figura 14. Curva de calibração da atrazina

Figura 15. Teores de atrazina antes e após contato com *M. oleifera*, em diferentes tempos.

8. DISCUSSÃO

Enquanto a agricultura brasileira tem crescido a cada ano, a atrazina (ATZ) tem se mantido como um dos pesticidas mais utilizados para o controle de plantas daninhas de folhas largas e gramíneas (KIELY *et al.*, 2004; GOODIS, 2016) e, por isso, é facilmente encontrada nos solos e águas do Brasil e do mundo em concentrações bem acima dos níveis aceitáveis (0,5 µg/L) (CONAMA, 2008). Esse composto e seus derivados são considerados agentes tóxicos de classe III, podendo-se apontar vários estudos que comprovam os seus efeitos deletérios sobre diversos organismos.

Abarikwu e Farombi (2015) estudaram a citotoxicidade da atrazina em humanos e verificaram que concentrações mínimas desse composto (5-50 µg/mL) são capazes de diminuir a viabilidade e ocasionar a morte celular de neuroblastomas (SH-SY5Y), devido ao aumento da atividade das Caspases-3, uma molécula crucial no sistema de morte celular programada, podendo ocasionar e/ou agravar estados de desordem neurodegenerativa humana. Além disso, a atrazina pode atuar como disruptor endócrino (PARK *et al.*, 2016) e também causando efeitos crônicos nos sistemas nervoso central e imunológico (SUN *et al.*, 2016). O contato de mulheres em período de gestação com essa substância pode ocasionar parto prematuro e peso potencialmente abaixo do normal de bebês assim como diversas outras complicações congênitas (STAYNER *et al.*, 2017; MIGEOT *et al.*, 2013). Além dos danos à saúde humana, a atrazina é uma ameaça potencial para os ecossistemas e equilíbrio ambiental (SILVEYRA *et al.*, 2017; RUSSART; RHEN, 2016).

A fitorremediação ganhou impulso nas últimas décadas por ser uma tecnologia verde de custo reduzido, quando comparada aos demais métodos de descontaminação ambiental, e apresentar bons resultados, enquanto ainda oferece a opção de tratamento natural *in situ*. Sua capacidade de múltiplos objetivos também é vantajosa, pelo fato de poder-se fitorremediar mais de um poluente no mesmo local, bem como a atratividade para o público leigo, em função de ser vista como “tecnologia verde”. Vários estudos descrevem a eficácia da fitorremediação de diversos compostos (SYRANIDOU *et al.*, 2017; YILDIRIM; SASMAZ, 2016; LEGUIZAMO; GÓMEZ; SARMIENTO, 2016). Já foram descritas na literatura algumas espécies vegetais que são capazes de

promover a fitorremediação do herbicida atrazina de forma satisfatória (IBRAHIM *et al.*, 2013; MERINI *et al.*, 2009; MOORE, LOCKE e KRÖGER, 2016). Entretanto, apesar dos avanços, ainda é considerado insuficiente o número de espécies vegetais com esse potencial. Isso é válido não somente para a atrazina mas também para outros compostos orgânicos e metais pesados prejudiciais ao meio ambiente. Além disso, o fato de uma espécie vegetal ser capaz de degradar um composto em determinada localidade, não garante que ela seja eficaz em outros ambientes visto que, como mencionado anteriormente, uma série de fatores influenciam nesse processo. Assim, estudos de prospecção por espécies vegetais fitorremediadoras tem crescido bastante nos últimos anos.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de *M. oleifera* para a fitorremediação de atrazina, comum em solos e águas de várias regiões do mundo, incluindo o Brasil e ainda o estado do Ceará. Diversas características/propriedades dessa espécie vegetal a creditam como uma espécie de grande potencial de aplicação com esse propósito. Vale ressaltar, sua adaptabilidade às condições edafoclimáticas do Brasil, em especial do Ceará, sua alta taxa de crescimento e a resistência a uma série de fatores bióticos e abióticos.

Para tal finalidade, foi necessário estabelecer um protocolo de germinação e crescimento de plantas de *M. oleifera* em casa de vegetação. O processo de germinação dessa planta foi rápido (5-7 dias) e simples, contando apenas com as etapas de desinfecção das sementes com hipoclorito de sódio e quebra de dormência com água destilada, por uma hora. Nessas condições foi obtida uma taxa de germinação bastante elevada de cerca de 85%. O período de aclimação de 3 dias, em casa de vegetação, permitiu às plantas crescerem um pouco mais, ficando mais aptas ao estresse induzido pelo contato com atrazina, posteriormente. O plantio hidropônico foi escolhido nesse trabalho por se tratar a água de um meio menos complexo, em que a atrazina estaria mais disponível para a captação pela planta, o que facilitaria uma posterior extração e quantificação dos teores de atrazina residual. Além disso, o tecido radicular de *M. oleifera* é muito frágil, sendo difícil, quando em meio sólido, a sua obtenção, necessária para a realização das análises bioquímicas.

Inicialmente as concentrações do herbicida atrazina testadas foram 0,2, 2 e 20 mg/L). Notou-se que as doses de 2 e 20 mg/L de atrazina são excessivas e

incompatíveis com o nível de resistência da espécie, pois todas as plantas morreram antes do término do experimento, com exceção de 2 indivíduos submetidos à concentração de 2 mg/L. Essas duas plantas não foram, contudo, consideradas para uma análise estatística, pois não seriam dados confiáveis, visto que essas eram visivelmente resistentes ao herbicida, por ainda apresentarem, já no término do experimento, folhagens robustas e sem sinal de clorose ou murchamento, enquanto as demais não haviam sobrevivido. Mesmo as plantas submetidas à concentração de 0,2 mg/L, ainda que em comparação com as demais apresentassem melhor aspecto fisiológico, ainda foram evidentes sinais de clorose e murchamento, que são efeitos conhecidos de estresse oxidativo sofrido por plantas, uma vez que, com a acumulação de ROS, as paredes celulares sofrem danos permanentes, causando a necrose e morte celular vegetal.

Posteriormente, resolveu-se testar a dose de 1 mg/L, por ser uma concentração intermediária às de 0,2 e 2 mg/L testadas. Isso se deu por uma busca de uma maior concentração final detectável para as posteriores análises com HPLC. Com esta concentração, embora as plantas tenham apresentado uma porcentagem de ganho de massa menor que com a de 0,2 mg/L, obteve-se um resultado promissor, uma vez que todas as plantas sobreviveram, embora também com sinais de clorose e murchamento. Determinou-se, então, essa concentração para o prosseguimento do trabalho.

Esse resultado indica que, aparentemente, as plantas de *M. oleifera* não são resistentes ao contato com atrazina, nas concentrações testadas. Contudo, vale ressaltar que essas concentrações utilizadas no experimento (mg/L) foram em níveis muito elevados (2000 vezes maior), quando comparados aos encontrados em ambientes contaminados, que são na escala de µg/L.

Com a concentração de 1 mg/L de atrazina foi feita a repetição do experimento com diferentes períodos de exposição ao herbicida (2, 5 e 10 dias), para avaliar se havia alguma diferença em relação ao perfil proteico e à remediação do herbicida do meio de crescimento.

O método de extração empregado foi realizado utilizando os tampões apropriados a cada tipo de ensaio enzimático realizado. Peroxidases (POX) têm em sua maioria atividade ótima em tampão acetato de sódio, pH 5,2 (URBANEK *et al.*, 1991), enquanto que as demais enzimas testadas (CAT, APX, SOD e

lacase) têm melhor desempenho em tampão fosfato de potássio (HAVIR; McHALE, 1987; PEIXOTO *et al.*, 1999; ROSSUM *et al.*, 1997; MANOLE *et al.*; 2008).

Na obtenção dos extratos brutos de folhas e raízes, os melhores teores proteicos obtidos foram, respectivamente, de 4,21 e 1,345 mg a cada grama de farinha dos tecidos vegetais, correspondendo ao tratamento de 1 mg/L de atrazina, que foi a maior concentração compatível com a sobrevivência das plantas, e, portanto, induziu um maior estresse a estas que a concentração de 0,2 mg/L.

Analisando-se a eletroforese dos extratos foliares não há diferença no perfil de bandas proteicas para nenhum dos tratamentos. Entretanto, em relação aos extratos radiculares, observa-se uma diferença clara no perfil de bandas dos extratos de plantas tratadas com atrazina em relação ao controle. Essa diferença se dá de forma mais evidente no extrato de raízes tratadas com atrazina na dose de 0,2 mg/L, o qual apresenta uma banda proeminente de massa molecular abaixo de 29 kDa, concomitantemente a uma intensidade de bandas de maior massa molecular do que o existente no controle. No tratamento de 2 mg/L pode-se também observar essas características, mas de forma mais discreta. Esse resultado pode ser decorrente de alterações no perfil de expressão de proteínas em decorrência do estresse ocasionado pela atrazina. Ao decidir-se prosseguir com a concentração de 1 mg/L de atrazina viu-se a necessidade de realização de uma nova eletroforese. Desta vez visou-se analisar as diferenças em relação aos diferentes períodos de exposição testados. Para essas eletroforeses, a fim de obter-se um maior número de spots proteicos, reprodutibilidade e maior resolução dos géis, utilizou-se a precipitação por TCA (DAMERVAL *et al.*, 1986) previamente ao preparo da amostra. Os perfis proteicos de folhas (Figura 6) e raízes (Figura 7) não apresentaram diferença em relação ao tempo. Observa-se nesse último, contudo, o aparecimento da mesma banda de baixa massa molecular presente no extrato radicular de plantas tratadas nas demais concentrações de atrazina, embora não de forma tão proeminente quanto nos extratos de plantas tratadas com 0,2 mg/L de atrazina.

No que diz respeito à atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, vê-se claramente uma alteração visível nos níveis de catalases, ascorbato peroxidases (APX) e peroxidases dependente de guaiacol (POX) de

plantas tratadas com o herbicida atrazina em relação a plantas controle, principalmente nas raízes, devido ao fato de esse ser o tecido que tem contato primário com o contaminante presente no meio. Isso demonstra o desencadeamento do sistema de defesa da planta em resposta ao estresse induzido por esse composto. Esse resultado é respaldado por outros estudos, que comprovam variações dos processos fisiológicos de diversas espécies de plantas em resposta a estresses induzidos por esse herbicida, como no caso do milho (*Pennisetum americanum*) (JIANG *et al.*, 2016), arroz (*Oryza sativa*) (ZHANG, 2014), milho (*Zea mays*) (LI *et al.*, 2012) e nas espécies de algas *Chlorella vulgaris* (QIAN *et al.*, 2009) e *Scenedesmus obliquus* (MOFEED e MOSLEH, 2013).

Os resultados mais significativos foram em relação às enzimas APX e POX. A primeira teve um aumento notável na sua atividade nas plantas tratadas com atrazina em relação às plantas controle, tanto nos tecidos radiculares (217,5% maior, em média) quanto nos foliares – havendo, neste último, o aparecimento da atividade nos tratamentos, o que não ocorria no controle. Já a atividade da segunda, enquanto teve um crescimento marcante nos tecidos radiculares, especialmente em plantas tratadas com a dose de 0,2 mg/L de atrazina (465,7% maior), apresentou um decréscimo expressivo nos tecidos foliares (aproximadamente de 97,9% menor), em relação às plantas controle.

Em casos de estresses oxidativos pode haver a migração de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio – que é fundamental para a atividade de peroxidases – e consequente evasão dessas enzimas, para o local de estresse primário (NASCIMENTO; BARRIGOSSI, 2014), além do possível aumento da expressão dessas enzimas em tecidos que apresentam elevados níveis dessas ROS. Isso explicaria essa discrepância de atividade das folhas em relação às raízes.

O elevado teor de peroxidases é um resultado bastante promissor para esse projeto, dado que pode indicar uma base notável para a possível fitorremediação de atrazina; uma vez que essas enzimas, juntamente com as lacases, são as que mais atuam na degradação de contaminantes orgânicos (FANG *et al.*, 2014; DUBROVSKAYA *et al.*, 2017).

O próximo passo do trabalho foi verificar se o nível de atrazina estava sendo reduzido ao longo do tempo de contato da planta com o meio. Para tal

finalidade, foi necessário inicialmente a otimização de um protocolo de extração de atrazina das amostras de água. O método escolhido foi o de extração em fase sólida, através do uso de cartuchos C₁₈. O objetivo era a exclusão de sais da solução de Hoagland e possíveis compostos exsudados pelas plantas ao longo do desenvolvimento, para a obtenção de atrazina. Esse método de extração empregado apresentou uma taxa de recuperação de 65%. Esse percentual é considerado baixo quando comparado com outros métodos empregados para a detecção de pesticidas. Para atrazina, por exemplo, as taxas de recuperação observadas variam de 90 a 100% (IBRAHIM *et al.*, 2013). Posteriormente, o método de extração empregado nesse trabalho será otimizado a fim de aumentar o percentual de recuperação da atrazina.

Após o processo de extração, as amostras obtidas tanto do tratamento com atrazina pelo período de 2 dias quanto de 10 dias foram analisadas quanto aos teores de atrazina. Foi observado que já com 48 h de contato com a atrazina, as plantas de moringa foram capazes de reduzir em 47% o teor desse herbicida na água em relação aos teores do início do experimento. Já no período de 10 dias, esse percentual foi reduzido numa taxa de 89%.

Há alguns relatos na literatura de plantas que apresentaram a capacidade de degradar compostos orgânicos deletérios ao meio ambiente. Com relação a degradação de atrazina especificamente há também vários estudos. Por exemplo, foi mostrado por Chang, Lee e Je (2005), que algumas espécies de choupos são capazes de captar, hidrolisar e desalquilar a atrazina a metabólitos menos tóxicos. Um trabalho mais antigo mostrou que a espécie *Leucophyllum langmaniae* foi capaz de reduzir em 35% os teores de atrazina no solo, porém, em um período de mais de 60 dias (KRUGER *et al.*, 1997). Já as espécies *Iris pseudacorus*, *Lythrum salicaria* and *Acorus calamus*, reduziram os teores de atrazina em 75,6, 65,5 e 61,8%, respectivamente, em sistema de hidroponia semelhante ao empregado nesse estudo. Essas taxas de redução da atrazina em água ocorreram dentro de um período de 20 dias (WANG *et al.*, 2012). Assim, de maneira geral, a comparação dos dados obtidos nesse trabalho com os demais encontrados na literatura (Tabela 6) mostra o grande potencial da *M. oleifera* como uma planta fitorremediadora de atrazina, devendo ser realizado estudos posteriores para seu potencial de degradação de outras classes de compostos orgânicos.

Tabela 6. Comparação da taxa de degradação de atrazina por *M. oleifera* em relação a outras espécies em relação ao tempo de experimento.

Espécie	Taxa de degradação (%)	Tempo do experimento (dias)
<i>Moringa oleifera</i>	89	10
<i>Leucophyllum langmaniae</i> (KRUGER <i>et al.</i> , 1997)	35	60
<i>Iris pseudacorus</i> (WANG <i>et al.</i> , 2012)	75,6	20
<i>Lythrum salicaria</i> (WANG <i>et al.</i> , 2012)	65,5	20
<i>Acorus calamus</i> (WANG <i>et al.</i> , 2012)	61,8	20

9. CONCLUSÃO

O tratamento de plantas de *M. oleifera* com atrazina mostrou que, apesar da alteração nos teores de algumas enzimas relacionadas ao estresse oxidativo como, por exemplo, o aumento nos teores de peroxidases – enzimas reconhecidamente envolvidas na defesa da planta contra esses estresses, bem como na degradação de contaminantes orgânicos –, aparentemente, nas concentrações testadas, esta planta não é resistente a esse herbicida. Os dados que corroboram com essa observação são: (1) a perda de biomassa das plantas ao longo dos dias, (2) os sinais de fitotoxicidade, observados ao longo do experimento.

Apesar da aparente susceptibilidade, as plantas de moringa já nos dois primeiros dias de experimento foram capazes de reduzir em 47% os teores de atrazina em relação ao início do experimento. Já com 10 dias essa redução foi de 89%.

Dessa forma, os dados obtidos mostraram que plantas de *M. oleifera* apresentam propriedades importantes para o emprego em estratégias fitorremediação do herbicida atrazina, revelando o potencial biotecnológico dessa espécie no contexto ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARIKWU, S.O.; FAROMBI, E.O. Atrazine induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3-dependent pathway. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 118, p. 90–98, 2015.

ADELAJA, O.A.; AMOO, I.A.; ADERIBIGBE, A.D. Biosorption of Lead (II) ions from aqueous solution using *Moringa oleifera* pods. *Archives of Applied Science Research*, v. 3, p. 50-60, 2011.

ARAGÃO, R.M. Mecanismos cinéticos de inibição da absorção de nitrato em raízes de feijão caupi expostas à salinidade. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Solos e Nutrição de Plantas) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ARAÚJO-MOURA, A.A.C.; CAFFARO FILHO, R.A. Panorama do gerenciamento de áreas contaminadas no Brasil após a resolução CONAMA 420/09. *Revista Águas Subterrâneas*, v. 29, p. 202-212, 2015.

BARAC, T.; TAGHAVI, S.; BORREMANS, B.; PROVOOST, A.; OEYEN, L.; COLPAERT, J.V.; VANGRONSVELD J.; VAN DER LELIE, D. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology*, v. 22, n. 5, p. 583-588, 2004.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BELDEN, J.B.; COATS, J.R. Effect of grasses on herbicide fate in the soil column: infiltration of runoff, movement and degradation. *Environmental Toxicology Chemistry*, v. 23, p. 2251- 2258, 2004.

BIRADAR, D.P.; RAYBURN, A.L. Chromosomal damage induced by herbicide contamination at concentrations observed in public water supplies. *Journal of Environmental Quality*, v. 24, p. 1222-1225, 1995.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v. 8, p. 93-99, 1987.

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. 722, p. 248-254, 1976.

CHANG S.W; LEE S.J.; JE C. H. Phytoremediation of atrazine by poplar trees: toxicity, uptake, and transformation. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 40(6), p. 801-811, 2005.

CHIRAKKARA, R. A.; CAMESELLE, C.; REDDY, K. R. Assessing the applicability of phytoremediation of soils with mixed organic and heavy metal

contaminants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v 15, p 299–326, 2016.

COBAN, A.; FILIPOV, N.M. Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *Journal of Neurochemistry*, v. 100, p. 1177 – 1187, 2007.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). RESOLUÇÃO n° 396. Publicada no DOU n° 66, Seção 1, p. 64-68, 2008.

CRUVINIL, D.F.C. Avaliação da fitorremediação em solos submetidos à contaminação com metais. Dissertação (Mestrado) Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 79 f, 2009.

DAMERVAL, C.; MÉCHIN, V.; ZIVY, M. Total Protein Extraction with TCA-Acetone. *Plant Proteomics: Methods and Protocol. Methods in Molecular Biology*, v. 335, 1986.

DUBEY, D. K.; DORA, J.; KUMAR, A.; GULSAN, R. K. A multipurpose tree- *Moringa oleifera*. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, v. 12, p. 415-423, 2013.

DUBROVSKAYA, E.; POZDNYAKOVA, N.; GOLUBEV, S.; MURATOVA, A.; GRINEV, V.; BONDARENKOVA, A.; TURKOVSKAYA, O. Peroxidases from root exudates of *Medicago sativa* and *Sorghum bicolor*: Catalytic properties and involvement in PAH degradation. *Chemosphere*, v. 169, p. 224 – 232, 2017.

ECOAGRO. O Agronegócio no Brasil. São Paulo: 2012. Disponível em: <http://www.ecoagro.agr.br/agronegocio-brasil/>. Acesso em: 17 out, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – TRIGO (EMBRAPA - TRIGO). Principais herbicidas indicados para cultura de milho no sistema plantio direto e no preparo convencional do solo. Passo Fundo, RS: 2006. Documento online n° 61. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do61_13.htm. Acesso em: 05 nov, 2016.

FANG, H.; CAI, L; YANG, Y; JU, F; LI, X; YU, Y; ZHANG, T. Metagenomic analysis reveals potential biodegradation pathways of persistent pesticides in freshwater and marine sediments. *Science of the Total Environment*, v. 1, p. 470-471:983-92, 2014.

FILIPOV, N.M.; STEWART, M.A.; CARR, R.L.; SISTRUNK, S.C. Dopaminergic toxicity of the herbicide atrazine in rat striatal slices. *Toxicology*, v. 232, p. 68 – 78, 2007.

FOIDL, N.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In: *The Miracle Tree/The Multiple Attributes of Moringa*, Ed. Lowell J Fuglie, CTA. USA, 2001.

FORTIN, M., COUILLARD, C.M., PELLERIN, J., LEBEUF, M. Effects of salinity on sublethal toxicity of atrazine to mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae. *Marine Environmental Research*, v. 65, p. 158 – 170, 2008.

GAMA, A.F.; OLIVEIRA, A.H.B.; CAVALCANTE, R.M. Inventário de Agrotóxicos e Risco de Contaminação Química dos Recursos Hídricos no Semiárido Cearense. *Química Nova*, v. 36, n. 3, p. 462-467, 2013.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K.D.; TAUSCHER, B.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GHEBREMICHAEL, K.A.; GUNARATNA; K.R., HENRIKSSON, H.; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Research*, v. 39, p. 2338-2344, 2005.

GOODIS, M. Draft Ecological Risk Assessments: Atrazine, Simazine, and Propazine Registration Review. Environmental Protection Agency (EPA). 2016-13299.

GUPTA, A.; JOIA, J.; SOOD, A.; SOOD, R. SIDHU, C.; KAUR, G. Microbes as potential tool for remediation of heavy metals: A review. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, v. 8, p. 364-372, 2016.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, v. 84, p. 450-455, 1987.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agriculture, Experiment Station Circulation*, v. 347, p. 1–32, 1959.

HOUJUAN, X.; ZIWEI, Z.; HAIDONG, Y.; TAO, L.; LIANGLIANG, W.; SHIWEN, X.; SHU, L. Effects of atrazine and chlorpyrifos on cytochrome P450 in common carp liver. *Chemosphere*, v. 104, p. 244–250, 2014.

IBRAHIM, S.I.; LATEEF, M.F. ABDEL; KHALIFA, H.M.S.; MONEM, A.E. ABDEL. Phytoremediation of atrazine-contaminated soil using *Zea mays* (maize). *Annals of Agricultural Sciences*, v. 58 , p. 69–75, 2013.

JACQUES, M.T.; ÁVILA, D.S.; SOARES, A.T.G. Avaliação Toxicológica do Herbicida Atrazina e sua Formulação Comercial em *Caenorhabditis elegans*. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal do Pampa*, v. 6, n. 2, 2014.

JIANG, Z.; MA, B.; ERINLE, K.O.; CAO, B.; LIU, X.; YE, S.; ZHANG, Y. Enzymatic antioxidant defense in resistant plant: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum during long-term atrazine exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 133, p. 59–66, 2016.

KAIMI, E.; MUKAIDANI, T.; MIYOSHI, S.; TAMAKI, M. Ryegrass Enhancement of Biodegradation in Diesel-Contaminated Soil. *Environmental and Experimental Botany*, v. 55, n. 1-2, p. 110-119, 2006.

KANG, J. W. Removing environmental organic pollutants with bioremediation and phytoremediation. *Biotechnology Letters*, v. 36, p. 1129-1139, 2014.

KAWAHIGASHI, H. Transgenic plants for phytoremediation of herbicides. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 225–230, 2009.

KENSA, V. M. Bioremediation - An overview. *Journal of Industrial Pollution Control*, v. 27, p. 161-168, 2011.

KIELY, T., DONALDSON D., GRUBE A. Pesticide industry sales and usage: 2000 and 2001 market estimates. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C, 2004.

KRUGER, E. L.; RICE, P. J.; ANHALT, J. C.; TODD A. ANDERSON, T. A.; COATS, J. R. Comparative fates of atrazine and deethylatrazine in sterile and nonsterile soils. *Journal of Environmental Science*, v. 26, p. 95-101, 1997.

KUMARI, P.; SHARMA, P.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, M.M. Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: Removal and recovery of arsenic from aqueous system. *International Journal of Mineral Processing*, v. 78, p. 131-139, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 679-685, 1970.

LEGUIZAMO, M.A.O.; GÓMEZ, W.D.F.; SARMIENTO, M.C.G. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands — A review. *Chemosphere*, 2016.

LI, X.; WU, T.; HUANG, H.; ZHANG, S. Atrazine accumulation and toxic responses in maize (*Zea mays*). *Journal of Environmental Sciences*, v. 24, p. 203–208, 2012.

LI, Y-M.; CHANEY, R.; BREWER, E.; ROSEBERG, R.; ANGLE, J.S.; BAKER, A.; REEVES, R.; NELKIN, J. Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations. *Plant and Soil*, v. 249, n. 1, p. 107-115, 2003.

LIN, C.H.; LERCH, R.N.; GARRETT, H.E.; GEORGE, M.G. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by forage grasses: transformation, uptake, and detoxification. *Journal of Environmental Quality*, v. 37, p. 196-206, 2008.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *Journal of Agricultural Science*, v. 128, p. 311-322, 1997.

- MANOLE, A.; HEREA, D.; CHIRIAC, H.; MELNIG, V. Laccase activity determination. *Scientific Annals Of "Alexandru Ioan Cuza Din Iași"*. University Tomul I, s. Biomaterials in Biophysics, Medical Physics and Ecology, 2008.
- MATAKA, L.M.; HENRY, E.M.T.; MASAMBA, W.R.L.; SAJIDU, S. M. Lead remediation of contaminated water using *Moringa Stenopetala* and *Moringa oleifera* seed powder. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 3, p. 131, 2006.
- MATOS, F. J. A. *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades*. SEBRAE/CE, p. 220, 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998.
- MERINI, L.J.; BOBILLO, C.; CUADRADO, V.; CORACH, D.; GIULIETTI, A.M. Phytoremediation potential of the novel atrazine tolerant *Lolium multiflorum* and studies on the mechanisms involved. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 3059–3063, 2009.
- MIGEOT, V.; ALBOUY-LLATY, M.; CARLES, C.; LIMOUSI, F.; STREZLEC, S.; DUPUIS, A.; RABOUAN, S. Drinking-water exposure to a mixture of nitrate and low-dose atrazine metabolites and small-for-gestational age (SGA) babies: A historic cohort study. *Environmental Research*, v. 122 p. 58–64, 2013.
- MILHOME, M. A. L.; SOUSA, P. L. R.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, R. F. Assessment of pesticides contamination in water resources of the irrigated areas of Jaguaribe, Ceara, Brazil. *International Journal Environmental Research*, v. 9, p. 255–262, 2015.
- MELA, M.; GUILOSKI, I.C.; DORIA, H.B.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA, C.A.; RIBEIRO, L.; PEREIRA, A.C.; MARASCHI, V.; PRODOCIMO, C.A.; FREIRE, H.C.; ASSIS, S. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 93, p. 13–21, 2013.
- MOFEED, J.; MOSLEH, Y.Y. Toxic responses and antioxidative enzymes activity of *Scenedesmus obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine, alone and in mixture. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 95, p. 234-40, 2013.
- MOORE, M.T.; LOCKE, M.A.; KRÖGER, R. Mitigation of atrazine, S-metolachlor, and diazinon using common emergent aquatic vegetation. *Journal of Environmental Sciences*, 2016.
- MURPHY, I.J.; COATS, J.R. The capacity of switchgrass (*panicum virgatum*) to degrade atrazine in a phytoremediation setting. *Environmental Toxicology Chemistry*, v. 12, p. 715-722, 2011.
- MYRESIOTIS, C.; VRYZAS, Z.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Biodegradation of soil-applied pesticides by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on bacterial growth. *Biodegradation*, 23, p. 297–310, 2012.

NASCIMENTO, J.B.; BARRIGOSI, J.A.F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. *Agrarian Academy*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 1, n. 1; p. 234, 2014.

NASCIMENTO, R.A. Desempenho de reator anaeróbico de manta de lodo utilizando efluentes líquidos de indústrias alimentícias. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1996.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K.S.; TALBOT, B.G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. *Water Research*, v. 29, p. 703-710, 1995.

OLSEN, A. Low technology water purification by bentonite clay and *Moringa oleifera* seed flocculation as performed in Sudanese villages: effects on *Schistosoma mansoni cercariae*. *Water Research*, v. 21, p. 517–522, 1987.

PARK, S.E.; LIM, S.R.; CHOI, H.K.; BAE, J. Triazine herbicides inhibit relaxin signaling and disrupt nitric oxide homeostasis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 307, p. 10–18, 2016.

PATLAK, M. Estrogens may link pesticides, breast cancer: a controversial hypothesis suggests that pesticides' impact on estrogen metabolism can trigger cancer. *Environmental Science Technology*, v. 30, p. 210-211, 1996.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANTANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, v. 56, p. 15-39, 2005.

PINTO, G. M. F.; JARDIM, I. C. S. F. Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. *Journal of Chromatography A*, v. 869, p. 463–469, 2000.

POWELL, E.R., FALDLADDIN, N., RAND, A.D., PELZER, D., SCHRUNK, E.M., DHANWADA, K.R. Atrazine exposure leads to altered growth of HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, v. 25, p. 644 – 651, 2011.

QIAN, H.; CHEN, W.; LI, J.J.; WANG, J.; ZHOU, Z.; LIU, W.; FU, Z. The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology*, v. 92, p. 250–257, 2009.

RALSTON-HOOPER, K.; HARDY, J.; HAHN, L.; OCHOA-ACUÑA, H.; LEE, L.S.; MOLLENHAUER, R.; SEPÚLVEDA, M.S. Acute and chronic toxicity of

atrazine and its metabolites deethylatrazine and deisopropylatrazine on aquatic organisms. *Ecotoxicology*, v. 18, p. 899 – 905, 2009.

REDE DE AGRICULTURA SUSTENTÁVEL (RAS). List of Prohibited Pesticides. Secretaria da Rede de Agricultura Sustentável. Rainforest Alliance, 2011.

von ROSSUM M. W. P. C. V.; ALBERDA M.; AND VAN DER PLAS L. H. W. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. *Plant Science*, v. 130, p. 207 – 216, 1997.

RUFYIKIRI, G.; THIRY, Y.; DECLERCK, S. Contribution of hyphae and roots to uranium uptake and translocation by arbuscular mycorrhizal carrot roots under root-organ culture conditions. *New Phytologist*, Oxon, v. 158, n. 2, p. 391-399, 2003.

RUFYIKIRI, G., THIRY, Y., WANG, L., DELVAUX, B., DECLERCK, S. Uranium uptake and translocation by the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, under root-organ culture conditions. *New Phytologist*, v. 156, n. 2, p. 275-281, 2002.

RUSSART, K.L.G.; RHEN, T. Atrazine alters expression of reproductive and stress genes in the developing hypothalamus of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Toxicology* p. 366–367, 2016.

SAJIDU, S.M.I., HENRY, E.M.T., PERSSON, I., MASAMBA, W.R.L. e KAYAMBAZINTHU, D. PH dependence of sorption of Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ and Cr³⁺ on crude water and sodium chloride extracts of *Moringa stenopetala* and *Moringa oleifera*. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, p. 2397-2401, 2006.

SATHIAKUMAR, N., MACLENNAN, P.A., MANDEL, J., DELZELL, E. A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 41, p. 1 – 34, 2011.

SECRETARIA DE POLÍTICA AGRÍCOLA (SPA). Brasil Projeções do Agronegócio 2015/2016 a 2025/2026. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF, 2016.

SHARMA, P.; KUMARI, P.; SRIVASTAVA, M. M.; SRIVASTAVA, S. Ternary biosorption studies of Cd(II), Cr(III) and Ni(II) on shelled *Moringa oleifera* seeds *Bioresource Technology*, v. 98, p. 474-477, 2007.

SHARMA, S.; SINGH, B.; MANCHANDA, V. K. Phytoremediation: role of terrestrial plants and aquatic macrophytes in the remediation of radionuclides and heavy metal contaminated soil and water. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p 946–962, 2015.

SILVEYRA, G.R.; CANOSA, I.S.; RODRÍGUEZ, E.M.; MEDESANI, D.A. Effects of atrazine on ovarian growth, in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 192, parte C, p. 1–6, 2017.

SOUSA, A. S.; DUAVI, W. C.; CAVALCANTE, R. M.; MILHOME, M. A. L.; NASCIMENTO, R. F. Estimated levels of environmental contamination and health risk assessment for herbicides and insecticides in surface water of Ceara, Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.96, p. 90-95, 2016.

STAYNER, L.T.; ALMBERG, K.; JONES, R.; GRABER, J.; PEDERSEN, M.; TURYK, M. Atrazine and nitrate in drinking water and the risk of preterm delivery and low birth weight in four Midwestern states. *Environmental Research* v. 152, p. 294–303, 2017.

SUN, J.T.; PAN, L.L.; ZHAN, Y.; TSANG, D.C.W.; ZHU, L.Z.; LI, X.D. Atrazine contamination in agricultural soils from the Yangtze River Delta of China and associated health risks. *Geochemistry Health*, p 1-10, 2016.

SYRANIDOU, E. ; CHRISTOFILOPOULOS, S.; POLITI, M.; WEYENS, N.; VENIERI, D.; VANGRONSVELD, J.; KALOGERAKIS, N. Bisphenol-A removal by the halophyte *Juncus acutus* in a phytoremediation pilot: Characterization and potential role of the endophytic community. *Journal of Hazardous Materials*, v. 323, part A, p. 350–358, 2017.

TORBATI, S.; KHATAEE, A.R.; MOVAFEGHI, A. Application of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) for biotreatment of a textile dye: Investigation of some physiological responses and effects of operational parameters. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 92, p. 1934–1941, 2014.

TRUUA, J.; TRUU, M.; ESPENBERG, M.; NÖLVAK, H.; JUHANSON, J. Phytoremediation and plant-assisted bioremediation in soil and treatment wetlands: A review. *The Open Biotechnology Journal*, v. 9, p. 90–95, 2015.

UNITED NATIONS FRAMEWORK CONVENTION ON CLIMATE CHANGE (UNFCCC). UNFCCC Country Brief 2014: Brazil. United Nations Climate Change Secretariat. Setembro, 2015.

URBANEK, H., KUZNIAK-GEBAROWSKA, E. e HERKA H. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiologia Plantarum* v. 13, p.43-50, 1991.

VIEIRA, G. E. G.; SILVEIRA, C. R.; CUTRIM, J.; RIBEIRO, J. Avaliação dos principais aspectos da fitorremediação aplicados na redução da poluição no solo e água. *Engenharia Ambiental*, v. 8, p. 182-192, 2011.

VIGILÂNCIA EM SAÚDE DE POPULAÇÕES EXPOSTAS A AGROTÓXICOS (VSPEA). Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos: Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Brasília: Ministério da Saúde. v. 1, t. 1, 2016.

WADHWA, S.; PANWAR, M. S.; SAINI, N.; RAWAT, S. S.; SINGHAL, S. A review on commercial, traditional uses, phytoconstituents and pharmacological activity of *Moringa oleifera*. *Global Journal of Traditional Medicinal Systems*, v. 2, p. 1-13, 2013.

WANG, C.; LI, X.F.; LI, Y.X. A modified coomassie brilliant blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnology Letter.*, v. 29, p. 1599-1603, 2007.

WANG, Q; ZHANG W; LI, C; XIAO, B. Phytoremediation of atrazine by three emergent hydrophytes in a hydroponic system. *Water Science Et Technology*, 66 (6), p. 1282-1288, 2012.

YANG, S.; ZHEN, C.J.; JIN, Y.C.; JUN, X.H.; LI, S.Z. Toxic Effects of Atrazine on Reproductive System of Male Rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, v. 27, p. 281–288, 2014.

YILDIRIM, D.; SASMAZ, A. Phytoremediation of As, Ag, and Pb in contaminated soils using terrestrial plants grown on Gumuskoy mining area (Kutahya Turkey). *Journal of Geochemical Exploration*, November 2016.

ZHANG, J.J.; LU, Y.C.; ZHANG, J.J.; TAN, L.R.; YANG, H. Accumulation and toxicological response of atrazine in rice crops. *Ecotoxicology and Environmental Safety* v. 102, p. 105–112, 2014.