



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA



LEANDRO FERNANDO FELIX

Utilização de *Salvinia* spp. na fitorremediação de atrazina em ambiente aquático e a redução da bioacumulação em *Danio rerio*

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Departamento de Ciências Biológicas como parte do requisito de obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.º Dr. Valdemar Luiz Tornisielo.

**Piracicaba/SP
2023**

1. Introdução e Justificativa

Segundo a ONU, em 2050, a população mundial irá totalizar cerca de 9,7 bilhões de habitantes, o que indica um crescimento populacional constante. Em vista desse fato, é necessário pensar nos desafios que uma população dessa densidade enfrentará. Dentre eles, a insegurança alimentar se destaca, além de ainda possuir gargalos já constantes no mundo atual e tendendo a agravar-se ainda mais. Segundo dados de 2017, cerca de 815 milhões de pessoas já se encontram em situação de vulnerabilidade alimentar (ONU, 2017). Sobretudo, a produção de alimentos enfrenta diversos problemas que interferem na sua escala de produção, como, por exemplo, o atingimento de pragas nas culturas, reduzindo a produtividade e impactando no mercado mundial de alimentos. Assim, a utilização de pesticidas surge como alternativa para a redução das perdas nas áreas agrícolas destinadas à produção de alimentos, visando a obtenção de resultados que estimulem que a população atual e futura consiga ter uma alimentação segura e digna (NUNES & RIBEIRO, 1999).

Quando aplicados no ambiente, os pesticidas podem ativar capacidades próprias que os levam a diferentes processos, como a retenção, o transporte e a degradação (BARROSO; MURATA, 2021). Se tratando de retenção, os pesticidas podem ser absorvidos pelas plantas, além de sofrerem sorção na matéria orgânica ou no solo e formarem resíduos ligados. No transporte, pode ocorrer a lixiviação, que se caracteriza como o transporte vertical do pesticida no solo, a volatilização, que é a passagem do estado sólido ou líquido para o gasoso, o runnin (escoamento subsuperficial) e o runoff (escoamento superficial). Já os processos de degradação são a hidrólise, em que a molécula será quebrada pela interação com a água, a fotodegradação, que será a degradação por meio da radiação solar, e a biodegradação, caracterizada pela ação de microrganismos (SILVA, 2000).

As propriedades físico-químicas dos pesticidas irão interagir com as propriedades do meio e assim, determinar a sua dinâmica ambiental, isto é, como ocorrerá o seu comportamento após a exposição ao ambiente de aplicação. As propriedades de cada um dos produtos podem fazer com que ele aja de diferentes formas no local em que se encontra, como a sua acumulação, devido a propriedades como a lipofilicidade e baixa solubilidade em água. Produtos com alta solubilidade em água tendem a sofrer transporte vertical no perfil do solo (lixiviação), fazendo com que ele penetre no solo (LAVORENTI, 2019). A atrazina (6-chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) é muito utilizada no setor agrícola e é amplamente aplicada por ser um herbicida que controla diversos tipos de plantas daninhas, sendo principalmente utilizado em cultura de milho. Possui um caráter considerado

básico, com pKa 1,7, moderada solubilidade em água ($S_w = 35 \text{ mg L}^{-1}$), $\text{Log Kow} = 2,34$ e pressão de vapor de $2,89 \times 10^7 \text{ mmHg}$ (LEWIS et al. 2016).

A lixiviação é um dos processos de transporte mais importantes que os pesticidas necessitam durante sua ação no banco de sementes (atingindo até 20 centímetros de profundidade) (CERDEIRA, 2005). Quando um herbicida é aplicado em pré-emergência, ou seja, no solo, a absorção das plantas será por meio de processos radiculares, em que a raiz será a principal fonte de absorção, além dos pelos absorventes e dos meristemas radiculares, por exemplo. As propriedades físico-químicas de um pesticida determinam se o mesmo irá sofrer o processo de lixiviação, além de determinar a intensidade deste processo junto aos fatores ambientais, pois quando não há a capacidade de lixiviar no solo, esse herbicida pode acabar se acumulando pela superfície, o que pode acarretar no desenvolvimento de outros processos, como o escoamento superficial e subsuperficial, em que o pesticida irá se espalhar pelo solo por meio da água, como de enxurradas (PINHO et. al, 2006).

A concentração de atrazina na água pode variar de acordo com o ambiente analisado, por exemplo, em água do mar, a atrazina foi detectada numa faixa de 0,2 a 800 ng L^{-1} (NODLER et al. 2013). Maiores quantidades, em cerca de 0,05 a 3 ug L^{-1} , foram encontradas na água doce no estudo de BACHETTI et al. (2021). Além da detecção frequente em águas, que pode ser resultante das diversas aplicações de atrazina diferentes áreas, este pesticida já foi muito utilizado em pesquisas de toxicidade. Sobretudo, concluiu-se que a atrazina pode gerar contaminação cruzada em solos e águas subterrâneas, devido às suas características físico-químicas. Como exemplo, MARTINAZZO & PINHEIRO et. al, 2011, mostrou no desenvolvimento de sua pesquisa que a exposição de atrazina ao seu sistema teste, potencializou a contaminação, evidenciando o risco ambiental que a mesma pode oferecer. Além disso, verificou-se a capacidade de bioacumulação do herbicida em organismos não-alvo, como nas larvas de tilápia-do-nilo no estudo evidenciado por CHISTE & TAKESHITA et. al, 2019, evidenciando que não só houve níveis de bioacumulação, mas também de toxicidade.

Tecnologias para a remediação de pesticidas no ambiente aquático são fundamentais para a redução de seus efeitos negativos no ecossistema. Dentre elas, a fitorremediação se caracteriza como uma técnica de utilização de uma planta para a descontaminação de, por exemplo, água e solo. Um fator importante da fitorremediação é que as plantas absorvem o contaminante, com o intuito de limpar o ambiente em que está contaminado e, além disso, na

absorção, ela pode realizar a metabolização do composto, ou somente o armazenar (PIRES et. al, 2003). Um dos exemplos de plantas que podem ser utilizadas na fitorremediação são as plantas aquáticas, pois elas reduzem a duração e a intensidade da exposição do pesticida por meio da absorção. ALONSO et. al, 2021, evidenciou em sua pesquisa o potencial de *Egeria densa* na fitorremediação de saflufenacil em ambiente aquático, trazendo à tona o potencial de uso dessas plantas na remediação de ambientes aquáticos contaminados com o herbicida.

De acordo com a necessidade de uso da atrazina nos sistemas de produção, a frequência e aplicação direcionada ao solo, a tendência desse herbicida ao processo de lixiviação e contaminação de corpos hídricos, é necessário desenvolver alternativas para a remoção de atrazina de ambientes contaminados. Portanto, o presente trabalho visa avaliar a capacidade de fitorremediação de uma planta aquática sobre a atrazina, além de verificar a bioacumulação em organismos não-alvos. O trabalho também auxiliará na compreensão do comportamento da atrazina em um ambiente aquático, podendo contribuir para o entendimento das diferentes reações que o herbicida pode ocasionar no ecossistema em que está inserido. Assim, contribuindo para a redução de riscos ambientais que tal herbicida pode oferecer para o ambiente.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo analisar a capacidade de fitorremediação da planta aquática *Salvinia Spp.* sobre a molécula de atrazina. Pretende-se analisar como a atrazina se comporta no ambiente aquático, assim como a sua bioacumulação em organismos não-alvos, utilizando zebrafish (*Danio rerio*) como organismo modelo.

3. Material e Métodos

3.1 Local de realização do estudo

O trabalho de conclusão de curso será realizado no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), localizado no campus “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba (SP), Brasil. As plantas *Salvinia Spp.* serão adquiridas no hidrofítotério localizado na ESALQ/USP e mantidas por 4 dias antes do experimento em um aquário com 20 L de água destilado. Serão utilizadas diferentes

densidades de *Salvinia Spp.* em cada tratamento. Os peixes serão adquiridos de fornecedor comercial e mantidos aclimatados durante 12 dias antes de serem usados nos testes. Para a realização dos testes, será utilizado o pesticida Atrazina na concentração ambiental (a ser determinada através de revisão de literatura) e o estudo será realizado utilizando técnicas radiométricas.

3.2 Substância Teste

Serão utilizados o padrão de ^{14}C -atrazina ($[^{14}\text{C}]$ benzyl atrazine com pureza radioquímica maior que 95% e atrazina não radiomarcada, com pureza de 99%. Será preparada uma solução estoque contendo ^{14}C -atrazina e atrazina não radiomarcada, para atingir a concentração necessária a ser utilizada em cada unidade experimental.

Para definir a dosagem aplicada será utilizada a concentração ambiental, que será definida por meio de pesquisas na literatura em ensaios ecotoxicológicos. A concentração escolhida será a ambiental, visando não ocorrer mortalidade dos peixes utilizados no ensaio, visto que pretende-se avaliar o potencial de bioacumulação nos mesmos.

3.3 Unidades Experimentais

As unidades experimentais serão montadas em béqueres de vidro com capacidade de 2 litros, com 1 litro de água destilada. Em cada béquer, será colocado a solução estoque contendo ^{14}C -atrazina + atrazina não radiomarcada. Em cada unidade experimental, a radioatividade aplicada será em torno de 1 milhão de dpm (dose necessária para a sensibilidade do método de quantificação por espectrometria de cintilação líquida - ECL). Após a aplicação da ^{14}C -atrazina e antes de serem inseridos as plantas e os peixes, alíquotas de 5 mL de água de cada tratamento serão retiradas, em triplicata, e inseridas em frascos contendo 5 mL de Insta-gel Plus (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) a fim de verificar a concentração inicial real de ^{14}C -atrazina, em que será determinada após 5 min por Espectrômetro de Cintilação Líquida (ECL) Tri-Carb 2910 TR LSA counter (PerkinElmer). Posteriormente, serão colocadas plantas aquáticas (*Salvinia Spp.*) em densidade a ser determinada, e, por último, um grupo de 5 peixes (*Danio rerio*). O teste será realizado por 7 dias, em um sistema de forma estática, em que a solução que estará em teste não será renovada nos diferentes béqueres durante o período de exposição. Para o tratamento controle, será adicionado apenas água em um béquer e peixes. Durante a realização do experimento, o teste terá condições ambientais verificadas, em que a temperatura da água deverá ficar entre

21 e 25 °C, em fotoperíodo natural, com níveis de saturação de oxigênio de, no mínimo, 60%, pH entre 6 e 7 e dureza de 104 g CaCO₃ L⁻¹ (moderadamente dura).

3.4 Análise da degradação de ¹⁴C-atrazina

Alíquotas de 10 mL de água de cada béquer serão retiradas, em triplicata, aos 1, 2 4 e 7 dias após a aplicação do produto, adicionadas a frascos, secos em fluxo de nitrogênio e avolumados em 0,1 mL de acetona. As alíquotas avolumadas serão aplicadas em placas de sílica-gel e serão submetidas a eluição com sistema de solvente para separação da atrazina e metabólitos por Cromatografia de camada delgada. Os dados da degradação de ¹⁴C-atrazina serão transformados em porcentagem em relação ao aplicado inicialmente. Os decaimentos das curvas experimentais que serão obtidos serão ajustados para um modelo de cinética de primeira ordem conforme apresentado na equação 1:

$$C = C_0 \cdot e^{-kt}$$

Equação 1

Em que C é a concentração de ¹⁴C-atrazina remanescente na água no tempo t (%), C₀ a concentração do herbicida no tempo zero, (k) é a constante de velocidade de degradação, e (t) o tempo de incubação em horas.

Os tempos de meia-vida (DT₅₀) do produto em cada tratamento serão calculados conforme a equação 2:

$$DT_{50} = \frac{\ln 2}{k}$$

Equação 2

3.5 Análise da absorção de ¹⁴C-atrazina pela *Salvinia Spp.*

Após 7 dias de exposição à ¹⁴C-atrazina, as plantas serão retiradas dos béqueres, lavadas com água destilada e colocadas sobre papel absorvente para secagem à temperatura ambiente (20-25 °C). Após 3 dias, as plantas serão picadas e separadas em parte aérea e raiz. Estas amostras serão oxidadas em oxidador biológico (OX500, RJ Harvey Instrument Corporation, Tappan, NY, USA). A solução obtida do oxidador será analisada por 5 min por ECL para quantificar a porcentagem de ¹⁴C-atrazina absorvida pelas plantas.

3.6 Análise da absorção de ¹⁴C-atrazina pelo *Danio rerio*

Ao final do tempo de exposição, todos os peixes serão congelados a -6 °C. Após este período, todos os peixes serão oxidados em oxidador biológico. A solução obtida do oxidador será analisada por 5 min por ECL para detectar a presença de ¹⁴C-atrazina nos peixes.

3.7 Análise estatística

As regressões, referentes às porcentagens de ¹⁴C-atrazina encontradas na água ao longo do tempo, serão inseridas em gráficos, com os valores médios seguidos com os desvios padrões (\pm DP). Todas as figuras de gráficos serão feitas utilizando o Sigma Plot[®] (version 10.0 for Windows, Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA).

4. Cronograma

Atividades	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês
Montagem do experimento	X	X				
Coleta de dados e avaliação do experimento	X	X	X			
Análise de absorção			X	X	X	
Análise estatística			X	X	X	
Escrita e defesa do projeto de TCC					X	X

5. Referências Bibliográficas

ALBRECHT, Leandro Paiola et al. Manejo de organismos geneticamente modificados tolerantes a herbicidas. **BARROSO, AAM; MURATA, T. Matologia: estudos sobre plantas daninhas. Jaboticabal: Fábrica da Palavra, p. 506-547, 2021.**

ALONSO, Felipe Gimenes et al. Potential of *Egeria densa* and *Pistia stratiotes* for the phytoremediation of water contaminated with saflufenacil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 56, n. 7, p. 644-649, 2021.

BACHETTI, Romina A. et al. Monitoring of atrazine pollution and its spatial-seasonal variation on surface water sources of an agricultural river basin. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 106, n. 6, p. 929-935, 2021.

CERDEIRA, Antonio Luiz et al. Lixiviação de atrazina em solo em área de recarga do aquífero guarani. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 4, n. 2, p. 92-101, 2005.

CHISTE, B., TAKESHITA, N., JONSSON, C., BARIZON, R., & HISANO, H. (2019). **Determinação da toxicidade aguda de atrazina em pós-larva de tilápia-do-nilo**. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13., 2019, Campinas. Anais... Campinas: Instituto Agrônomo, 2019. Artigo 19413

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação: **A Agricultura Urbana e os meios de subsistência**. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/greenercities/pt/hup/meios_de_subistencia.html>. Acesso em: 12 de abr. 2023

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação: **Agricultura familiar brasileira: desafios e perspectivas do futuro**. Disponível em: <<http://www.fao.org/family-farming/detail/es/c/522540/>>. Acesso em: 13 de abr. 2023

LAVORENTI, Arquimedes. Características físico-químicas dos contaminantes orgânicos e implicações ambientais. **Contaminantes orgânicos: da análise à biorremediação**, 2019.

NÖDLER, Karsten; LICHA, Tobias; VOUTSA, Dimitra. Twenty years later—atrazine concentrations in selected coastal waters of the Mediterranean and the Baltic Sea. **Marine pollution bulletin**, v. 70, n. 1-2, p. 112-118, 2013.

NUNES, Gilvanda Silva; RIBEIRO, Maria Lúcia. Pesticidas: uso, legislação e controle. **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 9, 1999.

PINHO, Alexandra P. de et al. Modelagem da retenção de herbicidas em zonas ripárias. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 896-902, 2006.

PIRES, Fábio Ribeiro et al. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta daninha**, v. 21, p. 335-341, 2003.

REBELO, Rafaela Maciel; CALDAS, Eloisa Dutra. **Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos**. **Química Nova**, v. 37, p. 1199-1208, 2014.

SILVA, José P. da. **Dissipação de pesticidas: o caso do triadimefão**. 2000.



Leandro Fernando Felix

(Discente do curso de ciências biológicas)



Prof.º Dr. Valdemar Luiz Tornisielo

(Orientador do trabalho de conclusão de curso)

**TERMO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL E DEMAIS
PESQUISADORES ENVOLVIDOS NO PROJETO DE PESQUISA**

À Comissão de Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Coc CB
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ-USP

Com relação ao projeto de título **Utilização de *Salvinia* spp. na fitorremediação de atrazina em ambiente aquático e a redução da bioacumulação em *Danio rerio***, desenvolvido para cumprimento das atividades da Disciplina LCB0525, sob supervisão de **Prof.º Dr. Valdemar Luiz Tornisielo** com execução parcial ou total sob responsabilidade de **Leandro Fernando Felix**, declaramos que:

1. Estamos cientes do conteúdo e assumimos o compromisso de cumprir os termos das Leis e Decretos complementares (Lei No 6.894 de dezembro de 1980, Lei N 7.803 de 18 de julho de 1989, Lei No 9.985 de 18 de julho de 2000, Lei No 9.974 de 6 de junho de 2000, Decreto No 99.556 de 1 de Outubro de 1990, Decreto No 4.340 de 22 de agosto de 2002, Instrução Normativa N 154 de 01 de março de 2007, Decreto N 4.074 de 4 de janeiro de 2002, Instrução Normativa N 169/2008, ABNT-NBR10004 2004, Resolução ANVISA RDC 306 - 07 de dezembro de 2004, Resolução No 358, de 29 de abril de 2005) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas posteriores relativos aos assuntos ambientais pertinentes. Também cientes, que apresentaremos todas as declarações e documentos exigidos pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa CEAP-ESALQ se solicitados;
2. Todos os procedimentos, organismos, insumos, equipamentos e quaisquer outros itens que serão utilizados direta ou indiretamente nesta pesquisa serão adquiridos e empregados segundo a legislação/normas dos órgãos competentes;
3. O projeto prevê recursos financeiros, se necessários, para o gerenciamento dos resíduos oriundos da pesquisa;
4. Todo impacto ambiental decorrente da má condução do projeto é de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos no projeto;
5. Estamos cientes das normas estabelecidas pelo Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da ESALQ (PGRQ-ESALQ) e comprometemo-nos com o seu cumprimento na sede da instituição responsável pela condução do projeto, colaborando para sua adequada realização;
6. Comprometemo-nos a providenciar, quando exigido em função da natureza do projeto de pesquisa, todos os documentos/autorizações exigidos por órgãos públicos ou privados.

Piracicaba, 11 de maio de 2023.

Assinam:



Prof.º Dr. Valdemar Luiz Tornisielo
Docente Orientador(a)



Leandro Fernando Felix
Aluno(a)