



IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

SINALIZAÇÃO CELULAR: ÓXIDO NÍTRICO NA RESPOSTA DE *Pistia stratiotes* AO HERBICIDA ATRAZINA

Autora: Lorena Alves de Jesus Vieira
Orientadora: Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese

Rio Verde – GO
Setembro – 2018

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**SINALIZAÇÃO CELULAR: ÓXIDO NÍTRICO NA
RESPOSTA DE *Pistia stratiotes* AO HERBICIDA ATRAZINA**

Autora: Lorena Alves de Jesus Vieira

Orientadora: Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração Agroquímica.

Rio Verde – GO
Setembro – 2018

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

V658s Vieira, Lorena Alves de Jesus
SINALIZAÇÃO CELULAR: ÓXIDO NA NÍTRICO EM RESPOSTA
DE Pistia stratiotes AO HERBICIDA ATRAZINA / Lorena
Alves de Jesus Vieira; orientadora Fernanda dos
Santos Farnese; co-orientador Adriano Jakelaitis. --
Rio Verde, 2018.
46 p.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) -- Instituto
Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2018.

1. Macrófitas. 2. Fitorremediação. 3. Agrotóxicos.
4. Estresse Oxidativo. 5. Espécies Reativas de
Oxigênio. I. Farnese, Fernanda dos Santos, orient.
II. Jakelaitis, Adriano, co-orient. III. Título.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**SINALIZAÇÃO CELULAR: ÓXIDO NÍTRICO NA
RESPOSTA DE *Pistia stratiotes* AO HERBICIDA ATRAZINA**

Autora: Lorena Alves de Jesus Vieira
Orientadora: Fernanda dos Santos Farnese

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

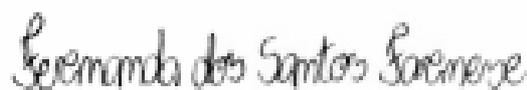
APROVADA em 28 de setembro de 2018.



Prof. Dr. Alan Carlos da Costa
Avaliador externo
IF Goiano / Rio Verde



Prof. Dr. Rafael Marques Pereira Leal
Avaliador interno
IF Goiano / Rio Verde



Prof.^a Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese
Avaliador interno
IF Goiano / Rio Verde



Prof. Dr. Adriano Jakelaitis
Presidente da banca
IF Goiano / Rio Verde

DEDICO ESTE TRABALHO:

Dedico este trabalho aos meus pais, que deram todo o suporte que podiam na minha vida. Dedico ao meu marido e meus filhos, por todo amor e fé que depositaram em mim. Aos meus orientadores, que me incentivaram e acreditaram que eu iria conseguir. Ao divino criador, pela oportunidade.

AGRADECIMENTOS

Palavras são insuficientes para expressar a gratidão que sinto pela ajuda e pela força recebida durante esta jornada, sem as quais não teria sido possível concluir esta etapa.

Gratidão ao meu marido que me apoiou de forma incondicional, ajudando e incentivando em todos os momentos com muito amor e aos meus filhos lindos que souberam dividir a atenção deles com as planilhas, gráficos e pesquisas.

À minha mãe Denize e Meu padrasto (pai) Alceu Antônio Falchetti, por terem incentivado meus estudos desde pequena, não medindo esforços para que eu pudesse ter uma boa aprendizagem.

A meu pai Marcos, já falecido, pelo amor e pela vida.

A minha Vó Helena, por todo apoio de uma vida toda, que mesmo sem entender uma palavra da minha pesquisa se emociona com tudo o que alcancei.

A minha orientadora Fernanda dos Santos Farnese, por ter aceitado o desafio de embarcar nessa jornada comigo, com muita paciência. Por toda ajuda e sem dúvida, gratidão pelos puxões de orelha, sem os quais teria sido difícil terminar este trabalho.

Aos meus coorientadores, Paulo Eduardo Menezes e Adriano Jakelaitis, pelos ensinamentos e conselhos, que contribuíram muito para minha formação.

Agradeço a professora Maria Andréia Mendonça, por ceder o laboratório e auxiliar na execução das análises de divisão celular nos ensinando de forma prestativa.

Aos colegas e ao professor Alan Carlos Costa, do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal (LECO), por cederem o espaço e equipamentos para as análises e ao colega Adnan, por nos ajudar em semanas de férias escolares, tempo que poderia estar descansando... Gratidão.

Agradeço o companheirismo de todos do Laboratório de Fisiologia do Estresse Vegetal (Vicejar), as colegas Maria Lucia e Maria Clara, que dividiram comigo o trabalho, sempre com sorrisos no rosto e disposição.

Agradeço ao amigo Rauander Douglas, que se prontificou a me ajudar de forma admirável em momentos cruciais do meu projeto.

Aos amigos do instituto Arco-íris Sol do Coração, por serem minha medida de amor cósmico universal, em especial ao Aurimar, gratidão.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, que chegou na hora certa e viabilizou meus estudos e pesquisa.

E a todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

Gratidão ao arquiteto universal, pela oportunidade de vivenciar este momento, com estas pessoas, neste planeta.

GRATIDÃO!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Lorena Alves de Jesus Vieira, filha de Denize Alves de Jesus e Marcos Antônio Almeida de Jesus (*in memoriam*), nasceu em 26 de março de 1988, na cidade do Rio de Janeiro – RJ.

Sua formação profissional está assentada sobre a verticalização do ensino oferecida pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, tendo sido iniciada no ano de 2004 com o curso Técnico em Comércio. No ano de 2007, iniciou os estudos nos cursos Tecnólogo em Saneamento Ambiental e Bacharel em Gestão Ambiental, tendo concluído o curso tecnológico no primeiro semestre de 2011 e o bacharelado no segundo semestre de 2012.

Foi tutora da Educação a Distância do Curso técnico em açúcar e álcool de 2013 a 2015, também pelo IFGoiano.

Possui atuação profissional como analista de gestão administrativa na Universidade Estadual de Goiás – Campus Caldas Novas, desde outubro de 2017 até o momento presente, e foi Líder de Meio Ambiente do Frigorífico Marfrig – Unidade Rio Verde de 2011 a 2013.

Em 2016, iniciou seu *Stricto sensu* - Mestrado em Agroquímica, também no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, sob orientação da professora Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	10
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 <i>Gerais</i>	21
2.2 <i>Específicos</i>	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 <i>Determinação da concentração de espécies reativas de oxigênio</i>	22
3.1.1 <i>Peróxido de hidrogênio</i>	22
3.1.2 <i>Ânion superóxido</i>	22
3.2 <i>Avaliação da ocorrência de danos às membranas celulares</i>	23
3.2.1 <i>Concentração de malondialdeído</i>	23
3.2.2 <i>Extravasamento de eletrólitos</i>	23
3.3 <i>Potencial citotóxico</i>	24
3.4 <i>Avaliações fisiológicas</i>	24
3.4.1 <i>Pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila a</i>	24
3.4.2 <i>Trocas gasosas</i>	25
3.5 <i>Determinação da atividade de enzimas antioxidantes</i>	25
3.6 <i>Taxa de crescimento e índice de tolerância à atrazina</i>	26
3.7 <i>Análises estatísticas</i>	26
4. RESULTADOS	27
4.1 <i>Geração de espécies reativas de oxigênio</i>	27
4.2 <i>Danos às membranas celulares</i>	28
4.3 <i>Potencial citotóxico</i>	29
4.4 <i>Avaliações fisiológicas</i>	30
4.5 <i>Atividade de enzimas antioxidantes</i>	33
4.6 <i>Taxa de crescimento relativo e índice de tolerância à atrazina</i>	33
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1: Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	27
Figura 2: Imagem fotográfica das folhas submetidas à análise, por coloração, da concentração do ânion superóxido.....	28
Figura 3: Aldeído Malônico (MDA).....	28
Figura 4: Extravasamento de eletrólitos	29
Figura 5: Clorofila a (mg/g MF) (A), Clorofila b (mg/g MF) (B), Clorofila totais (mg/g MF) (C), Carotenoides (mg/g MF) (D).....	30
Figura 6: Eficiência fotoquímica	31
Figura 7: Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), Condutância estomática (gs) (B), Concentração interna de CO ₂ (C _i) (C), Taxa transpiratória (E) (D).....	32
Figura 8: Respiração Noturna (μmol CO ₂ 2 m ⁻² s ⁻¹) (A) e Respiração Diurna (μmol CO ₂ 2 m ⁻² s ⁻¹) (B).....	32
Figura 9: Superóxido Dismutase (SOD) (A), Peroxidase (POX) (B), Ascorbato peroxidase (APX) (C), Catalase (CAT) (D)	33
Figura 10: Taxa de crescimento (A), Índice de tolerância (IT) (B).....	34
Tabela 1 – Índice mitótico em ápices radiculas de <i>Pistia stratiotes</i> submetidas ao atrazina e ao SNP, isoladamente ou em conjunto.....	29

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

A - Taxa fotossintética líquida
ANOVA - Análise de Variância
APX - Ascorbato peroxidase
ATP - Energia
ATZ - Atrazina
CAT - Catalase
Ci - Concentração de CO₂
Cm - Centímetro
CO₂ - Dióxido de carbono
Cptio - Carboxy-ptio - sequestrador de NO
CT - Controle
DMS- Diferença mínima significativa
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
ETR - Taxa aparente de transporte de elétrons
F₀ - Fluorescência Mínima
F₀' - Fluorescência Mínima após aclimação à luz actínica
F_m - Fluorescência Máxima
F_m' - Fluorescência Máxima à luz
F_s - Fluorescência transiente
F_v - Fluorescência Variável
F_v/F_m - Rendimento quântico potencial do fotossistema II
g - Gramas
gs - Condutância estomática
h - Horas
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
IM - Índice Mitótico
IT - Índice de tolerância
ln w₀ - Logaritmo neperiano de massa seca inicial
ln w₁ - Logaritmo neperiano de massa seca final
M - Metro
M² - Metro quadrado
M² Kg⁻¹ - Metro quadrado por quilograma
MDA - Malondialdeído
Mg - Miligrama
mgL⁻¹ - Miligrama por litro
mL - Mililitro
mM - Milímol
NBT - Azul de p-nitro tetrazólio
nm - Nanômetro
NO - Óxido Nítrico

NO³- - Nitrato
NPQ - Quenching não fotoquímico
O₂⁻ - Ânion superóxido
ONOO- - Peroxinitrito
ONOOH - Ácido peroxinitroso
p/v - peso por volume
pH - Potencial hidrogeniônico
PMSF - Fluoreto de finilmetilsulfônico
POX - Peroxidase
PVPP - Polivinilpirrolidona
qN - Quenching não fotoquímico
qP - Quenching fotoquímico
RD - Respiração diurna
RN - Respiração noturna
Rw - Taxa de crescimento relativo (fórmula)
Rw* - Taxa de crescimento da planta na solução de atrazina (fórmula)
SISVAR - Sistema de Análises Estatísticas e Planejamento de Experimentos
SNK - Student Newman Keuls
SNP - Nitroprussiato sódico
SOD - Superóxido dismutase
t1-t0 - Duração do experimento (fórmula)
TBA - Ácido 2 - tiobarbitúrico
TCA - Ácido tricloroacético
TCR - Taxa de Crescimento Relativo
µg L⁻¹ - microgramas por litro
µL - Microlitro
µM - Micromolar
µmol - Micromol
ΦFSII - Eficiência Fotoquímica Fotossistema II
ΦCO₂ - Rendimento quântico de assimilação de carbono

RESUMO

VIEIRA, LORENA ALVES DE JESUS; Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, setembro de 2018. **Sinalização celular: óxido nítrico na resposta de *Pistia stratiotes* ao herbicida atrazina.** Orientadora: Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese; Coorientadores: Dr. Adriano Jakelaitis, Dr. Paulo Eduardo de Menezes Silva.

Os herbicidas, substâncias utilizadas para combater ervas daninhas que são prejudiciais à lavoura, representam 60% do total de agrotóxicos comercializados atualmente. Nesse contexto, resalta-se o herbicida Atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamino-S-atrazina), cujo uso intensivo, a persistência e a mobilidade nos solos tem contribuído para que seja um dos defensivos mais frequentemente detectados em águas subterrâneas e superficiais no mundo. Devido a sua alta toxicidade, a presença da atrazina no meio aquático pode causar sérios danos para a conservação da biodiversidade e comprometer a saúde humana. Diante desses fatos, várias técnicas têm sido propostas na tentativa de retirar esse composto do ambiente, como é o caso da fitorremediação. A fitorremediação consiste no emprego de plantas para a descontaminação de ambientes poluídos. Várias plantas têm sido propostas como eficientes fitorremediadoras de ambientes aquáticos, como é o caso da *Pistia stratiotes*, estas plantas tolerantes a poluentes apresentam robustos mecanismos de defesa, e envolve alteração na expressão gênica como resultado de complexas cascatas de sinalização. O óxido nítrico (NO), é um sinalizador que pode trabalhar para regular a fisiologia e o desenvolvimento de diferentes processos nas plantas, em resposta a estresses abióticos. No entanto, pouco se sabe sobre esta sinalização em relação aos agrotóxicos. Portanto, o objetivo do trabalho foi caracterizar os danos desencadeados pelo herbicida atrazina em *Pistia stratiotes* e avaliar o efeito do óxido nítrico (NO) na tolerância das plantas, buscando esclarecer o mecanismo de ação e sinalização do NO nas células vegetais. Para tanto, Espécimes de *Pistia stratiotes* foram coletados em local livre da influência de herbicidas e cultivadas em solução nutritiva, sendo mantidas em casa de vegetação. As plantas foram submetidas a quatro tratamentos adicionados na solução, com 5 repetições. São estes: Controle (apenas solução nutritiva); Nitroprussiato sódico (SNP; 0,1 mgL⁻¹); Atrazina (Atz) (5 mgL⁻¹); Atz + SNP (5 mgL⁻¹ e 0,1 mgL⁻¹, respectivamente); posteriormente, foram avaliados parâmetros que permitiram avaliar os danos provocados pelo herbicida e o papel sinalizador do NO fornecido pelo SNP. Dentre os diversos danos provocadas pelo herbicida em *P. stratiotes*, destacaram-se a redução na fotossíntese, na eficiência de carboxilação com consequência sobre o crescimento dos espécimes, e ainda aumento da taxa respiratória, geração de EROs, extravasamento de eletrólitos e emissão de fluorescência. Contudo, observou-se que a adição do NO, atenuou os danos provocados pelo herbicida, sendo capaz de aumentar a assimilação de carbono, bem como elevando a TCR (taxa de crescimento relativo). Os resultados indicaram também, que o NO aumentou o índice mitótico das plantas tratadas com o ATZ+SNP. Não foi possível visualizar aumento na atividade de antioxidantes enzimáticos. Os resultados deste trabalho, indicaram o NO contribuiu de forma positiva em *P. stratiotes* submetidas ao herbicida atrazina. No entanto, que se faz necessário pesquisas mais aprofundadas referentes à forma de atuação do NO na sinalização desta planta a agrotóxicos, principalmente no que tange a sinalização cruzada com outras moléculas sinalizadoras.

PALAVRAS-CHAVES: Macrófitas, Fitorremediação, Agrotóxicos, Estresse oxidativo, Espécies Reativas de Oxigênio.

ABSTRACT

VIEIRA, LORENA ALVES DE JESUS; Goiano Federal Institute – Rio Verde Campus– GO, September of 2018. **Cell signaling: nitric oxide in the response of *Pistia stratiotes* to the herbicide atrazine.** Adviser: Dra. Fernanda dos Santos Farnese; Co-advisers: Dr. Adriano Jakelaitis, Dr. Paulo Eduardo de Menezes Silva.

The herbicides, substances used to combat weeds that are harmful to agriculture, represent 60% of the total pesticides currently commercialized. In this context, the herbicide Atrazine (2-chloro-4-ethylamine-6-isopropylamino-S-atrazine) is highlighted, whose intensive use, persistence and mobility in soils has contributed to its being one of the most frequently detected pesticides in groundwater and superficial in the world. Due to their high toxicity, the presence of atrazine in the aquatic environment can cause serious damage to the biodiversity conservation and compromise human health. Faced with these facts, several techniques have been proposed in the attempt to remove this compound from the environment, as is the case of phytoremediation. Phytoremediation consists in use plants for polluted environments decontamination. Several plants have been proposed as efficient phytoremediation agents of aquatic environments, as is the case of *Pistia stratiotes*, which are plants tolerant to pollutants and present robust mechanisms of defense, which involves alteration in the gene expression as a result of complex signaling cascades. Nitric oxide (NO) is a signal that can work to regulate the physiology and development of different processes in plants in response to abiotic stresses. However, little is known about this signaling in relation to agrochemicals. Therefore, the objective of this work was to characterize the damage caused by the herbicide atrazine in *Pistia stratiotes* and to evaluate the nitric oxide (NO) effect on plant tolerance, seeking to clarify the NO action and signaling mechanisms in plant cells. For this, specimens of *Pistia stratiotes* were collected in a place free from herbicides influence and cultivated in nutrient solution, being kept in a greenhouse. The plants were submitted to four treatments added in the solution, with 5 replicates. These are: Control (nutrient solution only); Sodium nitroprusside (SNP; 0,1 mgL⁻¹); Atrazine (Atz) (5 mgL⁻¹); Atz + SNP (5 mgL⁻¹ and 0,1 mgL⁻¹, respectively); subsequently, parameters to evaluate the damage caused by the herbicide and the NO signal paper provided by the SNP were evaluated. Among the various damages caused by the herbicide in *P. stratiotes*, it was highlighted the reduction in photosynthesis, in the carboxylation efficiency with consequence on the specimens' growth, and also an increase in the respiratory rate, ROS generation, electrolyte extravasation and fluorescence emission. However, it was observed that the NO addition attenuated the damage caused by the herbicide, being able to increase the carbon assimilation, as well as raising the TCR. The results also indicated that NO increased the mitotic index of plants treated with ATZ + SNP. It was not possible to visualize an increase in the enzymatic antioxidants activity. The results of this work, indicated that the NO contributed positively in *P. stratiotes* submitted to the herbicide atrazine. However, it is necessary to do more research about the way that NO acts in the signaling of this plant to pesticides, especially in relation to cross-signaling with other signaling molecules.

KEYWORDS: Macrophytes, Phytoremediation, Agrochemicals, Oxidative stress, Reactive Oxygen Species.

1. INTRODUÇÃO

Agrotóxicos são substâncias químicas tóxicas, naturais ou sintéticas, usadas na prevenção, destruição, repulsão ou atenuação das doenças e das pragas que lesam, atacam ou transmitem enfermidades às plantas (MEZZARI, 2002; LONDRES, 2011). A aplicação destes tem sido a principal estratégia de controle e prevenção de pragas durante o cultivo e após a colheita em várias culturas, com objetivo de aumentar a produtividade e a qualidade da produção agrícola (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2008). Segundo Peres (2003), os agrotóxicos são classificados de acordo com o tipo de praga a ser combatida, podendo ser herbicidas, inseticidas ou fungicidas. Sua não utilização pode ocasionar perdas significativas na produção agrícola, aumento de doenças infecciosas e a devastação de culturas por pragas invasoras (GIANESSI, 2013). Todavia, embora os agrotóxicos sejam formulados com propósito de controle e prevenção de pragas, estes compostos também podem afetar direta ou indiretamente outros organismos, em função da toxicidade do composto ativo e, ou das substâncias que compõem a formulação comercial (TSAI, 2013). Neste contexto, o uso excessivo de agrotóxicos pode ser extremamente prejudicial ao meio ambiente, podendo inclusive resultar no acúmulo destes produtos químicos na água, solo e sedimentos (SRIVASTAVA et al., 2011).

Aproximadamente 540.000 toneladas de pesticidas foram vendidas no mercado interno brasileiro em 2017, sendo boa parte utilizada na agricultura e aplicada diretamente nas plantas ou no solo (IBAMA, 2017). Uma vez liberados no ambiente, os agrotóxicos não ficam restritos à área de liberação, podendo se difundir para outros locais (SILVA, 2012). Sendo assim, a contaminação de cursos hídricos por essas substâncias, principalmente no setor agrícola, é frequente, podendo ocorrer através do processo de escoamento superficial, lixiviação, pela lavagem dos equipamentos agrícolas ou, ainda, por derivação quando a aplicação ocorre por via aérea (SCORZA JÚNIOR e REGITANO, 2012). Uma vez que atinja os corpos hídricos, os agrotóxicos podem ser transportados rapidamente por difusão nas correntes de água ou podem ser incorporados por organismos aquáticos (SILVA, 2012). Esses compostos irão influenciar funções essenciais dos ecossistemas aquáticos por meio de modificações na cadeia alimentar, alterações nos padrões de fluxo de energia, ciclagem de nutrientes e redução na diversidade de espécies, modificando a estabilidade e resiliência do ecossistema (PÉREZ et al., 2011).

Os agrotóxicos mais empregados na agricultura atualmente são os herbicidas, substâncias utilizadas para combater plantas daninhas que são prejudiciais à lavoura. Neste contexto, encontra-se inserido a atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamino-S-atrazina), que é um herbicida pertencente à família das s-triazinas, apresentando na sua estrutura química um anel aromático constituído por três átomos de carbono e três átomos de nitrogênio em posições alternadas (PAN, 2016). É um herbicida seletivo, moderadamente hidrofílico, com elevada solubilidade aquosa (PAN, 2016), comumente utilizado para controlar plantas daninhas eudicotiledôneas e algumas gramíneas em diversas culturas, tais como milho, sorgo e cana-de-açúcar (MOORE KRÖGER, 2010). No entanto, apesar de ser produzido para controlar plantas, determinadas concentrações desse herbicida podem causar danos a animais expostos (SOLOMON et al., 2014) e a presença da atrazina no meio aquático pode causar sérios danos para a conservação da biodiversidade e comprometer a saúde humana (CHEVRIER et al., 2011).

No Brasil, em 17 de março de 2005, entrou em vigor a Resolução Conama Nº 357, que estabelece que a concentração máxima de atrazina em água potável deve ser de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Apesar desta limitação, a atrazina pode ser encontrado em corpos hídricos por todo o país, com concentrações até 35 vezes maiores do que as recomendadas por lei (ARMAS et al., 2007; MOREIRA et al., 2012; TODESCHINI, 2013). Loro et al., (2015) em seus estudos identificou concentrações de $2,6 \mu\text{g L}^{-1}$ a $4,15 \mu\text{g L}^{-1}$, em corpos d'água, valores acima do permitido pela legislação. Contudo mesmo presente em quantidades menores, como $0,30 \mu\text{g L}^{-1}$, estudos evidenciaram efeitos genotóxicos em peixes expostos (VIEIRA et al, 2016).

Devido a sua alta taxa de concentração nos ecossistemas aquáticos, em conjunto com sua alta toxicidade, a busca por métodos capazes de retirar a atrazina do ambiente tem sido motivada, sendo que uma das alternativas estudadas é a fitorremediação. A fitorremediação consiste no emprego de plantas para conter, remover ou transformar compostos tóxicos presentes no ambiente, diminuindo os teores desses elementos, substâncias a níveis seguros (VIEIRA et al., 2015). Macrófitas aquáticas apresentam características interessantes para programas de fitorremediação, como fácil cultivo, elevada taxa de crescimento e capacidade de absorver e acumular altas concentrações de poluentes (PIO et al., 2013). Dentre as várias macrófitas aquáticas com potencial para a fitorremediação de herbicidas ressalta-se aqui a *Pistia stratiotes*.

Conhecida popularmente como alface d'água, a *Pistia stratiotes* L. (*Araceae*) é uma macrófita que tem sido utilizada em diversos trabalhos de fitorremediação, pela sua

capacidade de absorver e acumular diferentes poluentes (PRASAD E GREGER, 2001). Plantas utilizadas na fitorremediação, além de serem capazes de acumular o contaminante, também devem ser tolerantes ao poluente em questão, a fim de garantirem a sua sobrevivência e a continuidade dos processos de absorção (VASCONCELLOS et al., 2012). Todavia, um dos principais limitantes ao processo de fitorremediação de herbicidas consiste na alta sensibilidade das plantas a este tipo de poluente. De fato, a presença de atrazina nas células vegetais desencadeia uma série de danos, como o bloqueio da transferência de elétrons no fotossistema II (ESPERANZA et al., 2016) e o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), com consequente desnaturação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (ZHAO et al., 2005). Plantas tolerantes a atrazina apresentam robustos mecanismos de defesa antioxidante, o que envolve o aumento na concentração ou na atividade de enzimas envolvidas na eliminação de ERO, como as dismutases do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), peroxidases do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e catalases (CAT, EC 1.11.1.6). A ativação destes mecanismos de defesa, por sua vez, demanda a participação de moléculas sinalizadoras, como é o caso do óxido nítrico (NO), molécula fundamental para o aumento a tolerância das plantas a diferentes tipos de compostos tóxicos (MISRA et al., 2011; SAXENA e SHEKHAWAT ,2013; SINGH et al., 2013).

O NO é uma molécula gasosa de estrutura molecular simples, que ocorre naturalmente nas células vegetais, diatômica, com alta difusibilidade e que apresenta propriedades hidrofóbicas, sendo capaz de se difundir livremente através das membranas (ARASIMOWICZ et al., 2011; WANG et al., 2013), características essenciais em sinalizadores celulares (SAXENA E SHEKHAWA, 2013). Resultados de pesquisas em diferentes espécies vegetais evidenciaram que o tratamento com baixas concentrações de NO pode promover a reprogramação de processos fisiológicos, diminuir danos oxidativos e estimular a síntese e atividade de enzimas antioxidantes quando a planta está sob diversos tipos de estresse (MARTI et al., 2013; DEL RIO, 2015). Os efeitos do NO dependem de alterações químicas nas proteínas, como a S-nitrosilação, a qual representa o principal mecanismo de transdução de bioatividade do NO (MALIK et al., 2011; FUNGILLO et al., 2014). A S-nitrosilação é uma modificação pós-traducional que pode alterar a atividade, estabilidade, conformação, interações com outras moléculas ou a localização subcelular de proteínas alvo (SEVILLA et al., 2015). Por meio da S-nitrosilação o NO contribui para a

reprogramação metabólica da célula vegetal, desencadeia mudanças na dinâmica das enzimas e altera os padrões de expressão gênica das células (FARNESE et al., 2016). Essas modificações resultam na ativação de mecanismos de defesa capazes de aumentar a tolerância da planta ao agente estressante (SAXENA E SHEKHAWA, 2013).

Embora, saiba-se que os agentes sinalizadores são essenciais para a tolerância das plantas a estresses, pouco se conhece sobre o envolvimento do NO na resposta das plantas aos herbicidas, principalmente com relação a processos bioquímicos e fisiológicos, de forma que os mecanismos de ação da molécula dentro da célula vegetal ainda permanecem desconhecidos (OBERMEIER et al., 2015; ERINLE et al., 2016). O esclarecimento a respeito desses processos, além de contribuir para o avanço do conhecimento na área da sinalização celular em plantas, poderá contribuir também para o aprimoramento dos processos de fitorremediação. Tendo como base esses fatos, e considerando o grande potencial de *P. stratiotes* para utilização em programas de fitorremediação, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar os danos desencadeados pelo herbicida atrazina em espécimes de *Pistia stratiotes*, avaliando o efeito do óxido nítrico (NO) na tolerância das plantas a esse poluente.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Caracterizar os danos desencadeados pelo herbicida atrazina em espécimes de *Pistia stratiotes* e avaliar o efeito do óxido nítrico (NO) na tolerância das plantas ao poluente.

2.2 Específicos

Caracterizar os danos desencadeados pelo herbicida atrazina no crescimento e metabolismo de *Pistia stratiotes*;

Analisar o efeito do herbicida atrazina na geração de ERO em *Pistia stratiotes*;

Caracterizar a ocorrência de danos às membranas em *Pistia stratiotes* com relação a atrazina;

Verificar alterações fotossintéticas e de fluorescência desencadeados pelo herbicida atrazina em *Pistia stratiotes*.

Verificar possíveis alterações enzimáticas em *Pistia stratiotes*.

Avaliar alterações no índice mitótico em *Pistia stratiotes*, desencadeados pelo herbicida atrazina.

Avaliar o potencial do Óxido nítrico em atenuar os danos desencadeados pelo herbicida, aumentando a tolerância de *pistia stratiotes* à atrazina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes de *Pistia stratiotes* foram coletadas no lago campestre, localizado na cidade de Rio Verde, Goiás e esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% durante 1 min, sendo então lavados em água corrente e água destilada. A seguir as plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Clark (1975), $\frac{1}{4}$ da força iônica, pH 6,5 e foram mantidas em casa de vegetação durante cinco dias, para aclimatação. Após a aclimatação, as plantas foram submetidas a quatro tratamentos, com cinco repetições: T1 – controle (apenas solução nutritiva); T2 – Nitroprussiato sódico (SNP; $0,05 \text{ mg L}^{-1}$); T3 - Atrazina (Atz) ($150 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$); T4 - Atz + SNP ($150 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente). Nitroprussiato sódico é uma substância comumente utilizada em ensaios bioquímicos como doadora de NO. As plantas permaneceram nessas condições por 24 horas, sendo então utilizadas para obtenção dos parâmetros descritos abaixo. Em um segundo experimento, para determinar a taxa de crescimento e tolerância ao herbicida, as plantas permaneceram nos tratamentos supracitados por três dias. As concentrações de Atrazina e SNP foram estabelecidas com base em testes de dose.

3.1 Determinação da concentração de espécies reativas de oxigênio

3.1.1 Peroxido de hidrogênio

A fim de determinar a geração de espécies reativas de oxigênio, a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi quantificada utilizando amostras de 200 mg de folhas frescas homogeneizadas em meio de extração (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM) e centrifugadas a $10.000 \times g$, por 15 minutos, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (KUO e KAO, 2003). Alíquotas de $50 \text{ } \mu\text{L}$ do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação contendo FeNH_4SO_4 $100 \text{ } \mu\text{M}$, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol $250 \text{ } \mu\text{M}$ e sorbitol 100 mM (GAY e GEBICKI, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorvância determinada a 560 nm. As concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H_2O_2 .

3.1.2 Ânion superóxido

Para análise da presença do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) foi primeiramente preparado um tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,8, contendo NBT 0,1%. Em seguida, cortou-se um quadrado na região central de uma folha totalmente desenvolvida de cada planta, o qual foi mergulhado no tampão, sendo aplicado um vácuo leve, de aproximadamente 2 minutos, para garantir a infiltração no tecido. Cada quadrado permaneceu incubado no tampão, na presença de luz e na temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida, foram emergidos em etanol fervente até eliminar completamente a clorofila. Foram fotografados cada quadrado em fundo branco, e as fotos analisadas visualmente, sendo que a coloração azul indica a presença do $O_2^{\cdot-}$.

3.2 Avaliação da ocorrência de danos às membranas celulares

3.2.1 Concentração de malondialdeído

A concentração de malondialdeído (MDA) foi medida e utilizada como parâmetro para avaliar a peroxidação lipídica. Para isso, o tecido foi macerado e homogeneizado com 0,1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e 20% de insolúvel polivinilpirrolidona. O homogenato foi centrifugado a 15.000 x g por 15 min a 4°C e adicionada uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante a 1,5 mL de 0,5% de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (preparado em 20% de TCA). As amostras foram homogeneizadas e a reação colorimétrica conduzida a 90°C por 20 min após incubação. Em seguida, as amostras foram imersas em banho de gelo e clarificadas através de centrifugação a 15000 x g por 15 min a 4 °C. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro. A concentração de MDA foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (HODGES et al., 1999).

3.2.2 Extravasamento de eletrólitos

Para avaliar a estabilidade das membranas celulares, 10 discos foliares foram retirados de cada planta, os quais foram lavados previamente (2 vezes) em água desionizada. A seguir, os discos foram colocados para flutuar em frascos contendo 15 ml de água desionizada. As amostras foram incubadas por 6 h, na temperatura ambiente, e a condutividade foi avaliada. A seguir esses frascos foram colocados na estufa a 90°C, e permaneceram por 3 h, e após, a leitura foi feita novamente. A condutividade foi expressa em porcentagem da condutividade total (frascos a 90°C).

3.3 Potencial citotóxico

Com o objetivo de averiguar o potencial citotóxico do herbicida em questão, foi analisada a região meristemática de raízes oriundas das plantas submetidas aos tratamentos. Para isso, raízes foram coletadas e fixadas em solução de metanol:ácido acético (3:1) e tratadas com pectinase pura a 37°C por 2 h em banho-maria, seguindo-se a metodologia utilizada por Arcanjo e Silva (2011). Posteriormente, as raízes foram submetidas à coloração pela Reação de Feulgen. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram dissociados, cobertos com lamínula e esmagados. Os efeitos citotóxicos foram analisados em células em divisão e calculados o índice mitótico (IM), sendo contados 1900 núcleos para cada tratamento. O IM foi calculado como sendo a razão das células em divisão pela soma das células em interfase e em divisão.

3.4 Avaliações fisiológicas

3.4.1 Pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila a

Amostras foliares foram maceradas em nitrogênio líquido e em acetona 80%. O homogeneizado foi filtrado e diluído para 25 ml com acetona. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz e a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 663, 645, 652 e 470 nm, para determinação da clorofila a, clorofila b, clorofilas totais e carotenoides, respectivamente. Os teores dos pigmentos supracitados foram calculados por meio das equações propostas por Arnon (1949).

A análise da fluorescência mínima (F_0) foi realizado via excitação dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade, utilizando um analisador de gases à infravermelho (IRGA). A fluorescência máxima (F_m) foi obtida pela aplicação de um pulso de luz actínica saturante. A fluorescência variável (F_v) foi determinada pela diferença entre F_0 e F_m e, a partir desses valores, foi calculado o rendimento quântico potencial do fotossistema II (VAN KOOTEN e SNEL, 1990). As folhas foram aclimatadas à luz actínica, a fim de se obter a fluorescência transiente (F_s), seguido por um pulso de luz saturante para estimar-se a fluorescência máxima à luz (F_m') e, por último, aplicou-se um pulso de luz vermelho-distante, para obter-se a fluorescência mínima após aclimação à luz actínica (F_0'). Com esses parâmetros, foram calculados a

eficiência fotoquímica do transporte de elétrons associado ao fotossistema II (Φ_{FSII}), o rendimento quântico da assimilação de CO_2 (Φ_{CO_2}) e o quenching não fotoquímico (NPQ), conforme proposto por Maxwell e Johnson (2000).

3.4.2 Trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida do carbono (A), a condutância estomática (gs) e a concentração interna de CO_2 (C_i) foram determinadas em sistema aberto, com analisador de gases a infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc.), equipado com uma fonte de luz azul/vermelho.

A respiração noturna (RN), ou taxa de assimilação líquida de CO_2 noturna, foi avaliada antes do amanhecer utilizando um analisador de gases à infravermelho (IRGA).

3.5 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Para determinar a atividade enzimática, amostras foliares de aproximadamente 0,3 g foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas nos seguintes meios de extração:

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% para dismutases do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), peroxidases do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e catalases (CAT, EC 1.11.1.6) (PEIXOTO et al., 1999);

Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 x g por 15 min, a 4°C, para as enzimas SOD, POX, APX, CAT. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto e as atividades enzimáticas foram determinadas pela adição do extrato aos seguintes meios de reação:

- Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μ m, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μ m, para SOD (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977);

- Tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 2 mM, para POX (PEIXOTO et al., 1999);

- Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H_2O_2 1 mM, para APX (PEIXOTO et al., 1999);

- Tampão fosfato de potássio 50 mM e H₂O₂ 12,5 mM, para CAT (PEIXOTO et al., 1999);

Para determinação da atividade da SOD, as amostras foram iluminadas por 5 min e a absorvância foi, então, medida a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% a fotorredução do NBT (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). As atividades das enzimas POX, APX, GPX, CAT foram estimadas pela leitura da absorvância durante o primeiro minuto de reação. Os seguintes coeficientes de extinção molar foram utilizados: POX (420 nm, ϵ : 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹), APX (290 nm, ϵ : 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹), CAT (240 nm, ϵ : 36 M⁻¹ cm⁻¹) (PEIXOTO et al., 1999).

3.6 Taxa de crescimento e índice de tolerância à atrazina

A taxa de crescimento relativo (TCR) foi calculada usando a equação proposta por Hunt (1978), usando o peso seco de folhas e raízes:

$$Rw = (\ln w_1 - \ln w_0) \times 1000 / (t_1 - t_0);$$

Em que: Rw representa a taxa de crescimento relativo; ln w₁ e ln w₀ representam o logaritmo neperiano da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente; e t₁ – t₀ representam a duração do experimento, em dias.

A tolerância à atrazina foi estimada pelo cálculo do índice de tolerância (IT) (%), segundo proposto por Wilkins (1978):

$$TI (\%) = (Rw^*/Rw) \times 100;$$

Em que: Rw* é a taxa de crescimento da planta na solução com Atrazina (sozinho ou em conjunto com NO) e Rw é a taxa de crescimento da planta na solução controle.

3.7 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente ao acaso, com cinco repetições, sendo os dados submetidos à ANOVA e as médias

calculadas pelo teste SNK (Student Newman Keuls), a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Sisvar.

4. RESULTADOS

4.1. Geração de espécies reativas de oxigênio

A exposição de *Pistia stratiotes* ao herbicida atrazina não alterou a concentração de peróxido de hidrogênio em nenhum dos tratamentos analisados (Fig. 1). Em relação ao ânion superóxido, por outro lado, foi possível visualizar variações na intensidade da coloração azul das folhas, indicando que a concentração do ânion foi diferente entre os tratamentos (Fig. 2). A coloração mais intensa foi observada nas folhas do tratamento contendo apenas o herbicida, sendo que, no tratamento ATZ+SNP, a coloração foi consideravelmente mais clara, evidenciando que o SNP foi capaz de manter a concentração dessa ERO em níveis mais baixos do que os observados nas plantas expostas à atrazina de forma isolada.

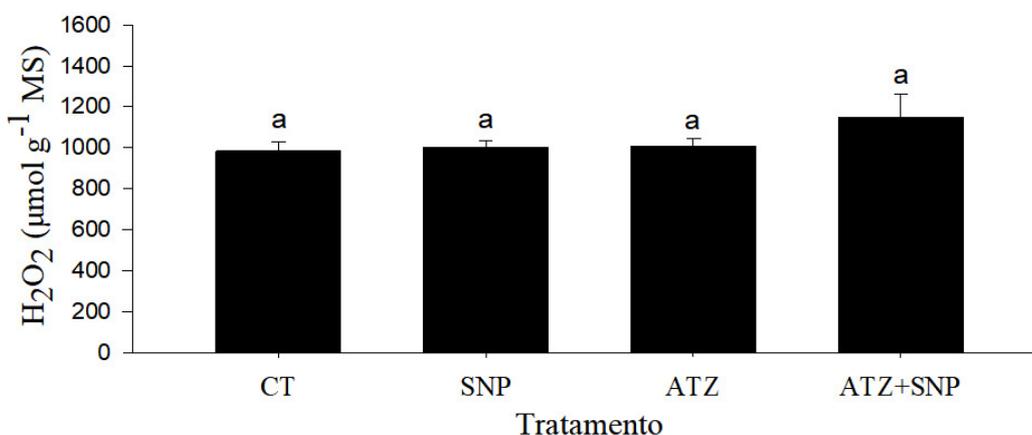


Figura 1. Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de SNP. CT (controle); SNP (nitroprussiato sódico); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+SNP (Atrazina + nitroprussiato sódico). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

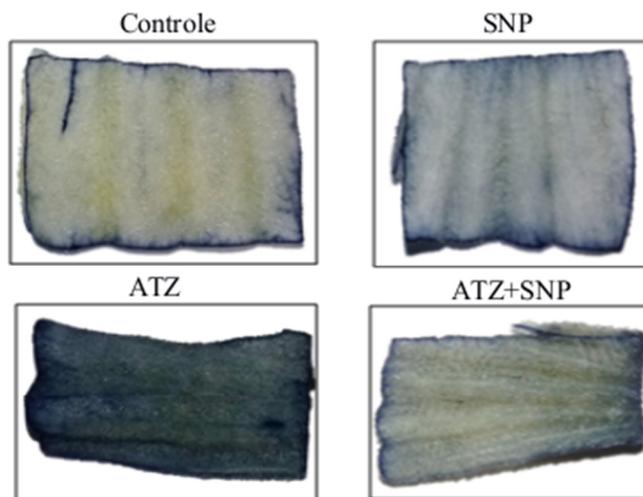


Figura 2. Concentração do ânion superóxido, por coloração em imagens fotográficas das folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de SNP. CT (controle); SNP (nitroprussiato sódico); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+SNP (Atrazina + nitroprussiato sódico),

4.2. Danos às membranas celulares

A concentração de MDA, um importante marcador de estresse oxidativo nas membranas celulares, não foi diferente entre o controle e o tratamento com atrazina, embora tenha sido diferente entre os tratamentos ATZ e ATZ+SNP, evidenciando uma tendência de queda na concentração desta molécula (Fig. 3). Com relação ao extravasamento de eletrólitos (Fig. 4), por outro lado, o tratamento apenas com atrazina obteve uma condutividade elétrica significativamente maior que tratamento ATZ+SNP, que manteve valores similares aos observados no controle.

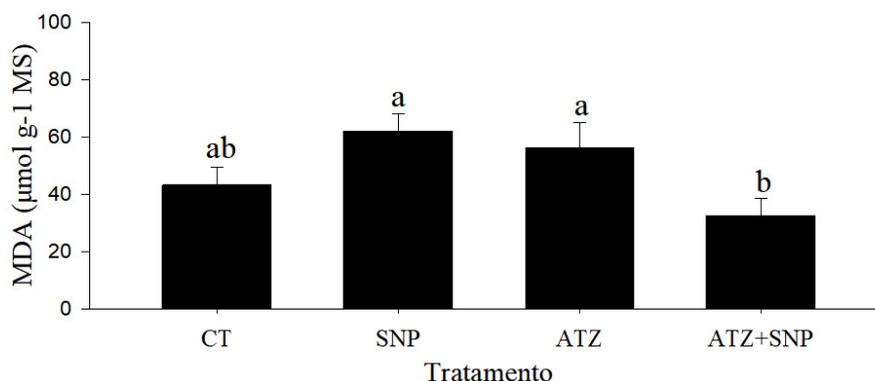


Figura 3. Concentração de aldeído Malônico (MDA) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de SNP. CT (controle); SNP (nitroprussiato sódico); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+SNP (Atrazina + nitroprussiato sódico). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

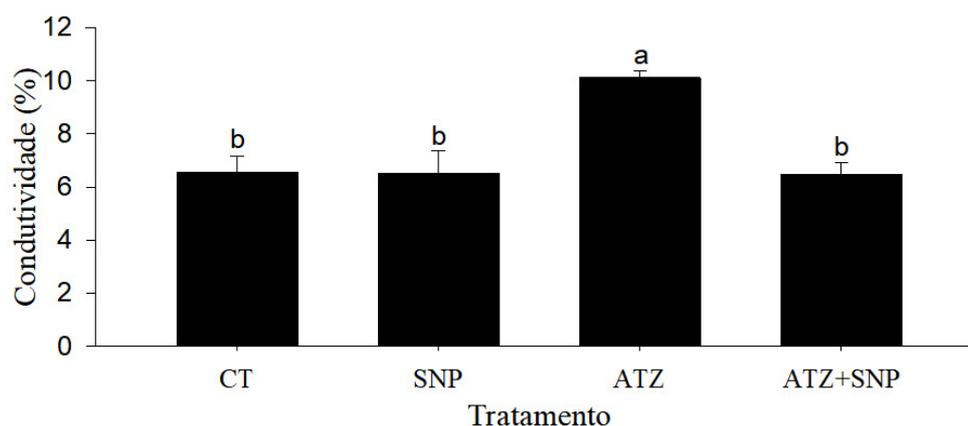


Figura 4. Extravasamento de eletrólitos em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de SNP. CT (controle); SNP (nitroprussiato sódico); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+SNP (Atrazina + nitroprussiato sódico). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

4.3. Potencial citotóxico

A exposição das plantas ao herbicida atrazina não alterou o índice mitótico no ápice radicular de *P. stratiotes* (Tabela 1). Contudo, é interessante observar que, quando as plantas foram tratadas com o herbicida em conjunto com o doador de NO, o índice mitótico aumentou em quase 50% (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de núcleos observados em cada uma das fases da divisão mitótica e índice mitótico em ápices radiculas de *Pistia stratiotes* submetidas à atrazina e ao SNP, isoladamente ou em conjunto.

Tratamentos	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Células Totais	Divisões	IM (%)
CT	1734 a	53 d	69 b	25 c	19 b	1900	166 c	9 b
CT+SNP	1737 a	78 b	48 c	32 b	5 d	1900	163 d	9 b
Atz	1724 b	66 c	68 b	27 c	15 c	1900	176 b	9 b
Atz+SNP	1571 v	121 a	141 a	46 a	21 a	1900	329 a	17 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK. DMS ($P \leq 0,05$).

4.4 Avaliações fisiológicas

A exposição ao herbicida atrazina afetou a planta de diversas formas. Observou-se variação dentre os tratamentos no que se refere à clorofila “a” e clorofilas totais (Fig. 5A e 5C), sendo que o tratamento com atrazina sem a adição de SNP foram os que resultaram em valores mais baixos. Os parâmetros de clorofila “b” e carotenoides (Fig. 5B e 5D) não obtiveram alterações dentre os tratamentos, permanecendo estatisticamente iguais ao controle, fato que pode ser explicado pelo mecanismo de ação do herbicida, atuando diretamente no fotossistema II.

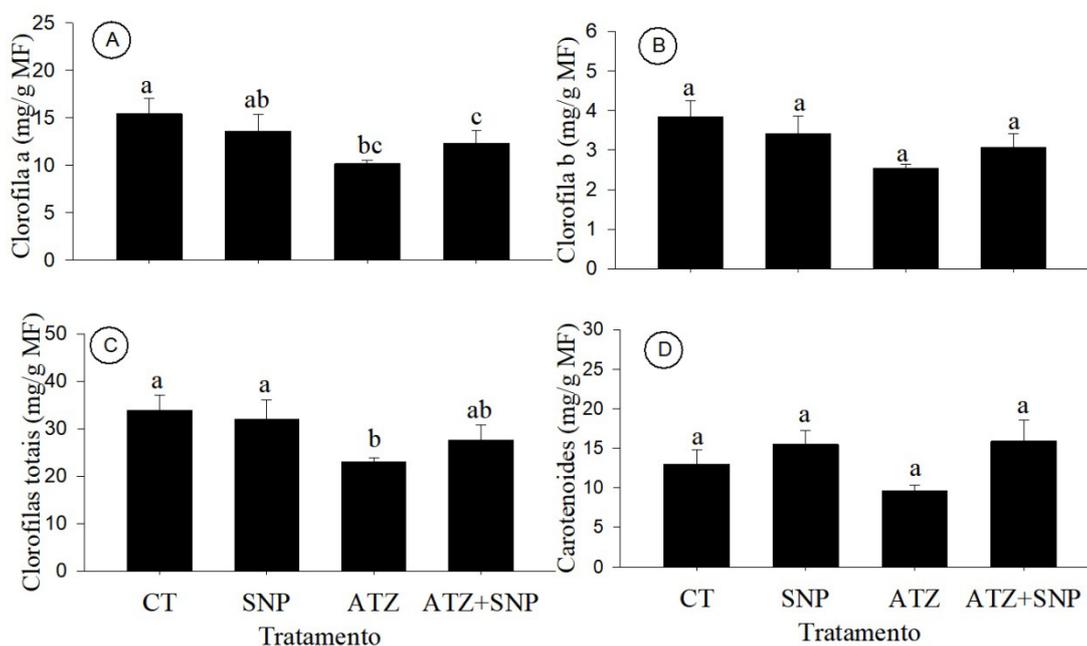


Figura 5. Clorofila a (mg/g MF) (A), Clorofila b (mg/g MF) (B), Clorofila totais (mg/g MF) (C), Carotenoides (mg/g MF) (D), em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de SNP. CT (controle); SNP (nitroprussiato sódico); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+SNP (Atrazina + nitroprussiato sódico). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

A exposição das plantas ao herbicida teve um efeito danoso sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila a. De fato, todos os parâmetros analisados apresentaram queda tanto no tratamento ATZ quanto no tratamento ATZ+SNP, indicando que o SNP não foi capaz de atenuar os danos desencadeados pelo poluente. Na figura 6^a, pode-se observar que as plantas expostas à atrazina apresentaram queda no rendimento quântico potencial do fotossistema II, e foi acompanhado por alterações também no rendimento quântico efetivo do fotossistema II (fig. 6C), no quenching fotoquímico (fig. 6E) e na taxa aparente de transporte de elétrons (fig. 6 G). Resultados similares foram

observados para o coeficiente de extinção não fotoquímica (fig. 6B) e para o quenching não fotoquímico (fig. 6F).

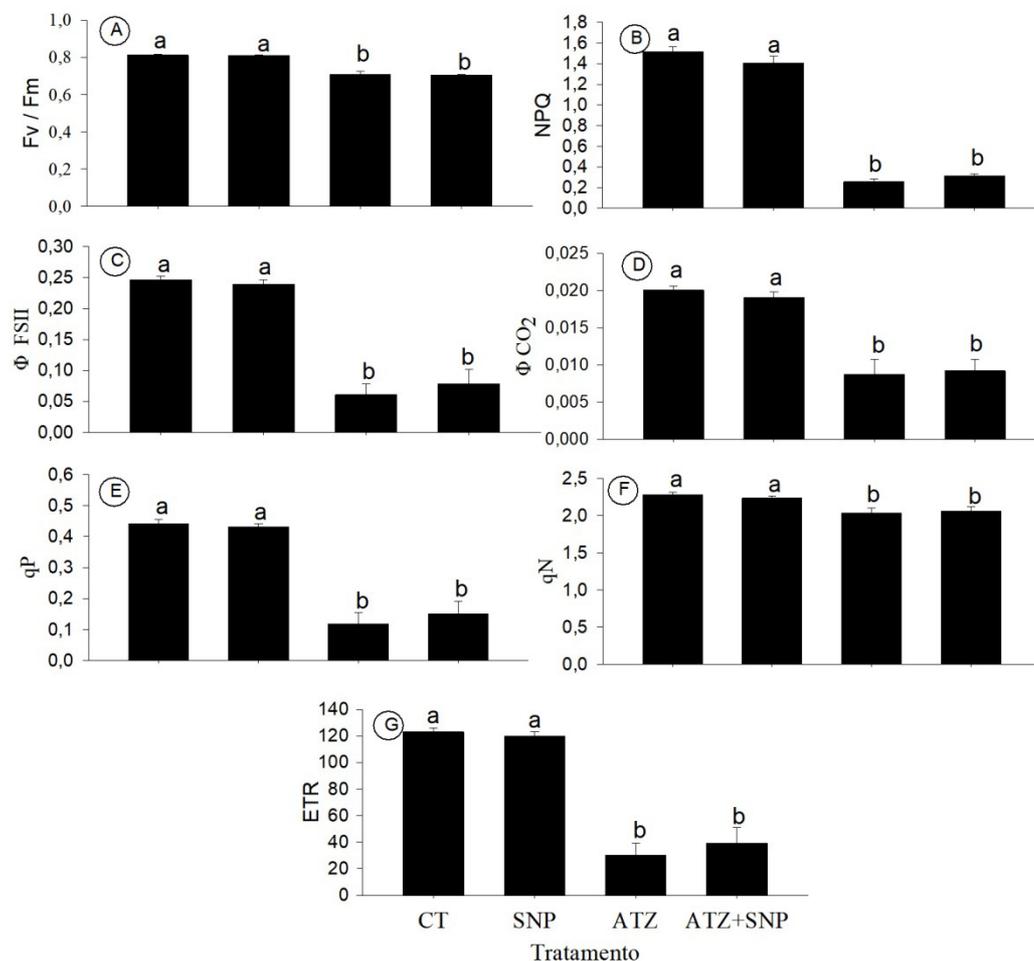


Figura 6. Rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) (A), Coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) (B), Rendimento quântico do fotossistema II (Φ_{FSII}) (C), Rendimento quântico da fixação de CO_2 (Φ_{CO_2}) (D), Quenching fotoquímico (qP) (E), Quenching não fotoquímico (qN) (F), Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) (G), em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de SNP. CT (controle); SNP (nitroprussiato sódico); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+SNP (Atrazina + nitroprussiato sódico). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

A exposição da planta ao herbicida atrazina afetou vários parâmetros de trocas gasosas. A figura 7A representa a assimilação líquida de carbono (A), parâmetro central no processo de metabolismo da planta, e pode-se observar que os valores nos tratamentos controle e controle + SNP ficaram estatisticamente similares, indicando ausência de alteração entre estes. Já no tratamento contendo apenas atrazina, observou-se que a exposição ao poluente resultou em queda de 55,81% na fixação de carbono. O SNP foi capaz de atenuar esse efeito danoso da atrazina, de forma que a planta

apresentou pequeno incremento na sua taxa fotossintética. Em relação à condutância estomática (g_s), os valores apresentados pelos tratamentos mantiveram-se estatisticamente iguais ao controle (Fig. 7B). A concentração interna de CO_2 (C_i) variou dentre os tratamentos, sendo que os menores valores foram encontrados no controle e no tratamento contendo apenas SNP (Fig. 7C).

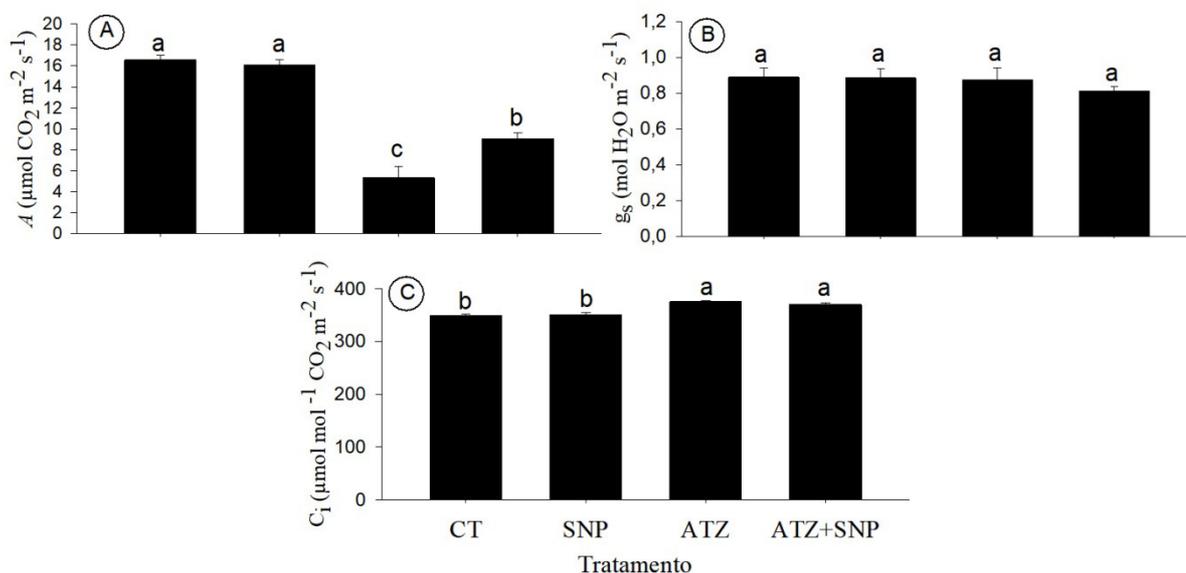


Figura 7. Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), Condutância estomática (g_s) (B), Concentração interna de CO_2 (C_i) (C) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de SNP. CT (controle); SNP (nitroprussiato sódico); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+SNP (Atrazina + nitroprussiato sódico). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

Em relação à respiração noturna, os maiores valores foram encontrados no tratamento com o herbicida atrazina (fig. 8). Não foram verificadas diferenças estatísticas entre as plantas controle e as plantas contendo SNP.

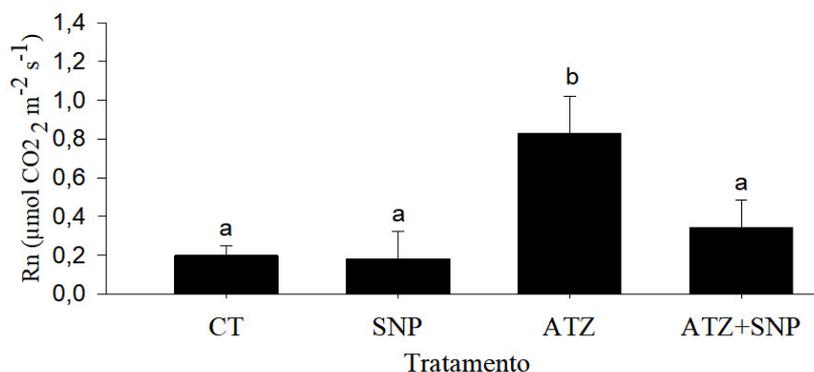


Figura 8. Respiração Noturna ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de SNP. CT (controle); SNP (nitroprussiato sódico); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+SNP (Atrazina + nitroprussiato sódico). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

4.5 Atividade de enzimas antioxidantes

Não foi possível observar variação na atividade de nenhuma das enzimas analisadas (SOD, POX, APX e CAT) (Fig. 9). De fato, em todos os tratamentos a atividade obtida foi similar a observada no controle.

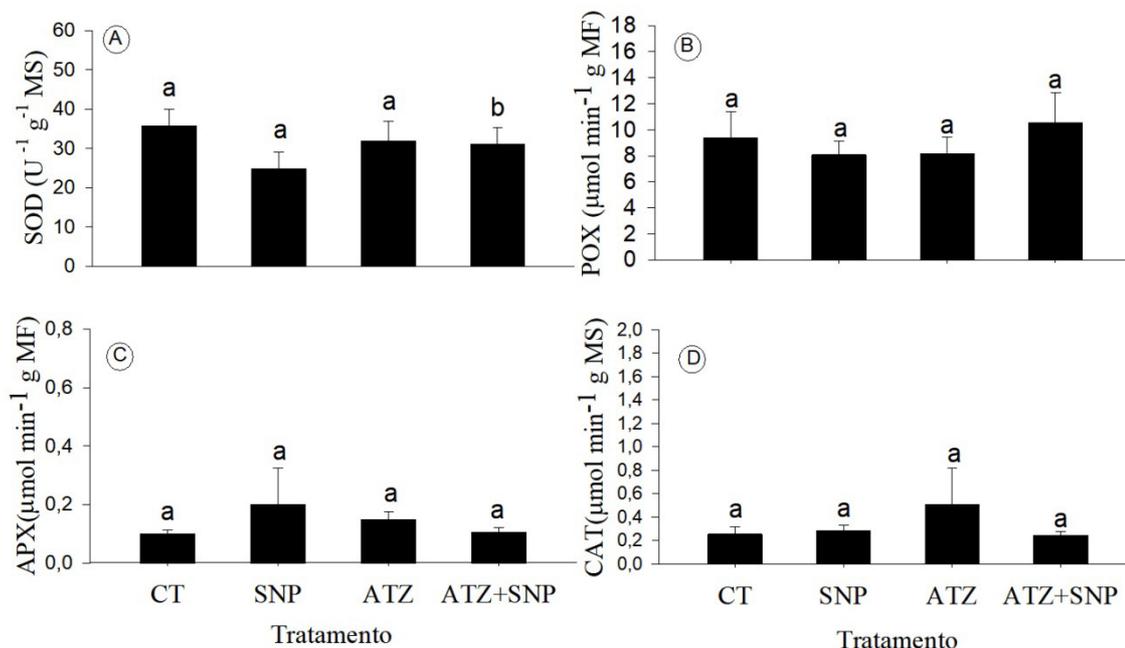


Figura 9. Superóxido Dismutase (SOD) (A), Peroxidase (POX) (B), Ascorbato peroxidase (APX) (C), Catalase (CAT) (D), em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de SNP. CT (controle); SNP (nitroprussiato sódico); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+SNP (Atrazina + nitroprussiato sódico). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

4.6 Taxa de crescimento relativo e índice de tolerância à atrazina

A taxa de crescimento relativo dos tratamentos contendo o herbicida foram menores que a do controle, evidenciando dano (fig. 10A). E com relação ao índice de tolerância, foi possível observar que com relação ao controle, que expressa à razão 100%, o tratamento com atrazina obteve apenas 40,7% enquanto o tratamento de atrazina + snp obteve 54,8% evidenciando atenuação dos danos (Fig. 10B).

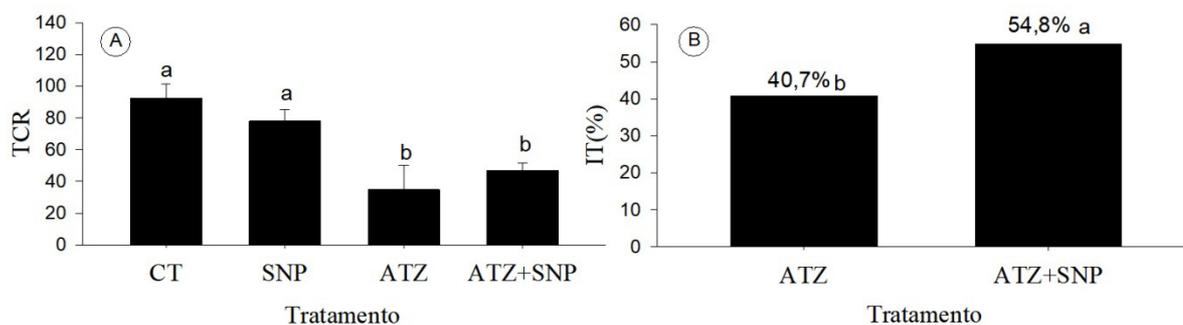


Figura 10. Taxa de crescimento relativo (A), Índice de tolerância (IT) (B). em *Pistia stratiotes* expostas ao herbicida atrazina na presença e na ausência de SNP. CT (controle); SNP (nitroprussiato sódico); ATZ (herbicida atrazina); ATZ+SNP (Atrazina + nitroprussiato sódico). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A presença de atrazina nas células vegetais desencadeou uma série de danos bioquímicos e fisiológicos em *Pistia stratiotes*. Dentre as várias alterações promovidas por esse herbicida, uma das mais danosas inclui o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), com consequente desnaturação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (ZHAO et al., 2005). As ERO são derivadas do oxigênio molecular pelas reações de transferência de elétrons, que resultam na formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e, subsequentemente, do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NIU e LIAO, 2016). No tratamento apenas com atrazina foi possível observar que o herbicida provocou aumento na geração de $O_2^{\cdot-}$, fato que era esperado, visto que o herbicida afeta diretamente o fotossistema II, e pode promover a transferência de elétrons para o oxigênio, com consequente formação de ERO. O SNP no entanto, foi capaz de atenuar esse dano causado pelo herbicida, e provavelmente, deve-se a capacidade de reagir com o ânion superóxido. Segundo Silva (2015), em sistemas biológicos, o NO pode reagir rapidamente com o $O_2^{\cdot-}$, produzindo o peroxinitrito ($ONOO^-$). Em pH fisiológico, o peroxinitrito é protonado, formando ácido peroxinitroso ($ONOOH$), o qual, dependendo da sua concentração, é convertido rapidamente a nitrato (NO_3^-) (POPOVA; TUAN, 2010). Apesar de ser comumente citado na literatura pela ação citotóxica (LIMA; ABDALLA, 2001, HUMMEL et al, 2006, MALERBA; CERANA, 2018), o peroxinitrito e seus subprodutos podem agir como potentes moduladores da regulação redox em várias rotas de transdução de sinal (LIAUDET et al., 2009) através da nitração de proteínas (ARASOMOWICZ-JELONEK; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2011). A

hipótese de que o NO teria eliminado o ânion superóxido diretamente é reforçada pelo fato de que não foram observados aumentos na concentração de H_2O_2 . Convém ressaltar, no entanto, que além de eliminar o ânion superóxido diretamente, o NO também pode agir como sinalizador e aumentar a concentração de antioxidantes, como as enzimas catalases, peroxidases e peroxidases do ascorbato (CAT, POX, APX) (MITTLER, 2002), bem como a superóxido dismutase (SOD) (DEL RIO, 2015), que eliminam ou evitam a formação dessa molécula.

Como consequência do aumento na formação de ERO, é comum que plantas expostas à atrazina apresentem danos em suas membranas celulares. Isso ocorreu também com *P. stratiotes* porque, embora não tenham sido observadas alterações na concentração de MDA em relação ao controle, o extravasamento de eletrólitos aumentou consideravelmente nesse tratamento. Mais uma vez, o SNP foi capaz de mitigar a ação deletéria do herbicida, já que no tratamento ATZ+SNP tanto o conteúdo de MDA quanto o extravasamento de eletrólitos foram menores do que quando as plantas foram expostas de forma isolada ao herbicida. De fato, em adição ao seu papel sinalizador, o óxido nítrico pode agir também como potente inibidor da peroxidação lipídica, por meio de reação em cadeia que culmina na eliminação de hidroperóxidos lipídicos (produtos primários da peroxidação lipídica). Além disso, o óxido nítrico pode, ainda, inibir muitos potenciais iniciadores da peroxidação lipídica (HOGG E KALYANARAMAN, 1999).

Os dados de fluorescência permitem determinar de forma indireta o fluxo de transferência de elétrons (TROPALDI et al., 2015) e os dados obtidos quando *P. stratiotes* foi exposta ao poluente indicam que esse processo foi comprometido pelo atrazina. Esse resultado é bem conhecido em plantas expostas à atrazina, uma vez que esse herbicida é um inibidor seletivo do fotossistema II (SILVA, 2015; HESS, 2000). Quando o transporte de elétrons é reduzido pela ação de herbicidas, há aumento proporcional na fração de energia absorvida que é reemitida na forma de fluorescência, com conseqüente queda na eficiência quântica do fotossistema II e na taxa de transporte de elétrons. Em alguns casos esse decréscimo é acompanhado por incrementos no NPQ, um indicador da dissipação termal na antena do fotossistema II, representando um importante mecanismo de adaptação em plantas expostas a estresses abióticos (SILVA et al., 2014). No presente estudo, no entanto, não foram observadas alterações nos valores de NPQ, bem como nos valores do quenching não fotoquímico (qN) (SILVA JR., 2008). No entanto, foi visível a diminuição do ETR, fato que corrobora a afirmação

de que o herbicida atrazina, reduz a taxa de transportes de elétrons. Dayan et al. (2009), monitoraram o ETR em plantas de *Digitaria sanguinalis* e *Abutilon theophrasti* submetidas à aplicação de amicarbazona e atrazina. A taxa de transporte de elétrons para *Digitaria sanguinalis* e *Abutilon theophrasti* foi completamente inibida com oito horas de aplicação dos herbicidas. O parâmetro qP, por sua vez, indica a proporção de centros de reação abertos no FSII (MINAGAWA, 2008), estando diretamente relacionado com o estado redox da plastoquinona e decresce na proporção do fechamento dos centros de reação (SOUSA, 2012). Neste estudo foi observada a redução de qP nos tratamentos com atrazina e também a redução no rendimento quântico da fixação de CO₂, demonstrando a ação inibitória do herbicida no fotossistema. Em relação aos parâmetros de fluorescência, a adição de SNP não foi capaz de atenuar os danos desencadeados pela atrazina.

Além de impactar os parâmetros de fluorescência da clorofila a, a atrazina também afetou a concentração de pigmentos fotossintéticos e a fixação de carbono. A atrazina é um herbicida da família das triazinas, cujo mecanismo de ação é interromper a fotossíntese, com danos como o bloqueio da transferência de elétrons no fotossistema II (ESPERANZA et al., 2016), e, conseqüentemente, irá impactar a etapa de assimilação de carbono. Embora a atrazina tenha diminuído substancialmente a taxa de fixação de carbono em *P. stratiotes*, o SNP foi capaz de atenuar esse impacto, ainda que parcialmente. Esse efeito benéfico do SNP provavelmente é um reflexo de menores danos nas células, já que o tratamento ATZ+SNP reduziu a concentração de ânion superóxido e diminuiu danos nas membranas celulares. O fato dos parâmetros de condutância estomática não terem sido alterados corrobora para que a afirmação seja verdadeira, pois indica que menor fixação de carbono não foi consequência de fechamento estomático, mas sim de outras modificações internas da planta, como a ocorrência de danos bioquímicos. As plantas submetidas ao herbicida apresentaram valores para a concentração interna de CO₂ (Ci) maiores do que o controle, indicando que o CO₂ que entrava na câmara subestomática não estava sendo fixado pelas enzimas do ciclo de Calvin, as quais são sensíveis a herbicidas, em especial a Rubisco (FLEXAS et al., 2006). De modo geral, os danos oxidativos influem em queda dos pigmentos cloroplastídicos, justificando a alteração encontrada na clorofila a e clorofilas totais, no entanto, era esperado que houvesse alteração também nos carotenoides, visto que sintomas de herbicidas que interferem no FSII levam as plantas a clorose que ocorre pela destruição da clorofila por meio das reações de foto-oxidação no cloroplasto,

seguidas de uma necrose que ocorre pela destruição das membranas pela peroxidação dos lipídeos (PACHECO,2017). No entanto, os mesmos se mantiveram estatisticamente similares ao controle.

O tratamento com herbicidas inibidores do fotossistema II é comumente associado ao aumento da taxa respiratória. A respiração é o principal processo fisiológico por meio do qual as plantas obtêm energia (ATP), logo o processo de respiração está intimamente vinculado à capacidade fotossintética das plantas (ARAÚJO et al., 2014). Foi realizada análise da respiração noturna e verificou-se que o tratamento com atrazina promoveu aumento significativo na taxa respiratória. Dessa forma, com suas condições fisiológicas alteradas, a planta tende a desviar a energia que seria utilizada no crescimento, desenvolvimento e reprodução, para a geração de antioxidantes, para proteção dos danos celulares e manutenção do seu metabolismo (PEREIRA & HOUSSAINI, 2015). Cabe ressaltar, no entanto, que esse aumento na respiração, associado com a queda na fixação de carbono, resulta em um balanço de carbono negativo que pode, em última instância, provocar a morte da planta (DAVID & HOLDING, 2013).

Na presença de SNP não foram observados aumentos na respiração, provavelmente porque menos danos celulares foram desencadeados e, portanto, não foi necessário input de energia para a reparação celular.

Algumas enzimas participam diretamente dos mecanismos antioxidantes em plantas, sendo que a SOD é considerada a primeira linha de defesa frente ao estresse oxidativo, sendo responsável por realizar a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (NASCIMENTO et al, 2015). Catalases, peroxidases e peroxidases do ascorbato catalisam a conversão do peróxido de hidrogênio em compostos não tóxicos. As peroxidases do ascorbato, juntamente com as redutases da glutathione, participam do ciclo ascorbato-glutathione que, adicionalmente, promovem a decomposição do peróxido de hidrogênio (MITTLER, 2002). O NO tem sido amplamente relatado como sendo capaz de agir como uma molécula sinalizadora que aumenta a síntese e/ou atividade destas enzimas antioxidantes (DEL RIO, 2015). No entanto, não foi possível evidenciar alterações destas enzimas em nenhum dos tratamentos analisados. Zhang et al (2014) afirmam que o acúmulo de atrazina nas plantas de arroz levou a respostas tóxicas, como a geração excessiva de peróxido de hidrogênio e ânions superóxido, desencadeando o sistema de defesa da planta contra o estresse oxidativo induzido por herbicida; no estudo citado, esses efeitos puderam ser

evidenciados, principalmente, pelas atividades aumentadas de várias enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase. Todavia, mesmo sem observar essas alterações nas enzimas antioxidantes em *P. stratiotes*, o NO foi capaz de atenuar os danos desencadeados pelo herbicida, indicando que outras vias de defesa foram ativadas, como por exemplo, por meio do aumento na concentração de antioxidantes não enzimáticos, como a glutatona. Além da sua ação como antioxidante, a glutatona também é capaz de se complexar com o herbicida, formando complexos glutatona-atrazina que são direcionados para o vacúolo, e podem ser armazenados sem causar danos aos vegetais, sendo esta uma das principais respostas das plantas a este herbicida (ERINLE et al., 2016).

A análise citogenética nas plantas expostas ao herbicida indicou que o tratamento com Atrazina não afetou de forma aparente o índice mitótico da planta, permanecendo os dados similares ao controle. Todavia, estudos como o de Kumar e Srivastana (2015), em trigo (*Fagopyrum esculentum* Moench), mostram que há redução gradual no índice mitótico como resultado do aumento na concentração dos herbicidas glifosato e atrazina. Algumas anormalidades, mitoses anormais, espalhamento, viscosidade, desorientação, anomalias cromossômicas precoces da c-mitose, foram encontrados após o tratamento da ponta da raiz com os herbicidas. A redução gradual do índice mitótico, juntamente com a maior taxa de anormalidades cromossômicas, mostram claramente que os herbicidas são tóxicos para as plantas no nível dos cromossomos, comprometendo assim o funcionamento do sistema radicular. Resultados similares foram encontrados em *Allium cepa* e *Vicia faba* tratadas com atrazina (ELGHAMERY et al., 2000). É possível que a falta de alteração no presente estudo, no entanto, seja pelo baixo tempo de exposição ou a concentração de atrazina que foi relativamente baixa. No tratamento de atrazina em conjunto com o NO, por sua vez, foi possível verificar aumento no índice mitótico, indicando que o NO está induzindo a divisão celular. De fato, Zhu et al. (2016) e Ötvös et al. (2005) observaram que o tratamento com NO é capaz de estimular o processo de divisão celular. Esses autores demonstraram que essa molécula atua diretamente com a auxina, mediando a passagem da fase G1 para S, não sendo observado esse efeito quando as células foram tratadas com cPTIO, um sequestrador de NO. No presente estudo foi possível observar que a atrazina promove o aumento de ERO e também danifica membranas celulares.

Assim sendo, o aumento no índice mitótico no tratamento ATZ+SNP pode representar uma resposta de defesa da planta, a fim de formar novas células radiculares

que substituiriam as células danificadas pelo herbicida e, dessa forma, permitir a manutenção da função radicular, mantendo ativos os sistemas de absorção e transporte da raiz.

Como resultado das várias alterações desencadeadas pelo óxido nítrico, as plantas expostas à atrazina em conjunto com o SNP apresentaram maior índice de tolerância. O índice de tolerância é o fator que permite analisar a capacidade global da planta em tolerar estresses desencadeados por poluentes. Apesar da atenuação dos danos pelo SNP, no entanto, ele não foi capaz de reverter o impacto negativo do herbicida sobre a taxa de crescimento das plantas, provavelmente pelas grandes quedas observadas na taxa de assimilação de carbono.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que exposição da *Pistia stratiotes* ao herbicida atrazina acarretou danos diversos às plantas, particularmente na taxa fotossintética e nas membranas celulares, o que refletiu em baixo crescimento e baixo índice de tolerância ao poluente. A adição do NO resultou no aumento do índice de tolerância ao herbicida, e envolveu a ação do NO na atenuação do estresse oxidativo, na mitigação dos danos fotossintéticos e, também, na manutenção do crescimento radicular. Contudo, faz-se necessário pesquisas mais aprofundadas referentes à forma de atuação do NO na sinalização desta planta a agrotóxicos, principalmente no que tange a sinalização cruzada com outras moléculas sinalizadoras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, W. L., NUNES-NESE, A., & FERNIE, A. R. On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. **Photosynthesis research**, 119(1-2), 141-156, 2014.
- ARASIMOWICZ- JELONEK, M.; FLORYSZAK-WIECZOREC, J.; KOSMALA, A. Are nitric oxide donors a valuable tool to study the functional role of nitric oxide in plant metabolism, **Plant Biology** v.13 p.747-756, 2011.
- ARCANJO E SILVA, S. Citogenotoxicidade e modificações morfofisiológicas em *Pistia stratiotes*. Sob contaminação com cádmio, Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - **Universidade Federal de Lavras**, 2011.
- ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. D. F.; CAMARGO, P. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimento do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v.30 p.1119-1127, 2007.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, **Plant Physiology** 24: 1-15, 1949.
- CHEVRIER, C.; LIMON, G.; MONFORT, C.; ROUGET, F.; GARLANTÉZEC, R.; PETIT, C. Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE Birth Cohort. **Environmental Health Perspectives**, v.119, n. 7, p. 1034-1041, 2011.
- CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural Food Chemistry** v.23 p.458-460, 1975.
- DEL RIO, L. A. ROS and RNS in plant physiology: an overview. **Journal of Exp. Botany**, v.66 p.2827-2837,2015.
- DAVID, A.M.S., HOLDING, R. *Plant Growth Processes: Transpiration, Photosynthesis, and Respiration*, EC1268 ed, University of Nebraska–Lincoln Extension, United States, (2013).
- DAYAN, F. E.; TRINDADE, M. L. B.; VELINI, E. D. Amicarbazone, a new photosystem II inhibitor. **Weed Sci.**, v. 57, n. 6, p. 579-583, 2009.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Phys. Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002.

- EL-GHAMERY, A. A., EL-NAHAS, A. I. AND MANSOUR, M. M. The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Cytologia** v.65:277–287. 2000.
- ERINLE, K. O.; JIANG, Z.; MA, B.; LI, J.; CHEN, Y.; UR-REHMAN, K.; SHAHLA, A. ZHANG, Y. Exogenous calcium induces tolerance to atrazine stress in *Pennisetum* seedlings and promotes photosynthetic activity, antioxidant enzymes and psbA gene transcripts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.132 p. 403–412, 2016.
- ESPERANZA, M.; SEOANE, M.; RIOBOO, C.; HERRERO, C.; EARLY, A. Alterations on photosynthesis-related parameters in *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to atrazine: A multiple approach study. **Cid. Science of the Total Environment** v.554–555 p.237–245, 2016.
- FARNESE, F. S.; MENEZES-SILVA, P.E.; GUSMAN, G. S.; OLIVEIRA, J. A. When the bad guys become the good ones: The Key Role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses of abiotic stress. **Plant Science** v.74 p.71, 2016.
- FLEXAS, J. ET AL. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. **New Phytologist**, v. 172, p. 73–82, 2006.
- FUNGILLO, L.; SKELLY, M. J.; LOAKE, G. J.; SPOEL, S. H.; SALGADO, I. S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. **Nat. Commun.** v.5 p.54001, 2014.
- GAY, C.; GEBICKI, J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xyleneol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry** 284: 217-220, 2000.
- GIANESSI, P.L. The Increasing Importance of Herbicides in Worldwide Crop Production. **Pest Management Science**, v.69, n.10, p.1099-1105, 2013.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants, **Plant Physiology** v.59 p.309–314, 1977.
- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R.M.; RIAL-OTERO, R.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. **Food Chemistry**, v.107, n.3, p.1342-1347, 2008.
- HESS, F.D. Light – dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, v.48. P 160-170. 2000.
- HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant

tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta** 207: 604-611, 1999.

HOGG, N., KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta** 1411, 378–384. 1999.

HUMMEL S. G.; FISCHER A. J.; MARTIN S.M.; SCHAFER F.Q.; BUETTNER G. R. Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way. **Free Radic Biol Med.** V 40(3):501-6. 2006.

IBAMA, Boletim de Produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos 2017. <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>, acesso em 20, outubro de 2018.

KUMAR, G.; SRIVASTAVA, A. Comparative Genotoxicity of Herbicide Ingredients Glyphosate and Atrazine on Root Meristem of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Jordan journal of biological science.** V.8. 221-226, 2015.

KUO, M.C.; KAO, C.H. Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum** 46: 149-152, 2003.

LIAUDET L, VASSALLI G, PACHER P. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. **Front Biosci.** 2009;14:4809–4814.2009.

LIMA E.S, ABDALLA D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev Bras Cienc Farm.** V 37(3):293-303. 2001.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: Um guia para ação em defesa da vida, Rio de Janeiro, **AS-PTA**, 2011.

LORO L. V., MURUSSI C. , MENEZES C. , LEITEMPERGER J. , SEVERO E. , GUERRA L. , COSTA M. , XAVIER PERAZZO G., ZANELLA R. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 13(3): 569-578, 2015.

MALERBA M.; CERANA R. Role of peroxynitrite in the responses induced by heat stress in tobacco BY-2 cultured cells. **Protoplasma** 255:1079–1087. 2018.

MALIK, S. I.; HUSSAIN, A.; YUN, B.W.; SPOEL, S. H.; LOAKE, G. J. GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defense response. **Plant Science.** v.181 p.540–544, 2011.

MARTI, M. C.; FLOREZ-SARASA, I.; CAMEJO, D.; PALLOL, B.; ORTIZ, A.; RIBASCARBO, M. Response of mitochondrial antioxidant system and respiratory

pathways to reactive nitrogen species in pea leaves. **Physiol. Plant.** v.147 p.194–206, 2013.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. **Journal of Experimental Botany** 51: 659-668, 2000.

MEZZARI, I. A. Utilização de carvão adsorventes para o tratamento de efluentes contendo pesticidas. 2002. 117f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) apresentado ao Departamento de Engenharia Química e Alimentos, **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis,2002.

MINAGAWA, J. Fluorescence quenching analysis. In:STERN, D.; WITMAN, G. (Ed). **The Chlamydomonas Sourcebook**, 2° ed., v. 3.2008.

MIYAKE, C., SHINZAKI, Y., MIYATA, M. AND TOMIZAWA, K. Enhancement of cyclic electron flow around FSI at high light and its contribution to the induction of non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence in intact leaves of tobacco plants. **Plant Cell Physiology**, v. 45, p. 1426–1433, 2004.

MOORE, M.T.; KRÖGER R. Effect of three insecticides and two herbicides on rice (*Oryza sativa*) seedling germination and growth. **Environ. Contam. Toxicol.** v.59(4) p. 574-81, 2010.

MOREIRA, J. C.; PERES, F.; SIMÕES, A. N.; PIGNATI, W. A.; DORES, E. C.; VIEIRA, S. N.; STRÜSSEMANN, C.; MOTT, T. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.18 p.1557-1568, 2012.

NASCIMENTO J. B., BARRIGOSI J. L. F., BORBA T. C. O., MELLO R. Evaluation of rice genotypes for sugarcane borer resistance using phenotypic methods and molecular markers, **Crop Protection**, v 67 p 43-51. 2015.

NIU, L. E LIAO, W. Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic Responses: Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium. **Plant Science** v.7 p.230, 2016.

NIYOGI, K.K. Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 3, p. 455–460, 2000.

OBERMEIER, M.; SCHRÖDER C. A. ;HELMREICH, B.; SCHRÖDER, P. The enzymatic and antioxidative stress response of *Lemna minor* to copper and a chloroacetamide herbicide. **Environ Sci Pollut Res** v.22 p.18495–18507, 2015.

ÖTVÖS, K., PASTERNAK, T. P., MISKOLCZI, P., DOMOKI, M., DORJGOTOV, D., BOTTKA, S. & FEHÉR, A. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated

- activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. **The Plant Journal**, v. 43(6), 849-860, 2005.
- PACHECO, L.C. P. DA S. Atividade de herbicidas pré-emergentes em solos do cerrado, na presença e ausência de resíduos orgânicos, Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, **Universidade Federal de Goiás**, 2017.
- PAN, Pesticide Action Network, Pesticide Registration Status. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org> >, acesso em 30, outubro de 2016.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, 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 p.137-143, 1999.
- PEREIRA, L. M. & HOUSSAINI, M. L. T-S. Estresse oxidativo e parâmetros analíticos em aveia branca (*Avena sativa* L.): estado da arte. **Salão do conhecimento**, v. 1, n. 1. 2015.
- PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUNOIS, G. S.; É veneno ou é remédio?: Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, 2003.
- PÉREZ, G. L.; VERA, M. S.; MIRANDA, L. Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. In: KORTEKAMP, A. (Ed.). **Herbicides and Environment**. p. 343 – 368, 2011.
- PIO, M. C. S.; SOUZA, K. S.; SANTANA, G. P. Capacidade da *Lemna aequinoctialis* para acumular metais pesados de água contaminada, **Acta Amazonica**, v.43 n.2 p.203-210, 2013.
- POPOVA, L.; TUAN, T. nitric oxide in plants : properties, biosynthesis and physiological functions. **Iranian journal of science & technology** , transaction A v. 34 n. a3 p 245-255, 2010.
- SAXENA, I.; SHEKHAWAT, G.S. Nitric oxide (NO) in alleviation of heavy metal induced phytotoxicity and its role in protein nitration. **Nitric Oxide** v.32 p.13–20, 2013.
- SILVA, K. S. Proteção do óxido nítrico sobre o estresse oxidativo causado por herbicidas em arroz irrigado. Diss. **Universidade Federal de Santa Maria**. 2015.
- SCORZA JÚNIOR, R. P.; REGITANO, R. L. O. Sorção, degradação e lixiviação do inseticida tiametoxam em dois solos de Mato Grosso do Sul, **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16 n.5 p.564-572, 2012.
- SEVILLA, F.; CAMEJO, D.; ORTIZ-ESPÍN, A.; CALDERÓN, A.; LÁZARO, J. J.; JIMÉNEZ, A. The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on

its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. **J. Exp. Bot.** v.66 p.2945–2955, 2015.

SILVA JÚNIOR, J. DO B.F., Interação milho-*Herbaspirillum seropedicae*: Seleção de estirpes, resposta fisiológica e promoção do crescimento em genótipos submetidos à seca. Dissertação de mestrado. **Universidade Estadual do Norte Fluminense** Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brasil, 93p, 2008.

SILVA M. A. Otimização de amostradores passivos para a determinação de pesticidas em água utilizando SPE e GC-MS. 2012. 121 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) apresentada ao Instituto de Química da **Universidade Federal da Bahia**, Salvador, 2012.

SINGH, V.P.; SRIVASTAVA, P.K.; PRASAD, S.M. Nitric oxide alleviates arsenic-induced toxic effects in ridged Luffa seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry** v.71 p.155-163, 2013.

SOLOMON, K. R.; et al. Effects os herbicide on fish. In: TIERNEY, K. B.; FARREL, A.P.; BRAUNER, C. J. **Organic chemical toxicology of fishes**. Elsevier Cap 7, p 370-403, 2014.

SOUSA C. P. Ação de herbicidas sobre a atividade fotossintética de plantas com metabolismo C3 e C4. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. **Universidade Federal De Pelotas**, 2012.

SRIVASTAVA, S. E DUBEY, R. S. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, p. 1–16, 2011.

TODESCHINI, B. H. Avaliação da presença de agrotóxicos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em águas superficiais e na rede pública de abastecimento de água no Rio Grande do Sul. 2013. 122f. Dissertação (Mestrado em perícia criminal ambiental) apresentado so programa de pós-graduação em perícia criminal ambiental da **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2013.

TROPALDI, L., VELINI, E. D., CARBONARI, C. A., ARALDI, R., CORNIANI, N., GIROTTO, M., & DE FREITAS, I. P. Detecção da tolerância de diferentes espécies de capim-colchão a herbicidas inibidores do fotossistema II utilizando a técnica da fluorescência. **Ciência Rural**, 45(5), 767-773. 2015.

TSAI, W. A review on environmental exposure and health risks of herbicide paraquat. **Toxicology Environmental Chemistry**, v.95, n.2, p.197-206, 2013.

- VAN KOOTEN, O.; SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research** 25: 147-150, 1990.
- VASCONCELLOS, M. C.; PAGLIUSO, D.; SOTOMAIOR, V. S. Fitorremediação: uma proposta de descontaminação de solo, **Estud. Biol. , ambiente Divers.** v.34 n.83 p.261-267, 2012.
- VIEIRA, L. R.; CORRÊA, E. S.; MORAES, B. S.; ROSSATO, M. V.; VESTENA, S. Toxicidade de cádmio em plantas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v.19 n.2 p. 1574-1588, 2015.
- VIEIRA C. E. D., COSTA P. G. , LUNARDELLI B. , OLIVEIRA L. DE , CABRERA L. DA C. , RISSO W.E., PRIMEL E.G., MELETTI P.C. , FILLMANN G., MARTINEZ C. B. DOS R. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment* 542 P. 44–56 (2016).
- WANG, Y.; LOAKE, G.J.; E CHU C. Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. **Frontiers in Plant Science** v.4 p.314, 2013.
- WEI, A.; FU, B.; WANG, Y.; ZHAI, X.; XIN, X.; ZHANG, C.; CON, D.; ZHANG, X. Involvement of NO and ROS in sulfur dioxide induced guard cells apoptosis in *Tagetes Erecta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v.114 p.198-203, 2015.
- ZHANG J. J.; LU Y. C.; ZHANG J. J.; TAN L. R.; YANG H. Accumulation and toxicological response of atrazine in rice crops, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, V. 102, Pages 105-112, 2014.
- ZHAO S., ARTHUR E.-L., MOORMAN T.-B., AND COATS J.-R. The evaluation of microbial inoculation and vegetation to enhance the dissipation of atrazine and metolachlor in soil. **Environ. Toxicol. Chem.** 24, 2428-2434, 2005.
- ZHU, Y., LIAO, W., NIU, L., WANG, M., & MA, Z. Nitric oxide is involved in hydrogen gas-induced cell cycle activation during adventitious root formation in cucumber. **BMC plant biology**, v.16(1), 146. 2016.