



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

HALISSON ARAÚJO DE SOUSA

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

FORTALEZA
2018

HALISSON ARAÚJO DE SOUSA

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

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

FORTALEZA

2018

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)

- S696p Sousa, Halisson Araújo de.
Potencial de Moringa oleifera L. na fitorremediação de águas contaminadas pelo herbicida atrazina /
Halisson Araújo de Sousa. – 2018.
69 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.
1. Moringa oleifera. 2. Fitorremediação. 3. Atrazina. I. Título.

CDD 572

HALISSON ARAÚJO DE SOUSA

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 30/08/2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus, minha família e minha amada
Emannelly.

AGRADECIMENTOS

“A Ti oh Deus Fiel e Bom senhor, Eterno Pai Supremo Criador.”

A minha mãe Analupe Sousa e minha avó Francisca Freitas por todo amor, afeto, cuidado, paciência e incentivos, proporcionando sempre o melhor para que esse trabalho fosse concluído.

A minha amada Emannelly de Almeida, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Agradeço pelo seu amor, carinho e por sempre me animar nos momentos mais difíceis nesse tempo de curso. Também pela sua imensurável paciência por termos perdido incontáveis oportunidades de termos mais momentos de lazer e conversas juntos para que este estudo tomasse forma.

A professora Dra. Daniele Sousa, por ter aceitado me orientar sem mesmo me conhecer. Agradeço por ser tão prestativa, maleável e paciente, sempre ajudando e corrigindo itens que para mim foram muito difíceis, mas que com suas considerações se tornaram mais fáceis e simples. Sou grato também pelo seu esforço, dedicação e empenho na prática docente, sobretudo nas disciplinas de Química de Proteínas e módulos de Bioquímica Geral.

A professora Dra. Selene Maia de Moraes, por ter iniciado em mim o gosto pela pesquisa científica desde os tempos de graduação. Agradeço por ter aceitado fazer parte desta banca e também por generosamente ter permitido que as análises no HPLC fossem realizadas em seu laboratório.

Ao professor Dr. Humberto Carvalho, por prontamente ter aceitado fazer parte da banca de defesa desta dissertação.

Aos colegas de bancada do LabTox, Mayara Melo, João Xavier, Tiago Dieveson, Luiz Wemmenson, Helen Paula e Larissa Lopes, por todo o apoio, suporte e por sempre terem sido prestativos e generosos quando solicitei por ajuda. Obrigado pela paciência de cada um.

Ao Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa - LPDV, em especial ao professor Dr. Tadeu de Oliveira, por todas as suas críticas e sugestões construtivas para este trabalho. Também agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram: Lucas, Nadine, Amanda, Mariana, Thiago, Tarcymara e Dhel.

Aos colegas do semestre 2016.2, pelos bons momentos de estudo: Chayenne, Leonardo, Valéria Chaves, Valéria Freitas, Paulo Vinícius, Cinthia e Elsa.

A Gyedre, do Laboratório de Fisiologia Vegetal, que prontamente e generosamente auxiliou nos testes de pigmentos fotossintetizantes.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

"The first gulp from the glass of natural sciences will turn you into an atheist, but at the bottom of the glass God is waiting for you."

Werner Heisenberg

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. Para isso, plantas de *M. oleifera*, em cultivo hidropônico, foram postas em contato com águas artificialmente contaminadas com atrazina, nas concentrações de 2,0, 1,0, 0,2 e 0,05 mg/L em períodos de 10, 20 e 30 dias. O potencial de fitorremediação foi avaliado através de parâmetros de crescimento vegetal, atividades enzimáticas e capacidade de diminuir a concentração de atrazina na água. A dosagem das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo mostrou que folhas e raízes de plantas tratadas com atrazina apresentaram perfil distinto de expressão dessas atividades. De maneira geral, foram observados aumentos significativos de peroxidase (POX), principalmente em raízes de plantas submetidas ao tratamento com atrazina, e outras enzimas como ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT). A avaliação dos teores de atrazina no meio hidropônico mostrou que com 10 dias de tratamento, as plantas de moringa conseguiram reduzir em 96,0 % os teores de atrazina. Já com 30 dias de tratamento, a taxa de remoção foi de 87,15 %. 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/ou outros compostos de interesse ambiental.

Palavras-chave: *M. oleifera*. Fitorremediação. Atrazina.

ABSTRACT

Phytoremediation is an emerging, low-cost technique that uses plants to remove, transform or stabilize contaminants in soil, air, and water. Some plants identified as good candidates for soil and water remediation have been evaluated for the biochemical and genetic processes involved in capturing, transporting and storing the pollutants. *Moringa oleifera* presents some of the important characteristics in the selection of phyto remediate plant species. Among them are its coagulant / flocculant properties, good adaptability to the climatic conditions of Ceará, fast growth rate and great resistance to pests. Thus, the present work had as objective to evaluate the phytoremediation potential of this species in water contaminated by atrazine, a widely used herbicide. For this, plants of *M. oleifera*, using a hydroponic cultivation, were put in contact with waters artificially contaminated with atrazine, in the concentrations of 2.0, 1.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹ in periods of 10, 20 and 30 days. Phytoremediation potential was evaluated through plant growth parameters, enzymatic activities and the ability to decrease the concentration of atrazine in water. The dosage of enzymes related to oxidative stress showed that leaves and roots of atrazine treated plants had a distinct expression profile of these molecules. In general, significant increases in peroxidase (POX) were observed, mainly in roots of plants submitted to atrazine treatment, and other enzymes such as ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT). The evaluation of the levels of atrazine in the hydroponic medium showed that with 10 days of treatment, the moringa plants managed to reduce atrazine contents by 96.0 %. After 30 days of treatment, the removal rate was 87.15 %. The results indicate that *M. oleifera* it is a specie that has great potential for the phytoremediation of environments contaminated with atrazine and /or other compounds of environmental interest.

Keywords: *M. oleifera*. Phytoremediation. Atrazine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da atrazina	16
Figura 2 – Níveis de atrazina em reservatórios de água no estado do Ceará	17
Figura 3 – Visualização alostérica dos sítios de ligação de alguns herbicidas inibidores do fotossistema II (P680) ao complexo protéico QB na membrana dos cloroplastos. As triazinas, grupo da atrazina, ligam-se aos sítios 2 e 3	18
Figura 4 – Representação esquemática das etapas da fitorremediação	20
Figura 5 – Espécie <i>Moringa oleifera</i>	22
Figura 6 – Vagens	22
Figura 7 – Sementes	22
Figura 5 – Flores	22
Figura 9 – A esquerda, uma amostra de água não tratada e a direita uma amostra de água tratada com sementes de <i>Moringa oleifera</i>	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TÉORICA	15
2.1	Poluentes Ambientais	15
2.2	Atrazina	16
2.3	Fitorremediação: uma técnica em ascensão	16
2.4	<i>Moringa oleifera</i> Lamarck	21
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	PHYTOREMEDIATION POTENTIAL OF <i>Moringa oleifera</i> IN WATER CONTAMINATED WITH ATRAZINE	26
5	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental é o resultado de qualquer ação ou obra humana capaz de provocar danos e alterar de forma significativa o equilíbrio dos ecossistemas. Os impactos podem ocorrer em escala local, regional e global. Nas últimas décadas tem ocorrido uma contínua e inflexível degradação do meio ambiente brasileiro proveniente, sobretudo, de uma má gestão e descaso de autoridades que contribuem para um grande crescimento de problemas de poluição e contaminação (TUNDISI, 2016).

Apesar dos sérios problemas ambientais e à saúde humana, os herbicidas são considerados extremamente relevantes no modelo de desenvolvimento da agricultura de um país. O Brasil é o maior consumidor de herbicidas no mundo (PIGNATI *et al.*, 2017). Em decorrência da significativa importância, tanto em relação à sua toxicidade quando à escala de uso no Brasil, esses pesticidas possuem uma ampla cobertura legal no Brasil, com um grande número de normas (MINISTÉRIO, 2012).

Um dos herbicidas de grande destaque mundial e nacional é a atrazina (1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino-2,4,6-triazina), que é amplamente utilizada para eliminar as ervas daninhas e, como consequência, aumentar a produtividade das culturas de interesse. Porém, esse composto causa uma grande poluição ambiental contaminando lençóis freáticos e causando males à saúde dos seres humanos e animais, como a desregulação do sistema endócrino ocasionando desequilíbrio hormonal. (CARMO *et al.*, 2013). Além disso, a elevada produção (70.000 – 90.000 toneladas anuais), solubilidade aquosa moderada, elevada persistência na água (meia-vida de cerca de 100 dias) e elevada mobilidade da atrazina, podem piorar ainda mais os seus efeitos adversos para a saúde. Recentemente, verificou-se que a concentração de atrazina nas águas subterrâneas da Comunidade Europeia era mais elevada do que o nível máximo admissível ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$). Diante dessa problemática, é importante remover a atrazina da água para a segurança do consumo humano (LIU *et al.*, 2017).

Atualmente, existem diversas formas que não são totalmente eficientes para a remoção de compostos tóxicos do ambiente, além de serem muito caros para a remediação de água contaminada. Dentre os tratamentos, podemos mencionar os de natureza química e física, como a adsorção a carvão ativado, processos avançados de oxidação (AOPs), coagulação/floculação, filtração e cloração. Dada a generalizada ocorrência da poluição pela atrazina, é de grande importância desenvolver tecnologias de tratamento eficazes e de baixo custo para a remoção desse herbicida em águas contaminadas (HOU *et al.*, 2017).

As tecnologias atualmente disponíveis para a remediação de locais contaminados, usados principalmente em países desenvolvidos são de baixo custo e boa eficiência (TAVARES, 2013). Uma das técnicas para a redução de contaminantes a níveis seguros, compatíveis e com proteção à saúde humana é a bioremediação. Uma delas, a fitorremediação, é um processo natural para a remoção *in situ*, baseada na degradação e/ou contenção de contaminantes em águas ou solos pelo uso direto de plantas vivas que trabalham através de suas atividades e processos biológicos, químicos ou físicos naturais (SARWAR, 2016). Essa tecnologia oferece vantagens únicas tais como baixo custo, pouco danos às propriedades químicas e físicas do solo, segurança e adaptabilidade para o tratamento de grandes superfícies de solo, e assim, mostra uma ampla perspectiva de aplicação em um país tropical como o Brasil (ZHANG *et al.*, 2016).

Diversas espécies de plantas têm sido estudadas no que diz respeito às suas capacidades de fitorremediação. Apesar dos vários estudos, alguns entraves limitam a aplicação efetiva dessas espécies no tratamento de áreas contaminadas por agrotóxicos ou metais pesados. Por exemplo, as questões da adaptabilidade da planta às condições edafoclimáticas da região, a taxa de ganho de biomassa vegetal etc. 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 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Poluição Ambiental

Podemos definir poluição ambiental como a ação de contaminar as águas, solos e ar (FERREIRA *et al.*, 2018). Esta poluição pode ocorrer com a liberação no meio ambiente de lixo orgânico, industrial, gases poluentes, objetos, elementos químicos, entre outros que interferem na saúde e no bem-estar dos seres vivos (BRASIL; RESENDE; ZIM, 2016). Ela costuma gerar efeitos nocivos na saúde dos indivíduos, mesmo quando seus níveis se encontram dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente (AMÂNCIO; NASCIMENTO, 2012).

Diversos compostos como os herbicidas são utilizados nas vegetações para aumentar a produtividade e diminuir o tempo de crescimento das culturas (SILVA *et al.*, 2017). Entretanto, tais moléculas têm um impacto considerável no meio ambiente e até na qualidade nutricional dos alimentos consumidos. Diversas medidas preventivas vêm sendo adotadas para a diminuição dos compostos que contaminam a água, poluem o ar e diminuem a biodiversidade, contudo, pela difícil degradação, é sabido que essas substâncias permanecerão no meio ambiente por vários anos (PAES LEME, 2017).

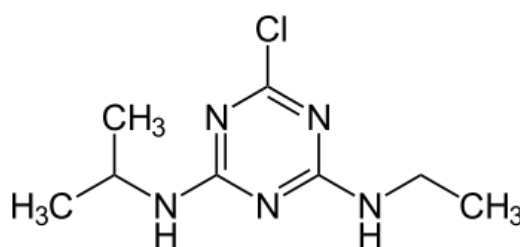
A quantidade de herbicidas utilizada no Brasil é bastante alta, o que faz com que o país esteja em 1º lugar no ranking mundial desde 2008, consumindo cerca de 19 % do mercado mundial. Foram mais de 1 bilhão de litros despejados em solo brasileiro, superior aos 800 milhões de litros utilizados em um país com extensão territorial maior como os Estados Unidos. Um fator positivo, é que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) iniciou em 2008 a reavaliação de 14 pesticidas que podem apresentar riscos à saúde. Entretanto, até hoje os estudos não foram concluídos e por conta dessa demora somam-se incentivos fiscais.

O Governo brasileiro concede redução de 60 % do ICMS (imposto relativo à circulação de mercadorias), isenção total do PIS/COFINS (contribuições para a Seguridade Social) e do IPI (Imposto sobre Produtos Industrializados) à produção e comércio dos pesticidas (SERRAGLIO; GOMES, 2017). Diante desse cenário, há a necessidade de uso de técnicas eficientes para eliminar ou reduzir esses poluentes visando atender as exigências dos órgãos regulamentadores no Brasil, como a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) e a Resolução nº 357 do CONAMA (BRASIL, 2005).

2.2 Atrazina

A atrazina (Figura 1), 1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino-2,4,6-triazina, é um herbicida do tipo triazina pertencente a classe III (medianamente tóxico), vastamente utilizada para o controle de ervas daninhas em plantações de milho, cana-de-açúcar e sorgo. A atrazina possui baixo custo (20 litros desse herbicida custam apenas R\$ 18,00), e o fato de atuar em sinergia com outros herbicidas, como o glifosato por exemplo, faz com que os produtores percam menos tempo em suas plantações e reduzam o número de pulverizações (BONFLEUR, 2010).

Figura 1 – Estrutura química da atrazina

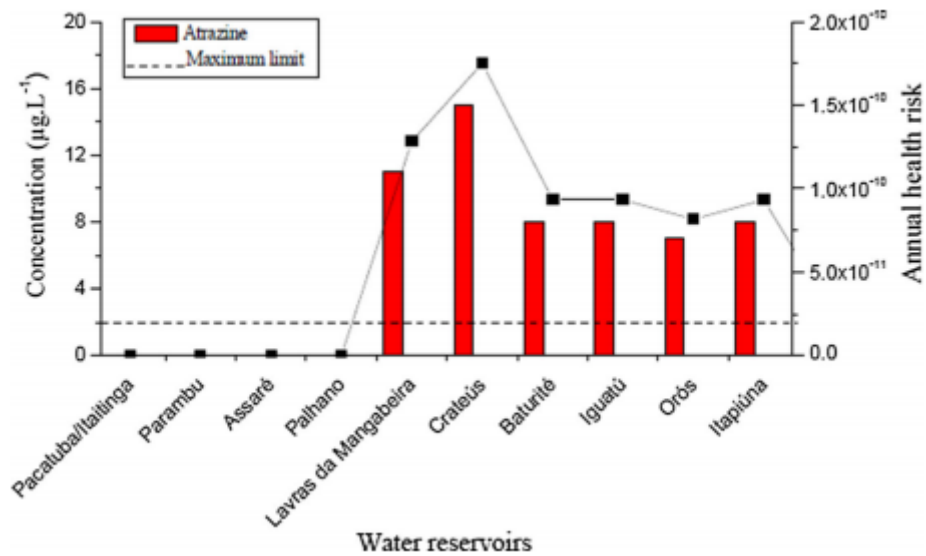


Fonte: Solomon *et al.*, 2008

Sua baixa reatividade e taxa de biodegradação são afetadas pela baixa solubilidade em água ($33 \mu\text{g.L}^{-1}$), o que traz bastante discussão quanto à sua utilização de forma intensa devido à contaminação generalizada na água potável e no solo. Resíduos desse pesticida podem ser encontrados nesses locais ou em frutas e vegetais, mesmo após longo tempo de aplicação, pois a atrazina possui um tempo de vida médio que varia de 20 até mais de 100 dias. Agências fiscalizadoras em território nacional estabelecem que os níveis de atrazina em água não devem exceder a $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (CANUTO *et al.*, 2010).

Sousa e colaboradores (2016) determinaram as concentrações de atrazina em águas retiradas de reservatórios no interior do Ceará (Figura 2). Cidades como Lavras da Mangabeira, Crateús, Baturité, Iguatu, Orós e Itapiúna, apresentaram níveis excessivos de atrazina nas águas tornando-as inapropriadas para o consumo humano.

Figura 2 – Níveis de atrazina em reservatórios de água no Estado do Ceará



Fonte: Sousa *et al.*, 2016

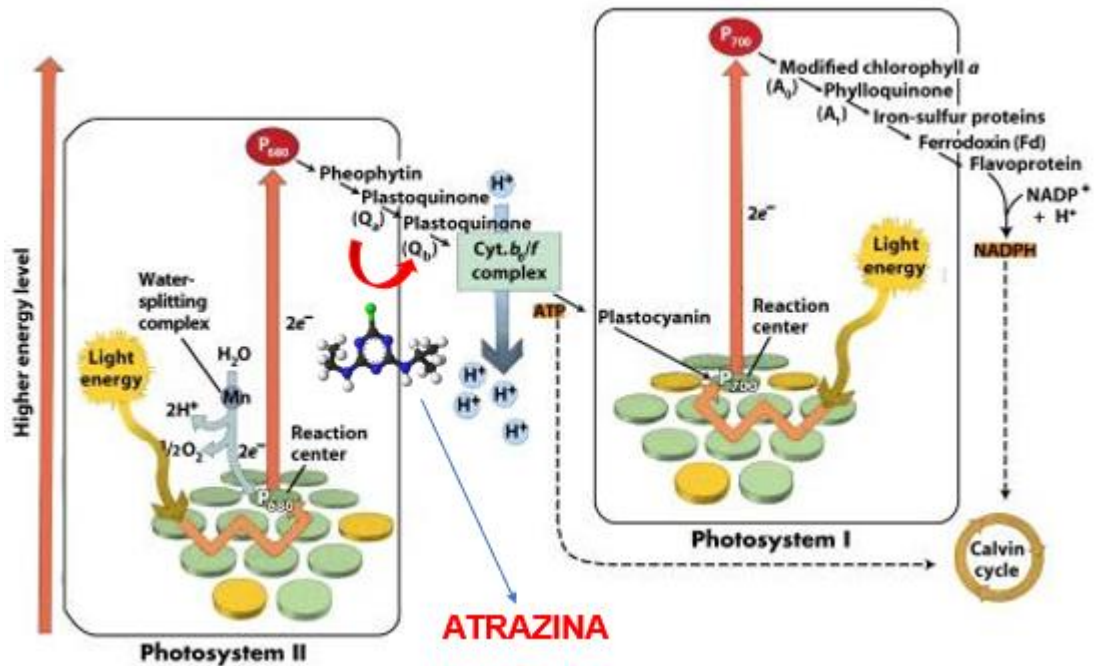
Estudos de 2002 e 2010 revelaram que a atrazina tornou estéril 75% de rãs de sexo masculino e transformou uma em cada dez indivíduos em fêmeas, transformando-os em hermafroditas (HAYES *et al.*, 2002; HAYES *et al.*, 2010). Estudos solicitados pela USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) e financiado pela Syngenta (principal produtor desse herbicida), afirmaram não conseguir reproduzir esses resultados. Contudo, pesquisadores da Universidade do Sul da Flórida, publicaram um artigo em 2011 documentando 122 incorreções e 22 afirmações enganosas por parte desse estudo, que menosprezavam os efeitos danosos da atrazina (HAYES *et al.*, 2011).

Embora tenha sido banida na União Européia em 2004, a atrazina ainda é um dos herbicidas mais utilizados no mundo, tanto que nos Estados Unidos é um dos herbicidas mais amplamente utilizados, com 76 milhões de quilos aplicados a cada ano e no Brasil somam-se mais de 200 mil toneladas comercializadas (COSTA; MELLO; FRIEDERICH, 2017). Os efeitos disruptores endócrinos, o possível efeito cancerígeno e a conexão epidemiológica com baixos níveis de espermatozóides nos homens, levaram vários pesquisadores a pedir a sua proibição nos países europeus, EUA e Brasil (BILA; DEZOTTI, 2007).

A principal consequência que a atrazina causa aos vegetais é a inibição do fotossistema 2. Em geral, esse herbicida inibe a fotossíntese ao se ligar ao sítio de ligação Q_b do fotossistema II nas membranas dos tilacóides do cloroplasto (Figura 3). A ligação da atrazina às plastoquinonas bloqueia o transporte de elétrons de Q_a para Q_b, parando a fixação de CO₂ e a produção de ATP e NADPH, que são elementos essenciais para o crescimento das

plantas (PEREIRA, 2013).

Figura 3 - Visualização dos fotossistemas 1 e 2. A atrazina bloqueia o transporte de elétrons das plastoquinonas Q_a e Q_b .



Fonte: Próprio autor

Além dos danos já citados pela atrazina, o bloqueio de transporte de elétrons no PSII promove a formação de moléculas altamente reativas que iniciam uma cadeia de reações que causam a desintegração da membrana lipídica e protéica resultando no vazamento de membrana, permitindo que células e organelas celulares sequem e se desintegram rapidamente. Além disso, é relatado na literatura que inibidores do PSII afetam outros processos vegetais, como biossíntese de carotenóides, síntese de antocianinas, RNA e proteínas (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2011).

2.3 Fitorremediação: uma técnica em ascensão

Em consequência da rápida industrialização, atividades militares e mudanças nas práticas agrícolas, aumentou-se a disseminação do uso de compostos orgânicos perigosos levando a um aumento das concentrações de contaminantes no meio ambiente. Estes poluentes podem se acumular e persistir por longos períodos de tempo, podendo estar espalhados através do solo, ar ou da água, acarretando uma variedade de graves problemas

ambientais e de saúde em todo o mundo (KANG, 2014). Dentre as estratégias de natureza química e física *in situ* para remover contaminantes orgânicos podemos citar técnicas de engenharia como lavagem de solos, extração, bombeamento, aeração, remoção de ar e tratamento de água contaminada pela adição de agentes oxidantes como H₂O₂ ou KMnO₄ (SCULLION, 2006; DOTY, 2008).

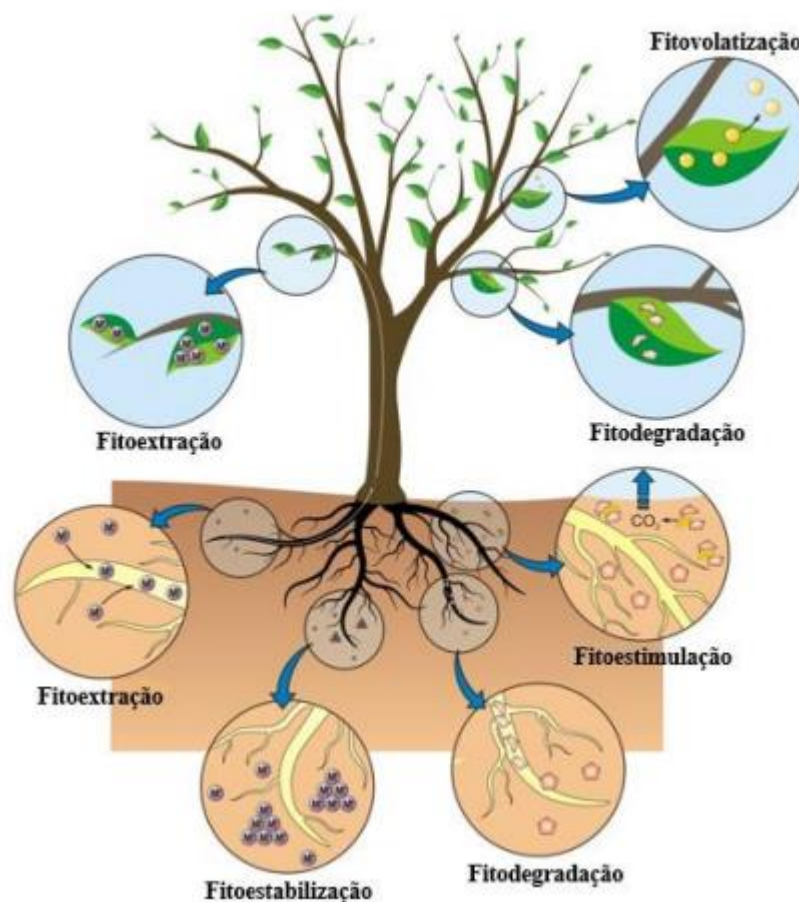
No entanto, essas técnicas, além de causar contaminações secundárias e danos ao ambiente, são estratégias altamente dispendiosas. Apenas os Estados Unidos, gasta cerca 6 a 8 bilhões de dólares anualmente com remediação. A nível mundial são gastos cerca de 25 a 50 bilhões de dólares (DOTY, 2008). Com isso, os pesquisadores intensificaram seus esforços para desenvolver práticas de remediação mais econômicas usando tecnologias de descontaminação ambiental como biorremediação (VIDALI, 2001).

O uso de plantas na remediação é chamado de fitorremediação. É um método altamente promissor que usa várias plantas para degradar, acumular ou imobilizar contaminantes do solo e da água (DIETZ; SCHNOOR 2001). É amplamente utilizado para limpar metais, pesticidas, petróleo, explosivos, hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) e outros compostos orgânicos (MEAGHER, 2000).

A fitorremediação tem muitas vantagens óbvias em comparação com abordagens físicas ou químicas tradicionais. Primeiro, é relativamente um método barato e simples de gerenciar (LEDUC; TERRY, 2005; MEAGHER, 2000); em segundo lugar, é menos intrusivo, proporciona um ambiente esteticamente agradável e estabiliza o solo limpando o meio ambiente; em terceiro lugar, os materiais vegetais utilizados para a fitorremediação podem ser reprocessados para reuso da madeira, produzindo celulose e bioenergia (STANTON *et al.*, 2002).

Ao entrar em contato com algum contaminante, as plantas usam estratégias para a correção do seu metabolismo. Pela acumulação de compostos no tecido vegetal, há a liberação de exsudatos e enzimas que estimulam a atividade microbiana gerando transformações bioquímicas. As estratégias de fitorremediação podem ser categorizadas de acordo com as formas em que o contaminante é processado (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática das etapas da fitorremediação



Fonte: Medeiros, 2015

Fitoextração ou fitoacumulação usa plantas para transferir poluentes inorgânicos e acumulá-las nos tecidos de plantas. Uma vez que os metais não podem ser degradados, a colheita da biomassa deve ser feita, seguida de armazenamento ou fitossanidade (BANERJEE *et al.*, 2011). Fitodegradação ou fitotransformação é a estratégia adequada principalmente para poluentes orgânicos, uma vez que as plantas reduzem ou degradam os contaminantes por meio do seu metabolismo através de processos com modificação enzimática (DOTY *et al.*, 2007; JAMES *et al.*, 2008). Fitostabilização usa certas espécies de plantas para imobilizar contaminantes no solo e nas águas subterrâneas através da absorção ou precipitação de contaminantes pelas raízes, ou também absorvendo os contaminantes nas raízes quando os mesmos estiverem em solução em torno da zona radicular (VESELÝ; TLUSTOŠ; SZÁKOVÁ, 2012; RAJKUMAR; MA; FREITAS, 2013).

A fitovolatilização refere-se à evapotranspiração de poluentes através dos estômatos em suas folhas (FERROA; KENNEDY; LARUE, 2013). Por muitas vezes, uma mesma espécie vegetal pode combinar esses processos para uma melhor eficiência no ambiente

contaminado.

Embora a fitorremediação seja considerada um método de remediação ambientalmente amigável e multifuncional, sua eficiência pode ser limitada por efeitos sazonais, condições climáticas, habilidades insuficientes para tolerar, desintoxicar e acumular poluentes na área altamente contaminada e dificuldade na seleção das plantas. Além disso, a fitorremediação bem-sucedida leva tempo, às vezes mais de uma década, o que torna difícil avaliar o sucesso no estágio inicial (FARRAJI *et al.*, 2016).

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 melhoria de plantas para remediação de áreas contaminadas (KAWAHIGASHI, 2009; SHARMA; SING; MANCHANDA, 2015).

2.4 *Moringa oleifera* Lamarck

M. oleifera é uma planta nativa do norte da Índia, Paquistão e Nepal. É pertencente à família Moringaceae, que inclui 13 espécies de árvores e arbustos. É uma planta perene, distribuída amplamente na Índia, Egito, Filipinas, Paquistão, Singapura e Nigéria. Também é cultivada e bem naturalizada no sudeste da Ásia, Península Arábica, África Tropical, América Central, Caribe e América do Sul Tropical e amplamente cultivada nos trópicos de todo o mundo. No território brasileiro é encontrada em maior quantidade na região Nordeste, principalmente nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará, mesmo existindo poucas chuvas (ESTIASIH; SRIWAHYUNI, 2012).

A moringa é conhecida no Nordeste brasileiro por "moringa", "quiabo-de-quina" ou "lírio". Santana e colaboradores (2010) caracterizaram a moringa como uma planta arbórea (Figura 5) com longas vagens verdes (Figura 6), sementes aladas (Figura 7) e flores brancas perfumadas (Figura 8). No estado do Ceará, com uma precipitação média anual de 490 mm, as árvores dessa espécie podem alcançar de 6 a 7 metros de altura, gerando flores e frutos durante o ano, mesmo estando em solos pobres e expostas a longos períodos de seca.

Figura 5 – *Moringa oleifera*

a) Árvore



b) Vagens



c) Sementes



d) Flores



A classificação taxonômica da *M. oleifera* pode ser descrita da seguinte forma (SCHAN; JAIN; SINGH, 2011):

Reino: Plantae

Sub-reino: Tracheobionta

Super-Divisão: Spermatophyta

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Eudicotiledônea

Ordem: Brassicales

Família: Moringaceae

Gênero: *Moringa*

Espécie: *Moringa oleifera*

Estudos farmacológicos sobre *M. oleifera* começaram nos anos 50, com a descoberta de propriedades antibacterianas na planta (RAO, 1946). *M. oleifera* é uma planta altamente valorizada, distribuída nos países tropicais e subtropicais, utilizada como medicamento tradicional no Sul da Ásia pelos seus diversos efeitos terapêuticos (SUBRAMANIAM, 2017). Possui compostos bioativos com importantes propriedades farmacológicas usadas em tratamentos como reumatismo, ascite, abscesso, picadas venenosas e melhoramento nas funções cardíacas (ANWAR; BHANGER, 2003; CHUMARK *et al.*, 2008).

Quanto aos aspectos nutricionais, essa espécie se destaca por possuir todas as partes de sua planta comestíveis. Diversos compostos bioativos foram isolados de diferentes partes desta planta, como as folhas, sendo considerado uma excelente fonte de proteínas, vitaminas e minerais; sementes e vagens imaturas, sendo uma boa fonte de ácido oleico e também raízes, cascas, frutos e flores (ANWAR; BHANGER, 2003; MAKKAR; BECKER, 1997).

Uma característica muito importante da *M. oleifera*, o que a tornou popular mundialmente, é a purificação da água contaminada. Diversos países nos continentes asiáticos e africanos já utilizam as sementes de moringa como um coagulante natural (Figura 9).

Figura 9 – A esquerda, uma amostra de água não tratada e a direita uma amostra de água tratada com sementes trituradas de *Moringa oleifera*



Fonte: Bergsteldt, 2011.

A explicação para essa propriedade é a presença de proteínas catiônicas de massa molecular variando de 6 a 16 kDa e um ponto isoelétrico alcalino variando de 9 a 11 (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995; FERREIRA *et al.*, 2008).

M. 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, resistência a pragas. Também são capazes de tolerar diferentes tipos de solos, desde os argilosos, neutros e ácidos (GALLÃO; DAMASCENO; BRITO, 2008).

Diversos trabalhos com *M. oleifera* demonstram seu potencial na remediação de compostos inorgânicos, como por exemplo águas contaminadas com metais pesados: arsênio, cádmio, chumbo, manganês e prata (MENDES, 2007; SHARMA *et al.*, 2007; ADELAJA; AMOO; ADERIGIBE, 2011). Entretanto, há poucos trabalhos sobre a capacidade de remoção 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 (um composto orgânico), retirando-o do meio? Em caso positivo, que influências a presença dessa substância teria no desenvolvimento e nas características bioquímicas da planta?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

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

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;
- Realizar a caracterização bioquímica dos extratos de *M. oleifera*;
- Mensurar nos tecidos vegetais indicadores de estresse do sistema antioxidante enzimático;
- Avaliar por HPLC os níveis residuais de atrazina na água após o cultivo de *M. oleifera*.

ARTIGO DA DISSERTAÇÃO

**PHYTOREMEDIATION POTENTIAL OF *Moringa oleifera* IN WATER
CONTAMINATED WITH ATRAZINE**

PHYTOREMEDIATION OF CONTAMINATED WATER WITH ATRAZINE USING***Moringa oleifera* L.**

Halisson A. Sousa¹, Mayara M. Forte¹, José T. A. Oliveira¹, Selene M. Morais², Daniele O. B.

Sousa^{1*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza,
Ceará, Brazil

²Department of Chemistry, Statual University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

***Correspondence:**

Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa, Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, 60451-970, Brazil. Fax: +55 85 3366
9783, Telephone: +55 85 3366 9820. E-mail: daniele.sousa@ufc.br

Abstract

Phytoremediation is an emerging, low-cost technique that uses plants to remove, transform or stabilize contaminants in soil, air, and water. Some plants identified as good candidates for soil and water remediation have been evaluated for the biochemical and genetic processes involved in capturing, transporting and storing the pollutants. *Moringa oleifera* presents some of the important characteristics in the selection of phytoremediate plant species. Among them are its coagulant / flocculant properties, good adaptability to the climatic conditions of Ceará, fast growth rate and great resistance to pests. Thus, the present work had as objective to evaluate the phytoremediation potential of this species in water contaminated by atrazine, a widely used herbicide. For this, plants of *M. oleifera*, using a hydroponic cultivation, were put in contact with waters artificially contaminated with atrazine, in the concentrations of 2.0, 1.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹ in periods of 10, 20 and 30 days. Phytoremediation potential was evaluated through plant growth parameters, enzymatic activities and the ability to decrease the concentration of atrazine in water. The dosage of enzymes related to oxidative stress showed that leaves and roots of atrazine treated plants had a distinct expression profile of these molecules. In general, significant increases in peroxidase (POX) were observed, mainly in roots of plants submitted to atrazine treatment, and other enzymes such as ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT). The evaluation of the levels of atrazine in the hydroponic medium showed that with 10 days of treatment, the moringa plants managed to reduce atrazine contents by 96.0 %. After 30 days of treatment, the removal rate was 87.15 %. The results indicate that *M. oleifera* it is a specie that has great potential for the phytoremediation of environments contaminated with atrazine and /or other compounds of environmental interest.

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

1.0 Introduction

The continuous usage of herbicide and pesticides has contaminated soil and groundwater. These toxic compounds affect the surface nutrients, soil fertility, and agricultural products. Moreover, pollution arising from the agricultural use of herbicides is diffuse because the compounds are distributed over large areas. Therefore, non-targets effects in the environment should be considered when applying herbicides. It is known that some herbicides cause a variety of health problems ranging from skin rashes to death (Mahakavi and Baskaran, 2015).

The herbicide atrazine (1-chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine) is a non-acidic and slightly hydrophilic organic contaminant belonging to the class of s-triazines, which inhibits photosystem II by blocking transport of electrons, leading to the necrosis of the plant tissues of species susceptible to it. This herbicide is recognized as effective and strongly indicated for the control of weeds in crops of great economic importance in many countries, such as Brazil (Embrapa, 2006). However, its indiscriminate use has caused several damages to the soil and contaminates groundwater, exceeding the maximum amount allowed in many countries.

Phytoremediation is a rising green technology in which plants and the microbial flora present in the rhizosphere are used to remedy diverse environments, such as soils, surface waters and groundwater contaminated by heavy metals, organic compounds and radionuclides (Sharma; Sing; Manchada, 2015). It is a fairly effective and non-intrusive sustainable technology with very low costs, as well as being aesthetically pleasing, which makes it more socially and ecologically acceptable when compared to some alternative methods such as mechanical and/or chemical remediation (Chirakkara, Cameselle, Reddy, 2016).

Plant-mediated remediation of environments can be performed for both organic and inorganic compounds. In the case of organic, several factors influence the uptake, distribution and transformation of these compounds. Among these factors, the physical and chemical properties of the compound (water solubility, molecular mass, octanol-water partition coefficient), environmental conditions (temperature, pH, organic matter, humidity, etc.) and plant characteristics of roots, presence of enzymes, etc (Truua *et al.*, 2015).

Although phytoremediation is considered an environmentally beneficial and multifunctional remediation, its efficiency can be limited by seasonal effects or the insufficient ability to tolerate, detoxify and accumulate contaminated areas. In addition, the success of phytoremediation usually takes a very long time, sometimes for decades, which makes it very difficult to evaluate its success in short interval of time (Kang, 2014).

Against this background, numerous works have been carried out in order to to prospect plant species that present greater tolerance and greater ability to degrade or accumulate organic and / or inorganic compounds, besides presenting rapid growth. In addition, Biotechnology has brought progress in adapting and/or improvement of plants for remediation of polluted areas (Kawagashi, 2009; Sharma; Sing; Manchada, 2015).

Moringa oleifera, is one of the 13 plant species of the Moringa genus, unique in the Moringaceae family. It is adapted to various types of climatic conditions, from subtropical to dry tropical and humid forests. This species is distributed in the Philippines, Central America, North America and South America (Makkar, Becker, 1997). In Brazil, it was introduced in the 1950's, being found in the Northeast, mainly in the states of Maranhão, Piauí and Ceará (Matos, 1998). The various uses and applications of this species make it known as the "miracle tree", because it has nutritional and therapeutic properties as antioxidant and anti-inflammatory activity. However, the most common proposal for the use

of this plant is water purification. The ability of this plant species to remove contaminants from water has been recognized for a long time (Olsen, 1987).

A number of studies with *M. oleifera* demonstrate their potential in the remediation of environments contaminated with heavy metals, such as cádmium (Sajdu *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2007), lead (Mataka *et al.*, 2006; Adelaja; Amoo; Aderibigbe, 2011) and arsenic (Kumari *et al.*, 2006), however there are not many studies on the remediation of organic compounds for this plant species. In the present study, we report the phytoremediation of *M. oleifera* with water contaminated with the herbicide atrazine. We also investigated the biochemical and physiological parameters altered by exposure of this species to the herbicide atrazine.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Molecular mass markers were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Guaiacol, ascorbic acid and atrazine standard were obtained from Sigma-Aldrich Ltd. (St. Louis, USA). As standard for HPLC analysis, atrazine (99.9 % purity) was purchased from Supelco, Co. USA. The solvent methanol used for high performance liquid chromatography (HPLC) was purchased from J.T. Baker (USA).

2.2 Plant material and growth conditions

Moringa oleifera seeds were harvested, at 65 days after anthesis from trees naturally growing at the Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brazil. The seeds with no cracks or other injuries, were surface sterilized with 1.0 % active chlorine (hypochlorite) for 5 min, rinsed exhaustively with and soaked in distilled water for 1 h and germinated in Germtest

paper humidified with Milli-Q grade water. The seeds were kept near 100 % relative humidity in the dark for 14 days. After this period, the seedlings were transferred to 1.0 L plastic pots (three per pot) containing 0.75 L distilled water and dilutes (3x) Hoagland nutritive solution (HOAGLAND; ARNON, 1959). The plants were kept in a greenhouse under natural conditions of semiarid region of Brazil, with day/night, temperatures of 31.0 ± 3.0 °C/ 26.0 ± 0.8 °C, respectively, and 80.0 ± 7.9 % relative humidity.

The plants were treated with the herbicide atrazine at four concentrations (2.0, 1.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹) in different time (10, 20 and 30 days). After these periods, the plants were collected, and individually weighted. Then, the plants were separated into shoots and roots, which were weighted, frozen using liquid nitrogen (N₂) and stored at -80 °C for later analysis. The same way, the solution in the pots were collected and stored at -80 °C for analysis of residual atrazine content.

2.3 Photosynthetic pigment content

Leaves (25 mg) were placed in contact with 1.0 mL of extract solution (CaCO₃ saturated with DMSO). They were then incubated in a water bath at 65 °C for 30 min. Absorbance readings were made in a spectrophotometer at 665, 649 and 480 nm. The contents of total chlorophyll a, b and carotenoids were estimated by means of specific equations reported by Arnon (1949), using the following formulas: $Clfa = 12.47_{A665} - 3.62_{A649}$; $Clfb = 25.06_{A649} - 6.50_{A665}$; $Clftotal = 7.15_{A665} + 18.71_{A649}$ and $Carotenoids = (1000_{A480} - 1.29 Clfa - 53.78 Clfb) / 220$. The values found were expressed in $\mu\text{g.g}^{-1}$ fresh weight (FW).

2.4 Protein and antioxidant enzymes content

2.4.1 Extraction procedures

M. oleifera shoots and roots were harvested and ground in liquid N₂ by mortar and pestle. After the N₂ had boiled away, the frozen powder was immediately brought into contact with 50 mM potassium phosphate buffer (1:5 w/v) at pH 7.0 and was subjected to moderate stirring for 2 h, at 4 °C. The crude extract was filtered and centrifuged at 10.000 x g at 4 °C for 30 min, and the supernatant was dialyzed (12 kDa molecular weight cutoff membrane) 4 changes of 1 L 50 mM potassium phosphate at pH 7.0 buffer for 24 h. The dialysed material was stored at -20 °C for further analysis.

2.4.2 Protein quantification

The resulting leaf and root extract was used for protein content measurement and enzyme assays all done in triplicate for every leaf extract sample. The leaf and root protein content was determined (Bradford 1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.4.3 Protein profile analysis by SDS-PAGE

Electrophoresis protein profile of protein extracts were analyzed by denaturing electrophoresis (SDS-PAGE) using 12.5 % (w/v) polyacrylamide gels (8.5 x 8.0 cm) as previously described (Laemmli, 1970). Electrophoresis run at 20 mA, 150 V and 10 W for 45 min. Phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactoalbumin (14.4 kDa) were used as protein markers. The protein bands were visualized after staining with blue silver (Candiano *et al.* 2004).

2.4.4 Guaiacol peroxidase (GPOX; EC 1.11.1.7) activity

Total peroxidase activity was determined by colorimetric assays according to Urbanek, Kuzniak-Gebarowska and Herka, (1991) using guaiacol and H₂O₂ as substrates. Aliquots of 0.01 mL of the samples were added to a solution composed of 0.5 mL 60 mM H₂O₂, 0.5 mL 20 mM guaiacol, and 0.990 mL 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.2. Reaction was conducted for incubation 10 min at 30 °C and absorbances were taken at 480 nm in 30-second intervals up to 5 min, express in 38 UA/mgP. The enzyme activity was expressed in units of activity per gram of leaf fresh weight (UA.g⁻¹ FW).

2.4.5 Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity

SOD activity was measured (Van Rossum *et al.* 1997) in the leaf and roots extracts as the inhibition of the photochemical reduction of NBT (Nitroblue-tetrazolium; Sigma) to blue formazan, catalyzed by the enzyme. The leaf and roots extracts (0.05 mL) was added in microplate wells, in triplicate, containing 0.02 mL of 103 mM Na⁺-phosphate buffer, pH 7.8, 0.01 mL 0.50 % (v/v) Triton X-100, 0.02 mL 130 mM L-methionine, 0.01 mL 2 mM EDTA, 0.02 mL 0.75 mM NBT, 0.02 mL 1 mM riboflavin, and 0.05 mL of ultra-pure H₂O. Reaction took place in a chamber under illumination by a 32-W fluorescent lamp and was terminated 5 min later by turning off illumination. The blue formazan generated by NBT photoreduction was measured as the increase in absorbance at 630 nm (Automated Microplate Reader, model ELX800-Bio-Tek Instruments®, Inc., USA). The control reaction mixture was prepared in the same manner as the experimental reaction, but without the leaf extract, and maintained in the dark. SOD activity was calculated as the difference between the absorbance of control and that of its experimental equivalent estimated for a 1-min reaction. The enzyme activity was expressed in units of activity per gram of leaf fresh weight (UA g⁻¹ FW).

2.4.6 Catalase (CAT; EC. 1.11.1.6) activity

Activity was assayed as previously described (Peixoto, 1999). The *Moringa oleifera* leaf and roots extracts (0.1 mL) and 12.5 mM H₂O₂ in 50 mM K⁺-phosphate, pH 7.0, was incubated at 30 °C for 10 min. Next 0.1 mL of the leaf and root extracts were added to 0.90 mL of H₂O₂-phosphate buffer to start reaction. CAT activity was measured by the decrease in absorbance at 240 nm, in 10-second intervals up to 1 min (Havir and McHale 1987). CAT activity was expressed as Units of Activity (UA) per gram of fresh weight (g FW).

2.4.7 Ascorbate peroxidase (APX; EC. 1.11.1.11) activity

APX activity was determined according to Koshiba (1993) methodology at 30 °C for 3 min. The reaction mixture was composed of the leaf and root extract (0.1 mL), 0.8 mL 50 mM K⁺- phosphate buffer, pH 6.0, containing 0.5 mM ascorbate and 0.1 mL 2 mM H₂O₂. APX activity was measured by monitoring the decrease in absorbance at 290 nm for 3 min, as an index of ascorbate oxidation, and expressed as Units of Activity (UA) per gram of fresh weight (g FW).

2.5 Residual atrazine content

The calibration curve as well as the quantification of atrazine in water samples were performed in HPLC system (Shimadzu, LC-Net II / Plus). The analysis was performed using an C18 column (Phenomenex 15.0 cm × 4.6 mm × 5.0 μm). The mobile phase consisted of methanol/water (50:50) with a flow rate of 1.5 mL.min⁻¹, and the monitoring of atrazine was carried out at 220 nm. Three water samples were used to the analyses. A stock solution of atrazine (chromatographic standard - Supelco) was prepared in methanol (HPLC grade) at the concentration of 100.0 mg.L⁻¹. From the direct solution and prepared liquid solutions at the

concentrations of 4.0, 2.0, 1.0, 0.2, 0.05, 0.005, 0.0005 mg.L⁻¹ also in methanol (HPLC grade). Volumes of 50 µL, solutions for applications in C18 column for the construction of the calibration curve. Samples from water contaminated with atrazine also apply the conditions of the chromatographic standard. Volumes of 50 µL also were injected in the liquid chromatograph of samples collected from hydroponic planting containing residual atrazine, for the determination of the herbicide.

2.6 Statistical analyses

Data from the physiological parameters, enzyme assays were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test ($\rho \leq 0.05$).

3.0 Results and discussion

Atrazine has been maintained as one of the most used pesticides for the control of weeds of broad leaves and grasses (Kiely *et al.*, 2004; Goodis, 2016) and, therefore, it is easily found it in the soils and waters of the world, including Brazil, at concentrations above acceptable levels (2,0 µg.L⁻¹) (CONAMA, 2008). This compound and its derivatives are considered to be toxic agents of class III, and it is possible to point out several studies that prove its effects deleterious effects on various organisms (Pinheiro *et al.*, 2017).

Phytoremediation has gained momentum in the last decades because it is a green technology, when compared to other decontamination, and present good results, while still offer the option of natural treatment *in situ*. Its multi-capacity objectives is also advantageous, because it is possible to phytoremediate more than one pollutant in the same place, as well as attractiveness to the lay public, in function to be seen as "green technology". Several studies phytoremediation of several compounds (Syranidou *et al.*, 2017; Yldirim; Sasmaz, 2017; Leguizamo; Gómez; Sarmiento, 2016).

Already some plant species have been described in the literature that are able to promote phytoremediation of the herbicide atrazine satisfactorily (Ibrahim *et al.*, 2013; Merini *et al.*, 2009; Moore, Locke; Kröger, 2017). However, despite advances, the number of plant species with this potential is insufficient. This is true not only for atrazine but also for other organic compounds and heavy metals harmful to environment. In addition, the fact that a plant species is able to degrade compound in a given locality does not guarantee that it is effective in other environments since, as previously mentioned, a number of factors influence this process. Thus, prospecting studies by species phytoremediative plants have grown quite a lot in recent years.

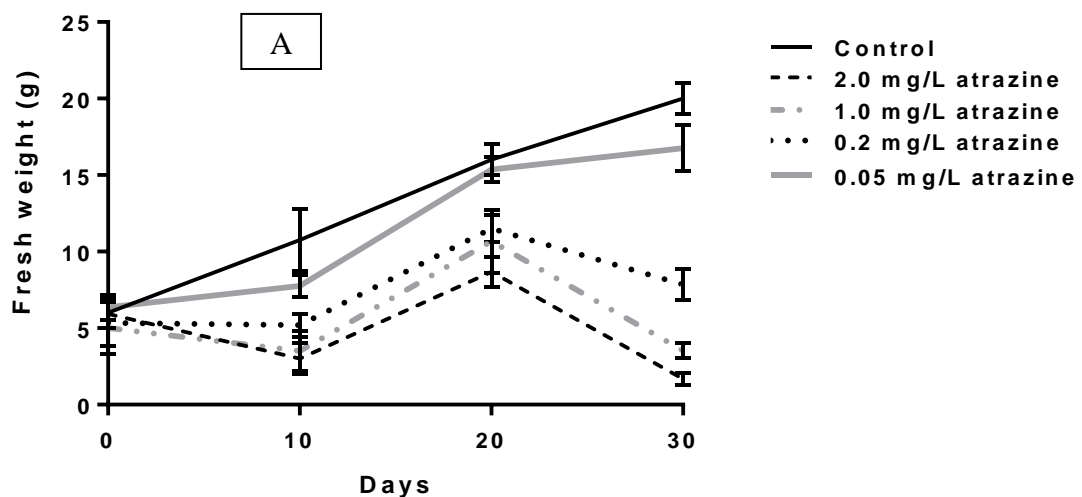
In this context, the aim of this work was to evaluate the potential of *M. oleifera* phytoremediation of atrazine, common in soils and waters of several regions of the world, including Brazil. Various characteristics and properties of this plant species credit it as an application potential for this purpose. It is noteworthy, adaptability to Brazil's soil and climate conditions, in particular the Ceará, its high growth rate and resistance to a number of factors biotic and abiotic.

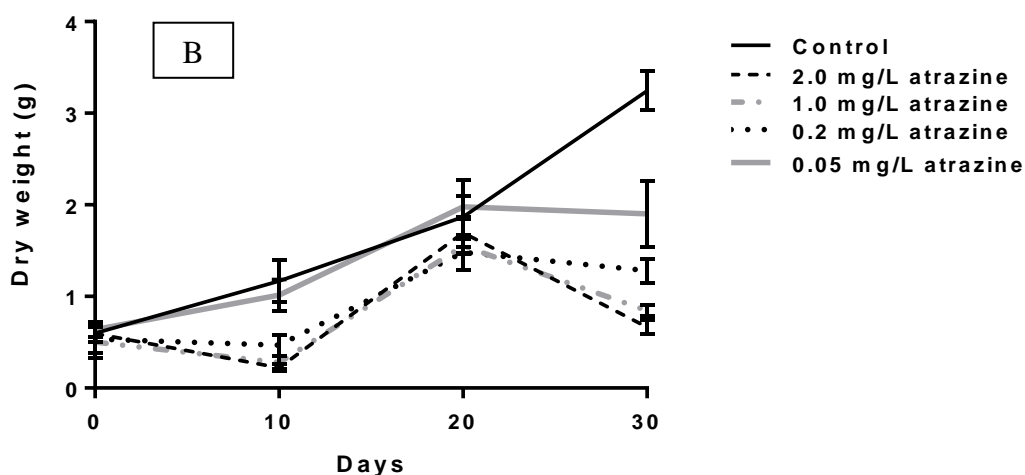
The germination process of this plant was fast (7-10 days) and simple, counting only with the steps of disinfestation of the seeds with sodium hypochlorite and breaking dormancy with distilled water for one hour. The hydroponic plantation was chosen in this work because it treats the water of a less complex medium, in which the atrazine would be more available for plant uptake, which would facilitate a subsequent quantification of residual atrazine contents. In addition, the root tissue of *M. oleifera* is very fragile, being difficult, when in solid medium, its obtaining, necessary for the performance of biochemical analyzes.

3.1. Effects of atrazine on *M. oleifera* biomass

Effects of atrazine on biomass (fresh and dry weight) of *M. oleifera* plants are shown in Figure 1. Exposure of *M. oleifera* to herbicide stress treatments affected plant growth causing a significant decrease in fresh (FW) and dry weights (DW), when compared with the control. The losses in fresh weight (Figure 1A) were proportional to the concentration of atrazine administered, being the 0.05 mg.L⁻¹ treatment less toxic to the plants. In addition, all atrazine treated plants showed signs of phytotoxicity (foliar necrosis, wilting and chlorosis). This symptoms were lighter for 0.05 mg.L⁻¹ concentration. In relation to dry weight, it was observed that the plants treated with atrazine at the concentration of 2.0, 1.0 and 0.2 mg.L⁻¹ presented worst performance when compared with control plants, but statistically similar values between them. However, plants treated at a dose of 0.05 mg.L⁻¹ atrazine showed similar performance to the control, except in relation to the last days of experiment, when a stability on dry weight were observed (Figure 1B).

Figure 1 – Biomass gain evaluation of *Moringa oleifera* plants treated (2.0, 1.0, 0.2, 0.05 mg.L⁻¹) and not treated (control) with atrazine. (A) Biomass gain expressed as fresh weight (g) and the (B) biomass gain expressed as dry weight (g).





3.2. Soluble protein contents

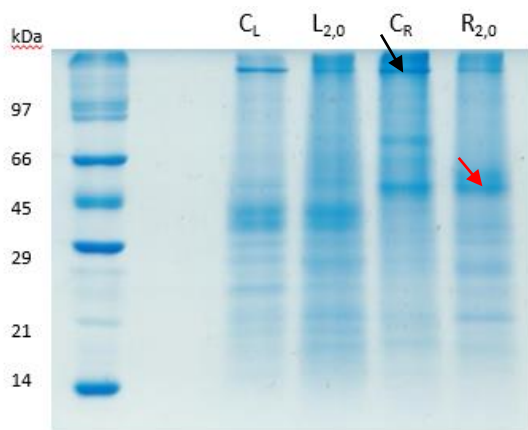
In general, the leaves presented a higher protein content when compared to the roots. In addition, both leaves and roots of *M. oleifera* treated with atrazine showed lower protein content than the control plants (data not shown). The proteins in plants are responsible, among many functions, for the defense of biotic or abiotic stress (Jones; Dangl, 2006). Consequently, alterations in protein content in many plants submitted to contact with organic and inorganic compounds are common. These alterations are dependent on plant species and stressor agent.

3.3. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

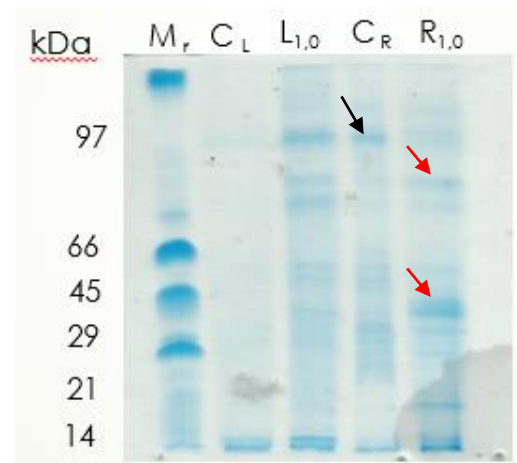
The electrophoretic profiles of extracts obtained from leaves and roots of plants treated with atrazine at the concentrations of 2.0, 1.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹ were evaluated (supplementary data). In general, were observed differences between control plants and those treated with atrazine. Figure 2, for example, represents the protein profile at 30-days treatment. It was observed that the main alterations occurred in the roots of plants treated with atrazine at the concentrations of 2.0, 1.0, 0.2 mg.L⁻¹ when compared with the leaves. Electrophoresis gels showed the presence of protein bands not present in their respective

controls, or the opposite, the absence of protein bands, which were present in the controls. The major changes observed in roots can be explained by the greater contact of this tissue with atrazine.

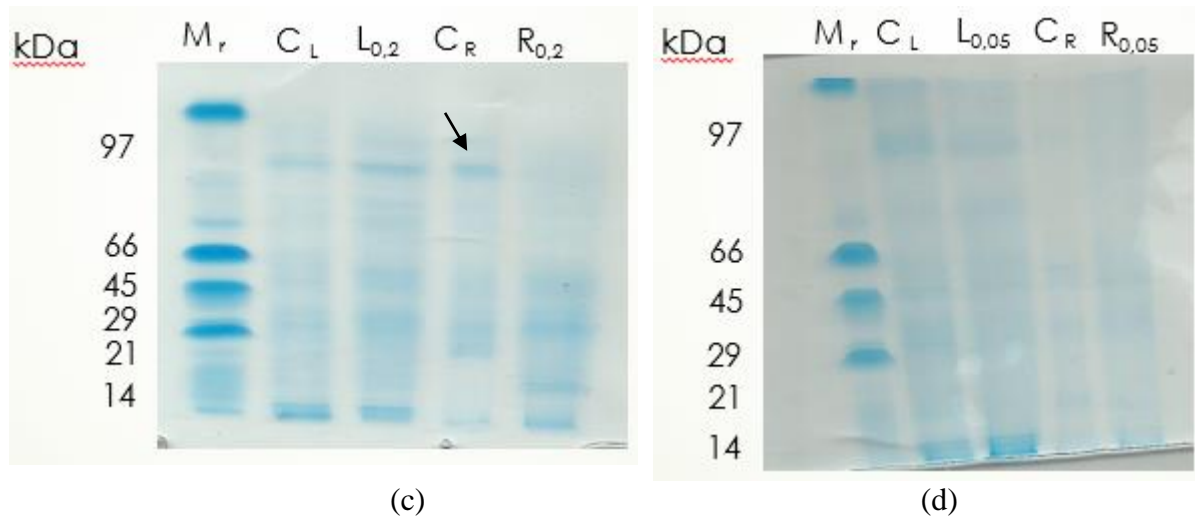
Figure 2 - SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoretic profile (12.5 %) of leaf and roots extracts of *M. oleifera* plants treated with atrazine solutions (2.0, 1.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹) at 30 days. Black and red arrows represent proteins that were underexpressed and superexpressed, respectively. Mr - Molecular mass markers; CL - Protein extract from control leaves; L2, L1, L0.2 and L0.05 - Protein extract from leaves of *M. oleifera* treated at the dose of 2.0, 1.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹, respectively; CR - Protein extract from control roots; R2, R1, R0.2 and R0.05 - Protein extract from roots of *M. oleifera* treated at the dose of 2.0 (a), 1.0 (b), 0.2 (c) and 0.05 (d) mg.L⁻¹, respectively. Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250.



(a)



(b)



3.4. Shoot/roots ratio

Roots, stems and leaves are functionally interdependent tissues and these three systems maintain a dynamic balance in biomass which reflects relative abundance of above-ground resources (light and CO₂) compared with root-zone resources (water and nutrients). The shoot:root ratio is one measure to assess the overall health of the plants. Any changes from the normal (control) level (either up or down) would be an indication of a change in the overall health of the plants (Fageria and Moreira, 2011).

Table 1 shows the shoot:root ratios observed by *M. oleifera* treated with different doses of atrazine for the periods of 10, 20 and 30-days. At 10-days period, only the shoot:root ratio of plants treated with 2.0 mg.L⁻¹ atrazine (1.8 ± 0.08) showed a decrease in relation to control plants (2.5 ± 0.25). For the 20-days period, there was no alterations of the ratio, except for 0.2 mg.L⁻¹ atrazine (3.5 ± 0.09), which was lower than the control plants (4.0 ± 0.40). In relation to 30-days time, all treatments presented lower ratios when compared with control, especially for 2.0 and 1.0 mg.L⁻¹ atrazine. In summary, the treatment of *M. oleifera* plants with atrazine caused a decrease in shoot:root ratios, mainly for the 30-days period and/or for the higher

dose of atrazine. This may be an indicative that longer contact times and/or high doses of atrazine can cause disturbance health of the plant.

3.5. *Total pigment*

The levels of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll of leaves from *M. oleifera* plants treated with atrazine are shown in Table 1. In general, all plants treated with atrazine showed a lower content of chlorophyll, especially for the chlorophyll a. However, when analyzed the total chlorophyll content, it was observed more heterogeneous values between the treatments, with some of them presenting higher, lower and equal content in relation to control plants, being possible to trace a dose or time dependence exposure relations.

Table 1 – Effects of atrazine on shoot/root ratio, total carotenoid, chlorophyll a, b and total in *Moringa oleifera* plants. Average \pm standard error from four separate replicates. Values with different letters are different determined by Tukey's test.

Time (days)	Treatment (mg/L atrazine)	Shoot/Root ratio	Total carotenoid	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll
10	Control	2.5 \pm 0.25 ^a	189.4 \pm 10.7 ^{ab}	950.4 \pm 21.6 ^a	520.4 \pm 20.1 ^a	1558.5 \pm 42.1 ^a
	2.0	1.8 \pm 0.08 ^b	157.1 \pm 11.8 ^c	554.2 \pm 34.8 ^b	364.0 \pm 36.6 ^b	996.5 \pm 31.6 ^c
	1.0	2.4 \pm 0.09 ^a	158.0 \pm 12.7 ^c	734.2 \pm 33.9 ^b	521.5 \pm 34.0 ^a	1317.8 \pm 24 ^b
	0.2	2.3 \pm 0.05 ^a	201.9 \pm 10.6 ^a	950.0 \pm 26.1 ^a	494.9 \pm 10.1 ^a	1574.9 \pm 53.3 ^a
	0.05	2.7 \pm 0.09 ^a	178.1 \pm 13.1 ^b	871.6 \pm 34.1 ^a	506.4 \pm 30.1 ^a	1523.0 \pm 43.0 ^a
20	Control	4.0 \pm 0.40 ^a	130.6 \pm 5.9 ^c	606.6 \pm 16.7 ^b	544.6 \pm 33.1 ^a	1252.1 \pm 28.9 ^b
	2.0	3.9 \pm 0.11 ^a	170.1 \pm 10.9 ^b	490.2 \pm 11.1 ^c	324.1 \pm 3.4 ^c	916.0 \pm 32.7 ^d
	1.0	4.2 \pm 0.02 ^a	120.4 \pm 6.5 ^c	668.7 \pm 17.9 ^b	468.3 \pm 7.3 ^b	1030.8 \pm 44.1 ^c
	0.2	3.5 \pm 0.09 ^b	96.0 \pm 4.8 ^d	457.1 \pm 22.7 ^c	365.5 \pm 28.7 ^c	974.7 \pm 23.1 ^{cd}
	0.05	4.4 \pm 0.44 ^a	190.1 \pm 13.5 ^a	925.2 \pm 56.8 ^a	555.0 \pm 42.7 ^a	1679.7 \pm 67.8 ^a
30	Control	8.2 \pm 0.75 ^a	140.9 \pm 7.4 ^c	731.7 \pm 45.9 ^a	483.7 \pm 12.0 ^{ab}	1263.4 \pm 25.8 ^b
	2.0	3.3 \pm 0.14 ^c	229.9 \pm 21.1 ^b	651.5 \pm 34.8 ^b	446.4 \pm 40.2 ^b	1179.9 \pm 43.6 ^b
	1.0	3.0 \pm 0.05 ^c	329.4 \pm 35.7 ^a	795.3 \pm 27.9 ^a	543.9 \pm 10.8 ^a	1374.2 \pm 34.4 ^a
	0.2	4.8 \pm 0.17 ^b	290.1 \pm 24.9 ^a	459.1 \pm 33.3 ^c	470.6 \pm 55.7 ^{ab}	980.3 \pm 21.6 ^c
	0.05	4.3 \pm 0.21 ^b	125.2 \pm 9.7 ^c	451.4 \pm 37.3 ^c	507.2 \pm 16.8 ^a	1064.3 \pm 35.6 ^c

3.6 Enzymatic assays

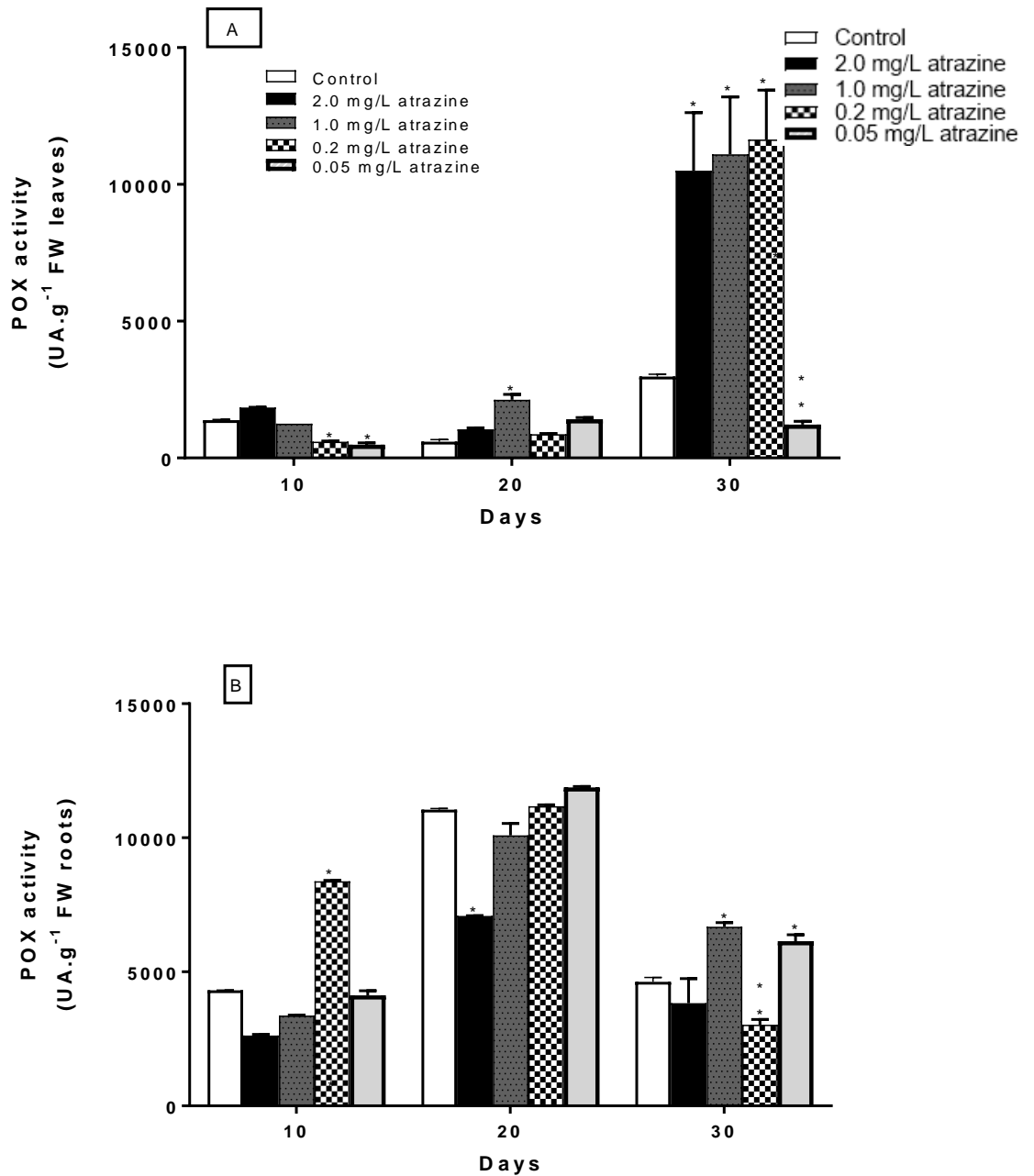
As mentioned before, some biotic and abiotic stress may alter the arsenal and content of some proteins in plants (War *et al.*, 2011). Previous data obtained by our research group, for example, showed that *M. oleifera* plants treated with the herbicide atrazine presented higher levels of some enzymes related to oxidative stress when compared with no treated plants.

3.6.1 Guaiacol peroxidase (POX; EC 1.11.1.7) activity

Figure 3 (A and B) shows the guaiacol-dependent peroxidase (POX) activities of leaves and roots of *M. oleifera* plants treated and not treated (control) with atrazine (2.0, 1.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹) at 10, 20 and 30 days. At the first 20 days, the content of POX in leaves treated with atrazine were similar to those found for control plants, except for plants treated with atrazine at a concentration of 1.0 mg.L⁻¹. In this case, the leaves presented a content of POX of 2.129 UA.g⁻¹ leaves, which represents almost twice the value found for control (591 UA.g⁻¹ leaves). However, at 30 days, the content of peroxidase in relation to control plants (2.973 UA.g⁻¹ leaves) increased considerably for all treatments, except for the treatment of 0.05 mg/L of atrazine (1.220 UA.g⁻¹ leaves). The content of peroxidase was 10.500, 11.100 and 11.642 UA.g⁻¹ leaves for 2.0, 1.0 and 0.2 mg.L⁻¹ of atrazine, respectively (Figure 3A).

In relation to roots, the results of peroxidase content do not seem to have been dependent on the concentration of atrazine administered and/or the time of exposure to the herbicide. For example, in the 10-day period, the highest content of peroxidase was observed for the 0.2 mg.L⁻¹ atrazine treatment (Figure 3B). In relation to 20-day, all plants analyzed, including the control, presented higher content of peroxidase compared with the other exposure times. For 30-days period, the peroxidase activity decreased and showed to be similar to those observed for 10-days period.

Figure 3 – Guaiacol peroxidase activity (POX) of leaves (A) and roots (B) of *M. oleifera* plants not treated (control) and treated with atrazine at doses of 2.0, 1.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹. The POX activity was expressed as Units of Activity (UA) per gram of fresh weight (g FW). Different symbols indicate significant differences ($p < 0.05$) compared to the control group.



Atrazine is a photosynthetic herbicide that blocks the flow of electron through photosystem II, and thus blocks the transfer of excitation energy from chlorophyll to the

photosystem I reaction center (Alla; Hassan, 2006). Consequently, an oxidative stress is formed leading to production of reactive oxygen species (ROS) which may lead to damage in biomacromolecules such lipid, protein and DNA. The most important mechanism used by plants to prevent the effects of these ROS is through ROS scavenging. Antioxidants enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidases are important in the removal of ROS, and normally are induced when plants are under an oxidative stress (Erinle *et al.*, 2016). In the present work, the contact of *M. oleifera* with atrazine, probably, caused an oxidative stress that was responsible for a significant alterations of peroxidase levels in leaves and roots.

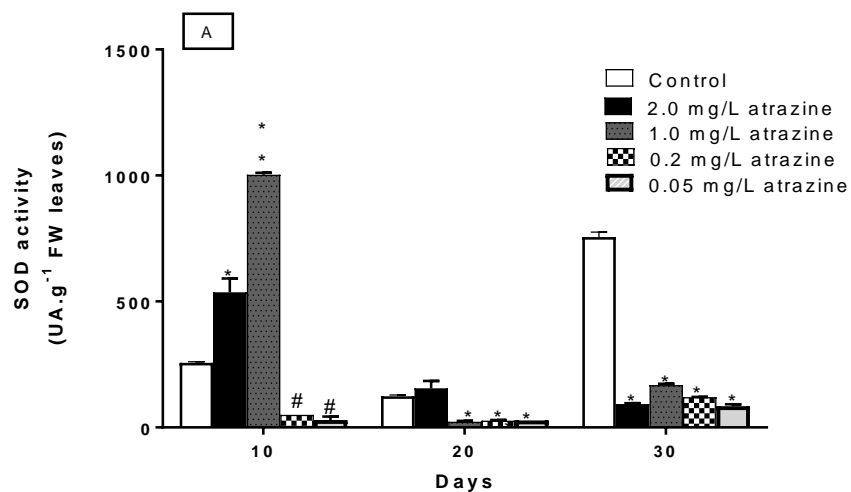
3.6.2 Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity

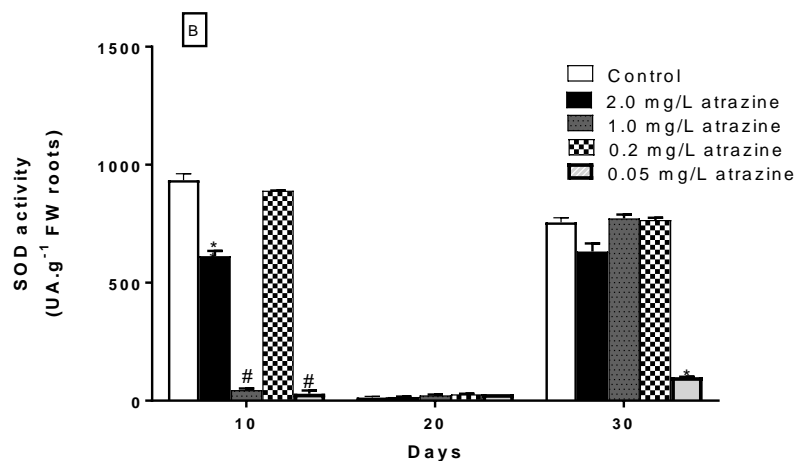
Figure 4 shows the results for the enzyme superoxide dismutase (SOD). Leaves treated at the concentration of 2.0 mg.L⁻¹ atrazine, for a period of 10 days presented high (536 UA.g⁻¹ leaves) SOD activity when compared with control plants (257 UA.g⁻¹ leaves). However, the plants treated at 1.0 mg.L⁻¹ presented content of SOD even higher (1003 UA.g⁻¹ leaves) than 2.0 mg.L⁻¹ treatment, and the control. Curiously, plants of the 20-day period showed very low content of SOD activity (\approx 25 UA.g⁻¹ leaves). For 30-days period, the SOD activity decreased for all treatments in relation to control plants (Figure 4A).

In general, the roots presented similar or lower content of SOD activity than the the control plants, for all treatments. However, it was no possible to trace a relation between the dose administered or time of exposure (Figure 4B). Superoxide dismutases play a key role in the defense system oxidation through the dismutation of O₂⁻ to H₂O₂ and O₂. SODs are metalloenzymes that occur in three different molecular forms, containing metals Mn, Fe or Cu/Zn as prosthetic groups (Fridovich, 1986). It has been reported that the photooxidative stress caused by the herbicide paraquat, for example, strongly modifies the activity of SOD and the level of Cu/Zn-SOD protein in leaves (Bowler *et al.*, 1992). Several studies show

correlations between plant resistance to herbicides to oxidative stress and SOD activity. In the present work, except for the leaves exposed for 10-days, the contact plants with atrazine was not able to induce the production of this enzyme.

Figure 4 – Superoxide dismutase activity (SOD) of leaves (A) and roots (B) of *M. oleifera* plants not treated (control) and treated with atrazine at doses of 2.0, 1.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹. The SOD activity was expressed as Units of Activity (UA) per gram of fresh weight (g FW). Different symbols indicate significant differences ($p < 0.05$) compared to the control group.





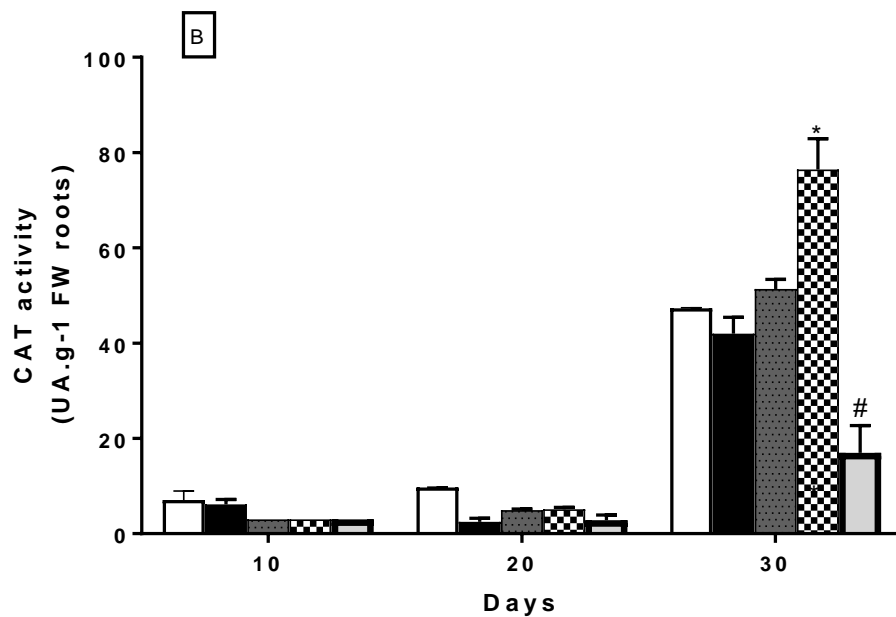
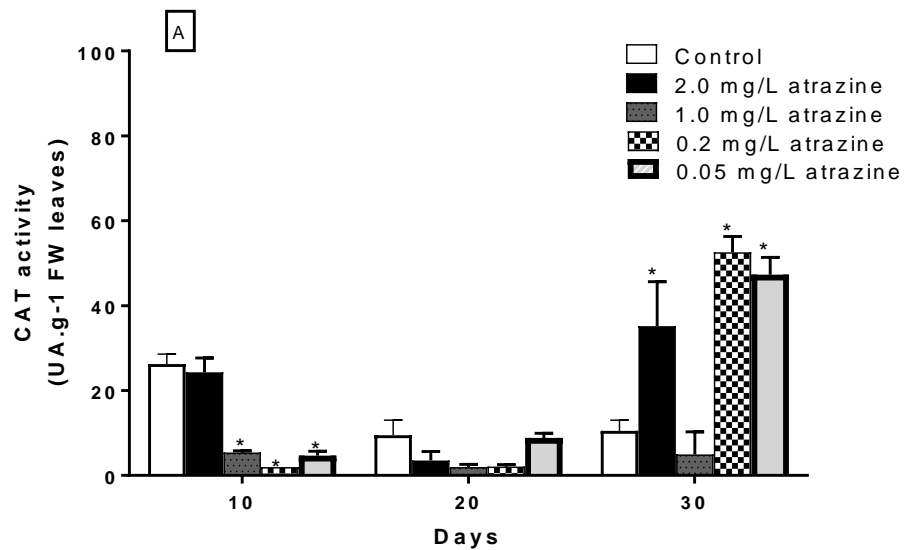
3.6.3 Catalase (CAT; EC. 1.11.1.6) activity

Figure 5 shows the results of the enzyme catalase (CAT). At 10- and 20-days, the leaves presented similar or lower content of CAT activity in relation to control plants (26 and 9.5 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW Leaves min}^{-1}$, respectively), for all treatments. At 30-days period, it was observed an increase in the content of CAT for all treatments, except for the dose of 1 mg/L (5 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW leaves min}^{-1}$). The content of catalase present for 2.0, 0.2 and 0.05 mg/L atrazine were 35, 53 and 47 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW leaves min}^{-1}$, respectively (Figure 5A).

In relation to roots, it was observed similar CAT activities for all treatments at 10- ($\approx 6 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW roots min}^{-1}$) and 20-days ($\approx 7 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW roots min}^{-1}$) periods in relation to control plants. At 30-days the roots showed similar or lower content of CAT when compared with control, except for 0.2 mg/L treatment, which presented higher enzymatic activity (76 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW roots min}^{-1}$) than control roots (47 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW roots min}^{-1}$) (Figure 5B).

Catalase, found in plant glyoxysomes, decomposes hydrogen peroxide (H_2O_2) into water (H_2O) and oxygen gas (O_2) (Aebi, 1984). Carvalho *et al.*, 2012 observed that plants treated with herbicides develop defense mechanisms through oxidative agents, with emphasis on the enzyme catalase.

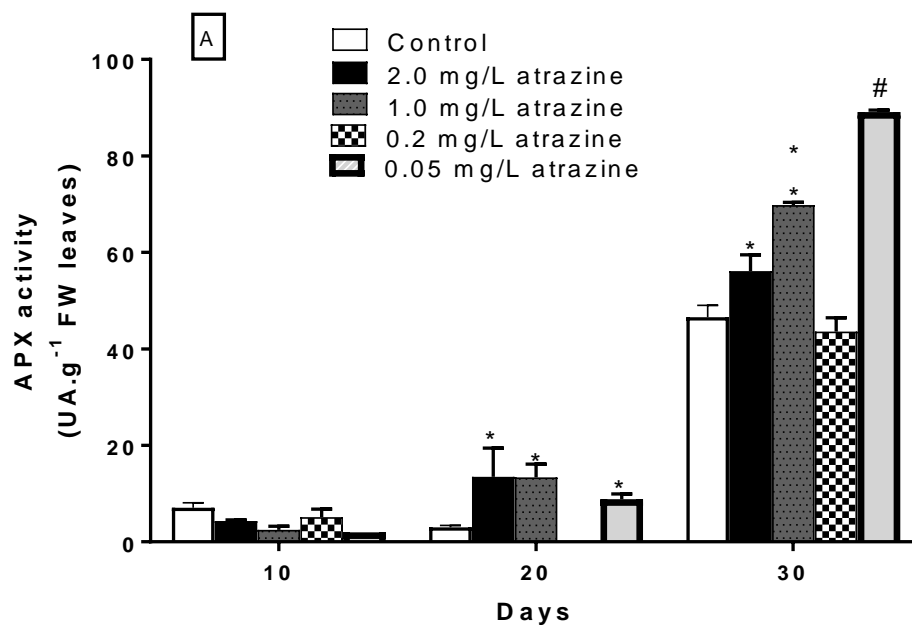
Figure 5 - Catalase activity (CAT) of leaves (A) and roots (B) of *M. oleifera* plants not treated (control) and treated with atrazine at doses of 2.0, 1.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹. The POX activity was expressed as Units of Activity (UA) per gram of fresh weight (g FW). Different symbols indicate significant differences ($p < 0.05$) compared to the control group.

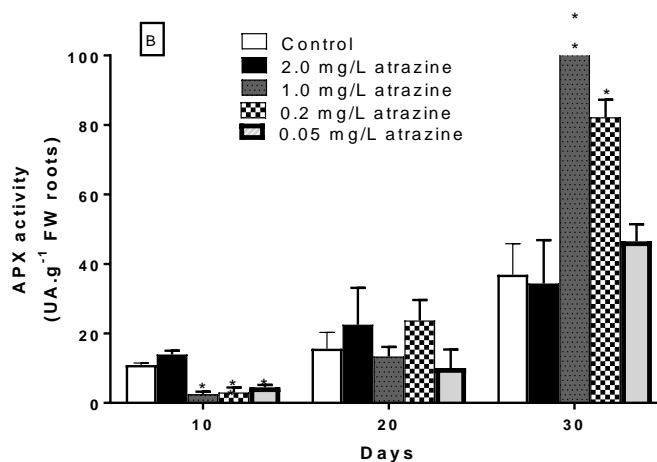


3.6.4 Ascorbate peroxidase (APX; EC. 1.11.1.11) activity

In relation to the enzyme ascorbate peroxidase (APX), Figure 6A shows that at the 10-days period there was no difference between the leaves of plants treated with atrazine and the control. Otherwise, at 20 and 30-days periods was observed an increase of the APX activity for 2.0, 1.0 and 0.05 mg/L treatments. Analyzing the roots, we observed that the 0.2 mg/L treatment was the only one presenting APX content higher than the control roots (Figure 6B).

Figure 6 – Ascorbate peroxidase activity (APX) of leaves (A) and roots (B) of *M. oleifera* plants not treated (control) and treated with atrazine at doses of 2.0, 1.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹. The APX activity was expressed as Units of Activity (UA) per gram of fresh weight (g FW). Different symbols indicate significant differences ($p < 0.05$) compared to the control group.





APXs are enzymes that detoxify peroxides such as hydrogen peroxide and use ascorbate as a substrate. They catalyze the transfer of electrons from ascorbate to a peroxide, producing dehydroascorbate and water products (Raven *et al.*, 1999). Langaro *et al.*, 2013 found an activation of the antioxidant system, especially the enzyme ascorbate peroxidase (APX) in rice plants when submitted to herbicide. Treatment with penoxsulam resulted in a decrease in APX activity up to eight hours after application. It is believed that peroxidases play a substantial role in the elimination of xenobiotic-induced cell damage. Because it is predominantly cytosolic and organelle, APX uses ascorbate as its specific electron donor to eliminate H₂O₂ produced by SOD through the Halliwell-Asada pathway (Miteva *et al.*, 2005).

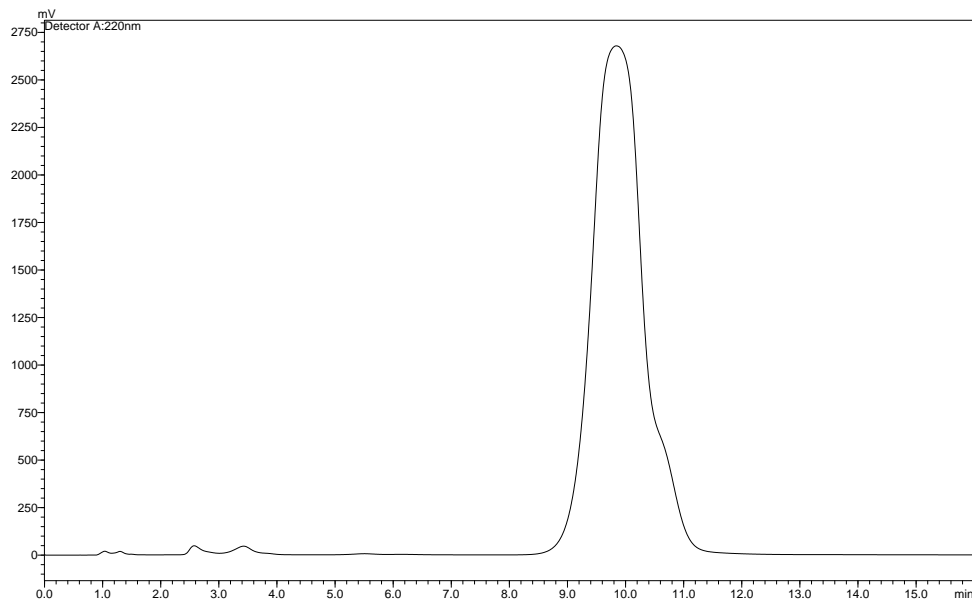
3.7 Evaluation of the phytoremediation of contaminated water with atrazine by *M. oleifera* plants

For the evaluation of phytoremediation capacity of *M. oleifera*, water samples were artificially contaminated with the herbicide atrazine (2.0, 1.0, 0.2 and 0.02 mg.L⁻¹). Then, moringa plants were contacted with these solutions for periods of 10, 20 and 30 days. At the end of the experiment, the plants were removed from the hydroponic medium and aliquots of water from each sample were used for the evaluation of the percentage of removal

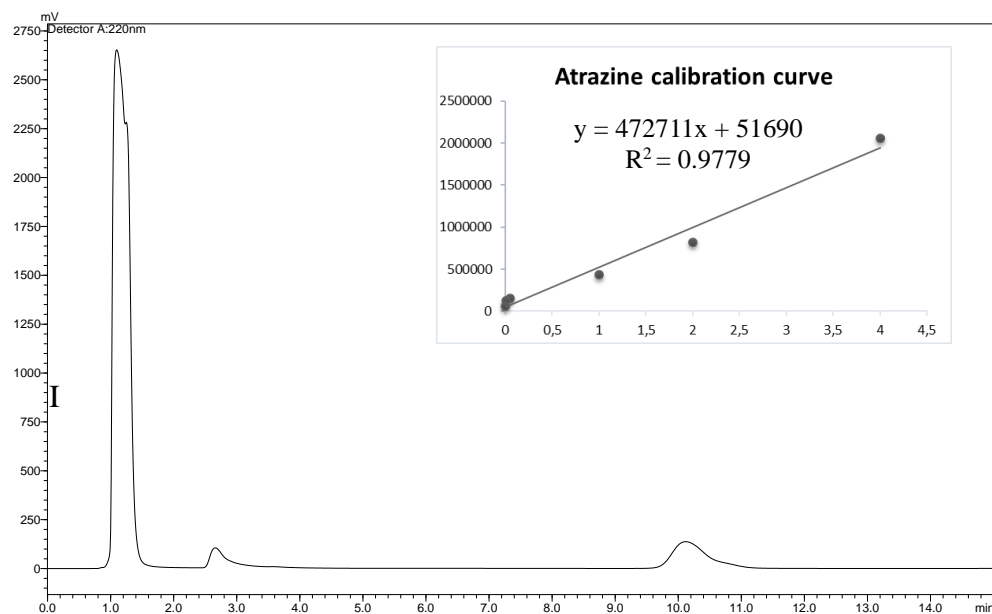
of atrazine by plants. This quantification was performed through the use of high performance liquid chromatography (HPLC). Figure 7 shows an example of the chromatographic profile obtained after injection of the atrazine chromatographic standard (Supelco). The retention time (RT) observed for atrazine under the conditions employed was 10.8 minutes. After the definition of TR, a calibration curve was constructed using atrazine at concentrations of 4.0, 2.0, 1.0, 0.2, 0.05, 0.005, 0.0005 mg.L⁻¹.

Figure 7 - Chromatographic profile of the standard atrazine and the water sample at HPLC system.

(a)



b)



- (a) Chromatographic standard applied at the concentration of 100 mg.L⁻¹. (b) Sample of water containing atrazine residual of the concentration of 2.0 mg.L⁻¹. Insert: Atrazine calibration curve.

M. oleifera plants were able to reduce the contents of atrazine. For this study, the best results for atrazine reduction rate were within 30 days. The concentrations of 2.0, 0.2 and 0.05 mg.L⁻¹ were observed, with a reduction of 71.08, 87.15 and 78.06 %.

There are some reports in the plant literature that degrade organic compounds to the environment. Concerning degradation of atrazine specifically there are also several studies. For example, it was shown by Chang and Lee (2005), that some species of poplars are capable of capturing, hydrolyzing and dealkylating atrazine to metabolites less toxic. Earlier work showed that the species *Leucophyllum langmaniae* was able to reduce the levels of atrazine in soil by 35 %, however, in a period of more than 60 days (Kruger *et al.*, 1997).

Iris pseudacorus species, *Lythrum salicaria* and *Acorus calamus*, reduced the atrazine in 75.6, 65.5 and 61.8 %, respectively, in a hydroponic system similar to that employed in this study. These rates of atrazine in water occurred within a period of 20 days (Wang *et al.*, 2012). Like this, in general, the comparison of the data obtained in this study with the found in the literature shows the great potential of *M. oleifera* as an atrazine phytoremediation plant, studies for its potential degradation of other classes of organic compounds.

4 Conclusion

The treatment of *M. oleifera* plants with atrazine showed that, despite of the alteration in the contents of some enzymes related to oxidative stress as, for example, the increase in peroxidase levels, apparently is resistant to this herbicide. The data that corroborate with this observation are: (1) the relative biomass gain of plants treated with atrazine at a dose (0.05 mg.L^{-1}) about 50 times greater than the maximum amount allowed; (2) the low effect on the content of photosynthetic pigments. In addition, the plant was able to reduce the content of atrazine in the water at a rate of almost 80% for the highest dose of atrazine tested (2.0 mg.L^{-1}) after 30 days of treatment. Thus, the data obtained showed that plants of *M. oleifera* important properties for employment in phytoremediation of the herbicide atrazine, revealing the biotechnological of this species in the environmental context.

References

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, n. 6, p. 50-60, 2011.

AEBI, H. Catalase in vitro. **In: Methods in enzymology**. Academic Press. p. 121-126, 1984.

ALLA, M. M. N.; HASSAN, N. M. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 202-210, 2006.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.43, p.83-116, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL, D. R.; RESENDE, B. F. F.; ZIM, L. F. O agravamento da poluição química das águas subterrâneas. **Revista Direito Ambiental e Sociedade**, v. 6, n. 1, 2016.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very

sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CARVALHO, S. J. P.; MACHADO, E. C. R.; MARQUES, B. S.; SILVA, A. P. P.; LIMA, R. S. O.; COSTA, R. Atividade relativa da catalase de losna-branca (*Parthenium hysterophorus*) comparada à de outras espécies daninhas. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 395-400, 2012.

CHANG, S. W.; LEE, S. J. Phytoremediation of atrazine by poplar trees: toxicity, uptake, and transformation. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 40, n. 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 Bio/Technology**, v. 15, n. 2, p. 299-326, 2016.

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

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. Access in: 30 July 2018.

ENG, A.; WALLS, C.; DRYSON, E. McLEAN, D. KOGVINAS, M.; FOWLES, J.; BORMAN, B.; O'CONNOR, P.; CHENG, S.; BROOKS, C.; SMITH, A. H.; PEARCE, N.

Serum concentrations of chlorinated dibenzo-p-dioxins, furans and PCBs, among former phenoxy herbicide production workers and firefighters in New Zealand. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 89, n. 2, p. 307-318, 2016.

ERINLE, K. O.; JIANG, Z.; LI, M.; SU, G.; MA, B.; MA, Y.; ZHANG, Y. Oxidative stress response induced in an atrazine phytoremediating plant: Physiological responses of *Pennisetum glaucum* to high atrazine concentrations. **International Journal of Phytoremediation**, v. 18, p. 1187-1194, 2016.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 247, n. 1, p. 1-11, 1986.

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

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, n. 1, p. 69-75, 2013.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**. v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

KANG, J. W. Removing environmental organic pollutants with bioremediation and phytoremediation. **Biotechnology letters**, v. 36, n. 6, p. 1129-1139, 2014.

KAWAHIGASHI, H. Transgenic plants for phytoremediation of herbicides. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 225-230, 2009.

KIELY, T.; DONALDSON, D.; GRUBE, A. Pesticides industry sales and usage: 2000 and 2001 market estimates. **Washington, DC: US Environmental Protection Agency**, 2004.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v. 34, n. 5, p. 713-721, 1993.

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, n. 3, p. 131-139, 2006.

KRUGER, E. L.; RICE, P. J.; ANHALT, J. C.; ANDERSON, T. A.; COATS, J. R. Comparative fates of atrazine and deethylatrazine in sterile and nonsterile soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 26, n. 1, p. 95-101, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LANGARO, A. C.; OLIVEIRA, C.; ULGUIM, A. R.; RUCHEL, Q.; TESSARO, D.; AGOSTINETTO, D. Ativação do sistema antioxidante enzimático em plantas de arroz submetidas à aplicação de penoxsulam. In: **VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO**, Santa Maria, RS. 2013.

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**, v. 168, p. 1230-1247, 2017.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **The Journal of Agricultural Science**, v. 128, n. 3, p. 311-322, 1997.

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 & Technology**, v. 3, n. 2, p. 131-139, 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.

MÉCHIN, V.; DAMERVAL, C.; ZIVY, M. Total protein extraction with TCA-acetone. **Plant Proteomics**. Humana Press. p. 1-8, v. 335, 2007.

MOORE, M. T.; LOCKE, M. A.; KRÖGER, R. Mitigation of atrazine, S-metolachlor, and diazinon using common emergent aquatic vegetation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 56, p. 114-121, 2017.

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, n. 11, p. 3059-3063, 2009.

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, n. 5, p. 517-522, 1987.

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

PINHEIRO, A. I.; MILHOME, M. A. L.; FERREIRA, F. E. F. R.; COSTA, R. S.; SANTOS, J. L. G.; OLIVEIRA, L. K. B.; AMORIM, A. V. Potencial de contaminação em águas superficiais pelo uso de agrotóxicos em Iguatu, Ceará. **Encontro Regional de Agroecologia do Nordeste**, v. 1, n. 1, 2017.

RAVEN, E. L.; LAD, L.; SHARP, K. H.; MEWIES, M.; MOODY, P. C. Defining substrate specificity and catalytic mechanism in ascorbate peroxidase. In: **Biochemical Society Symposia. London; Portland on behalf of The Biochemical Society**. p. 27-38, 1999.

SAJIDU, S. M. I.; HENRY, E. M. T.; PERSSON, I.; MASAMBA, W. R.; KAYAMBAZINTHU, D. pH dependence of sorption of Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} and Cr^{3+} on crude water and sodium chloride extracts of *Moringa stenopetala* and *Moringa oleifera*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 23, 2006.

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, n. 2, p. 946-962, 2015.

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, p. 350-358, 2017.

TRUU, J.; TRUU, M.; ESPENBERG, M.; NÕLVAK, H.; JUHANSON, J. Phytoremediation and plant-assisted bioremediation in soil and treatment wetlands: a review. **Open Biotechnol J**, v. 9, p. 85-92, 2015.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum (Poland)**, 1991.

van ROSSUM, M. W. P. C; ALBERDA, M.; van der PLAS, L. H. W. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. **Plant Science**, v. 130, n. 2, p. 207-216, 1997.

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

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; WAR, M. Y.; IGNACIMUTHU, S. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 11, p. 1787-1792, 2011.

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**, v. 182, p. 228-234, 2017.

5 CONCLUSÃO

O tratamento de plantas de *M. oleifera* com atrazina mostrou que, apesar da alteração no teor de algumas enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, como, por exemplo, o aumento nos níveis de peroxidase, aparentemente é resistente a este herbicida. Os dados que corroboram com esta observação são: (1) o ganho relativo de biomassa das plantas tratadas com atrazina na dose ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$) cerca de 50 vezes maior que a quantidade máxima permitida; (2) o baixo efeito no conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Além disso, a planta foi capaz de reduzir o teor de atrazina na água a uma taxa de quase 80% para a dose mais alta de atrazina testada ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) após 30 dias de tratamento. Assim, os dados obtidos mostraram que as plantas de *M. oleifera* são propriedades importantes para o emprego na fitorremediação do herbicida atrazina, revelando a biotecnologia dessa espécie no contexto ambiental.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BANERJEE, S.; DATTA, S.; CHATTYOPADHYAY, D.; SARKAR, P. Arsenic accumulating and transforming bacteria isolated from contaminated soil for potential use in bioremediation. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 46, n. 14, p. 1736-1747, 2011.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276- 287, 1971.
- BERGSTELDT, M. Moringa oleifera seeds for water treatment in water-stressed areas. **Disponível em:** <<https://www.aiche.org/chenected/2011/10/moringa-oleifera-seeds-water-treatment-water-stressed-areas>> Acesso em: 12 de fevereiro de 2018.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651, 2007.
- BONFLEUR, E. J. Comportamento da associação entre os herbicidas glifosato e atrazina em um Latossolo vermelho-escuro do bioma cerrado brasileiro. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**. 2010
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução no 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 18 mar. n. 053, p. 58-63. 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 518, de 25 de março 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 26 mar. 2004.
- CANUTO, T. G.; GAMA, A. F.; BARRETO, F. M. S.; ALENCAR NETO, M. F. Estimativa do risco potencial de contaminação por pesticidas de águas superficiais e subterrâneas do município de Tianguá-CE, com aplicação do método de Goss e índice de Gus. **Águas Subterrâneas**, 2010.
- CARMO, D. A. D.; CARMO, A. P. B. D.; PIRES, J. M. B.; OLIVEIRA, J. L. Environmental behavior and toxicity of herbicides atrazine and simazine. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, n. 1, p. 133-143, 2013.
- CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PHOENCHIRASILP, S.; MORALES,

N. P. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 439-446, 2008.

COSTA, V. I. B.; MELLO, M. S. C.; FRIEDRICH, K. Exposição ambiental e ocupacional a agrotóxicos e o linfoma não Hodgkin. **Saúde em Debate**, v. 41, n. 112, p. 49-62, 2017.

DIETZ, A. C.; SCHNOOR, J. L. Advances in phytoremediation. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. Suppl 1, p. 163, 2001.

DOTY, S. L.; JAMES, C. A.; MOORE, A. L.; VAJZOVIC, A.; SINGLETON, G. L.; MA, C.; KHAN, Z.; XIN, G.; KANG, J. W.; PARK, J. Y.; MEILAN, R.; STRAUSS, S. H.; WILKERSON, J. FARIN, F.; STRAND, S. E. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 43, p. 16816-16821, 2007.

DOTY, S. L. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. **New Phytologist**, v. 179, n. 2, p. 318-333, 2008.

ESTIASIH, T.; SRIWAHYUNI, E. Nutrient Content of Kelor (*Moringa Oleifera* Lamk) Leaves Powder Under Different Blanching Methods. **Food and Public Health**, v. 2, n. 6, p. 296-300, 2012.

FARRAJI, H.; ZAMAN, N.; TAJUDDIN, R.; FARAJI, H. Advantages and disadvantages of phytoremediation: A concise review. **Int J Env Tech Sci**, v. 2, p. 69-75, 2016.

FEIJÃO, A. R.; Silva, J. C. B.; Marques, E. C.; Prisco, J. T.; Gomes-Filho, E. Efeito da nutrição de nitrato na tolerância de plantas de sorgo sudão à salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 675-683, 2011.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. D. F. U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 431-437, 2008.

FERREIRA, M. G.; GIORDANI, S.; OLIVEIRA, R. M.; STRIEDER, D. M.; MALACARNE, V. Environmental education in the science textbooks recommended by the didactic book national program 2016-2018. **Brazilian Journal of Development**, v. 4, n. 6, p. 3507-3517, 2018.

FERROA A. M.; KENNEDY J. A.; LARUE J. C. Phytoremediation of 1,4-dioxane-containing recovered groundwater. **Int J Phytoremediation** 15:911–923, 2013.

GALLÃO, M. I.; DAMASCENO, L. F.; DE BRITO, E. S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 1, p. 106-109, 2008.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K. D.; BERNHARD, T.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1243, n. 3, p. 477-481, 1995.

HAYES, T. B.; COLLINS, A.; LEE, M.; MENDONZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A. A.;

VONK, A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 8, p. 5476-5480, 2002.

HAYES, T. B.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; GALLIPEAU, S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 10, p. 4612-4617, 2010.

HAYES, T. B.; ANDERSON, L. L.; BEASLEY, V. R.; de SOLLA, S. R.; IGUCHI, T.; INGRAHAM, H.; LUQUE, E. H. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 127, n. 1, p. 64-73, 2011.

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

HOU, X.; HUANG, X.; AI, Z.; ZHAO, J.; ZHANG, L. Ascorbic acid induced atrazine degradation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 327, p. 71-78, 2017.

JAMES, C. A.; XIN, G.; DOTY, S. L.; STRAND, S. E. Degradation of low molecular weight volatile organic compounds by plants genetically modified with mammalian cytochrome P450 2E1. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 1, p. 289-293, 2007.

KANG, J. W. Removing environmental organic pollutants with bioremediation and phytoremediation. **Biotechnology letters**, v. 36, n. 6, p. 1129-1139, 2014.

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

LALAS, S.; GORTZI, O.; ATHANASIADIS, V.; TSAKNIS, J.; CHINO, I. Determination of antimicrobial activity and resistance to oxidation of *Moringa peregrina* seed oil. **Molecules**, v.17, n. 3, p. 2330-2334, 2012.

LANGARO, A. C.; OLIVEIRA, C.; ULGUIM, A. R.; RUCHEL, Q.; TESSARO, D.; AGOSTINETTO, D. Ativação do sistema antioxidante enzimático em plantas de arroz submetidas a aplicação de penoxsulam. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, Santa Maria, RS. 2013.

LEDUC, D. L.; TERRY, N. Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11-12, p. 514-520, 2005.

LIU, W. R.; YANG, Y. Y.; LIU, Y. S.; ZHANG, L. J.; ZHAO, J. L.; ZHANG, Q. Q.; YING, G. G. Biocides in wastewater treatment plants: Mass balance analysis and pollution load estimation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 329, p. 310-320, 2017.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **The Journal of Agricultural Science**, v. 128, n. 3, 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.

MEAGHER, R. B. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. **Current opinion in plant biology**, v. 3, n. 2, p. 153-162, 2000.

MEDEIROS, T. A. M. Efeito fitotóxico e potencial remediador de três espécies vegetais contaminadas com benzeno. 2015.

MENDES, F. M. Estudo do uso da *Moringa oleifera* para remoção de prata e manganês em águas. **Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, 2007.

MENDONÇA, Francisco. **Geografia e Meio Ambiente**. São Paulo: Editora Contexto, 1998.

MITEVA, L.; TSONEVA, J.; IVANOV, S.; ALEXIEVA, V. Alterations of the content of hydrogen peroxide and malondialdehyde and the activity of some antioxidant enzymes in the roots and leaves of pea and wheat plants exposed to glyphosate. **Dokladi na B lgarskata akademiâ na naukite**, v. 58, n. 6, p. 723-728, 2005.

MINISTÉRIO do Meio Ambiente – MMA. 2012. Segurança química e agrotóxicos. 30 de abril de 2012, **Brasília**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acessado em: 16 fev. 2017.

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.

PEREIRA, A. E. S. Nanopartículas de poli-épsilon caprolactona contendo o herbicida atrazina: do preparo e caracterização a avaliação da atividade herbicida. 2013. 113f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular)** - Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, São Paulo.

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

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H. T.; BIESMEIJER, J. C.; BREEZE, T. D.; DICKS, L. V.; VANBERGEN, A. J. The assessment report on pollinators, pollination and food production: summary for policymakers, 2016.

RAO, R. R.; GEORGE, M.; PANDALAI, K. M. Pterygospermin; the antibacterial principle of *Moringa pterygosperma*, Gaertn. **Nature**, v. 158, n. 4021, p. 745-745, 1946.

VESELÝ, T.; TLUSTOŠ, P.; SZÁKOVÁ, J. Organic acid enhanced soil risk element (Cd, Pb and Zn) leaching and secondary bioconcentration in water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) in the rhizofiltration process. **International journal of phytoremediation**, v. 14, n. 4, p. 335-349, 2012.

von ROSSUM M. W. P. C. V.; ALBERDA M.; VAN DER PLAS L. H. W. Role of oxidative

damage in tulip bulb scale micropropagation. **Plant Science**, v. 130, p. 207 – 216, 1997.

RAJKUMAR, M.; MA, Y.; FREITAS, H. Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. **Journal of environmental management**, v. 128, p. 973-980, 2013.

SARWAR, N.; IMRAN, M.; SHAHEEN, M. R.; ISHAQ, W.; KAMRAN, A.; MATLOOB, A.; HUSSAIN, S. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives. **Chemosphere**, 2016.

SACHAN, D.; JAIN, S. K.; SINGH, N. In-vitro & in-vivo efficacy of *Moringa oleifera* plant constituents in urolithiasis as antilithiatic drug. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 7, p. 1638-1644, 2011.

SCULLION, J. Remediating polluted soils. **Naturwissenschaften**, v. 93, n. 2, p. 51-65, 2006.
SERRAGLIO, H. Z.; GOMES, D. A responsabilidade civil decorrente do uso e da produção de agrotóxicos no Brasil. **Revista Direito Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 295-315, 2017.

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.

SILVA, C. P.; RICCI, T. G.; ARRUDA, A. L.; PAGLIOSA, F. M.; MACEDO, M. L. R. Extratos Vegetais de Espécies de Plantas do Cerrado Sul-Matogrossense com Potencial de Bioherbicida e Bioinseticida. **UNICIÊNCIAS**, v. 21, n. 1, p. 25-34, 2017.

SOLOMON, K. R.; CARR, J. A.; DU PREEZ, L. H.; GIESY, J. P.; KENDALL, R. J.; SMITH, E. E.; VAN DER KRAAK, G. J. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. **Critical reviews in toxicology**, v. 38, n. 9, p. 721-772, 2008.

SOUSA, A. S.; DUAVÍ, 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 Ceará, Brazil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 96, n. 1, p. 90-95, 2016.

STANTON, B.; EATON, J.; JOHNSON, J.; RICE, D.; SCHUETTE, B.; MOSER, B. Hybrid poplar in the Pacific Northwest: the effects of market-driven management. **Journal of Forestry**, v. 100, n. 4, p. 28-33, 2002.

SUBRAMANIAM, Sarasvathy; ROSDI, Muhammad Hafiz B.; KUPPUSAMY, Umah Rani. Customized Cooking Methods Enhance Antioxidant, Antiglycemic, and Insulin-Like Properties of *Momordica charantia* and *Moringa oleifera*. **Journal of Food Quality**, v. 2017, 2017.

TAVARES, S. R. L. Remediação de solos e águas contaminadas por metais pesados:

Conceitos básicos e fundamentos / Silvio Roberto de Lucena Tavares. **Rio de Janeiro, RJ:** 2013 147p.: il.

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.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Integrating ecohydrology, water management and watershed economy: case studies from Brazil. *Ecohydrology & Hydrobiology*. V. 16, pp. 83-91, 2016.

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

VIDALI, M. Bioremediation. an overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

ZHANG, H.; MA, D.; QIU, R.; TANG, Y.; DU, C. Non-thermal plasma technology for organic contaminated soil remediation: a review. **Chemical Engineering Journal**, 2016.