

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

MURILO RICARDO SIGAL CARRIÇO

**AUMENTO DA FITORREMEDIAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-
DICLOROFENOXIACÉTICO POR *Plectranthus neochilus*, ATRAVÉS DE
ESTIMULOS LUMINOSOS COM DIODOS EMISSORES DE LUZ**

Uruguaiana

2020

MURILO RICARDO SIGAL CARRIÇO

AUMENTO DA FITORREMEDIAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO POR *Plectranthus neochilus*, ATRAVÉS DE ESTIMULOS LUMINOSOS COM DIODOS EMISSORES DE LUZ

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roehrs

Uruguaiiana

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais)

C316a Carriço, Murilo Ricardo Sigal
AUMENTO DA FITORREMEDIAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-
DICLOROFENOXIACÉTICO POR *Plectranthus. neochilus*, ATRAVÉS DE
ESTIMULOS LUMINOSOS COM DIODOS EMISSORES DE LUZ / Murilo
Ricardo Sigal Carriço.
140 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2021.
"Orientação: Rafael Roehrs".

1. Fitorremediação. 2. Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético. 3.
Plectranthus neochilus. 4. Luz. 5. Infusão. I. Título.

AUMENTO DA FITORREMEDIAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO POR *Plectranthus. neochilus*, ATRAVÉS DE ESTIMULOS LUMINOSOS COM DIODOS EMISSORES DE LUZ

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica

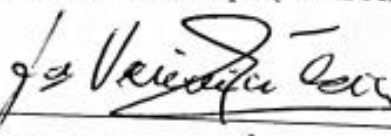
Orientador: Prof. Dr. Rafael Roehrs

Dissertação defendida e aprovada em: 27/02/2021

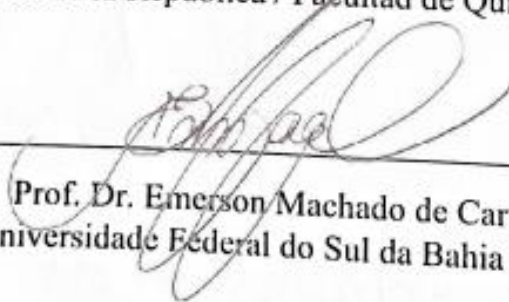
Banca examinadora:



Prof. Dr. Rafael Roehrs
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)



Prof. Dra. María Verónica Cesio Cesconi
Universidad de la República / Facultad de Química (UdeLaR)



Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho
Universidade Federal do Sul da Bahia (UFSB)

Dedico essa dissertação a minha família, que sempre me apoiou em todos os momentos da minha vida, e não mediram esforços para me ajudar a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, Ricardo e Claudia, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, com toda a cumplicidade do mundo. Eu não chegaria aqui sem tr vocês na minha vida, obrigado! Eu Amo vocês!

Ao meu irmão casula Nicolas, entre brigas por silêncio, o que prevalece e o apoio que me deu nos momentos difíceis, de companheirismo, séries e jogatinas que me ajudaram a manter a tranquilidade.

Obrigado aos meu vos José pelo estímulo, a minha vó Carmem e vó Vanda, que sempre me amaram incondicionalmente e me cuidarem.

A Marina por ser companheira e amiga, me apoiar em todas as minhas decisões e incentivar todas as minhas ideias. Meu porto seguro, que me ajudou a manter a calma nos momentos mais difíceis durante o mestrado.

Ao meu orientador Rafael Roehrs, hoje não apenas meu orientador, mas um grande amigo. Obrigado por ter paciência no meu momento desleixado dentro do laboratório, e se preocupar comigo no momento mais difícil da minha trajetória acadêmica. Estará para sempre em meu coração.

Aos meus colegas Bruna e Mateus, pelas nossas brigas descontraídas, discussões, risadas e escritas e pela divisão das mesmas angústias dentro do laboratório. A Isadora, Jefferson e Mateus pelas madrugadas de trabalho e descontração.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Análises Químicas e Ambientais e Toxicológicas (LAQAT) e Laboratório de Estudos Físico-Químicos e Produtos Naturais (LEFQPN) aos meus ex-colegas de Ciências da natureza, por estarem presentes nos meus dias. Cada um foi fundamental para minha saúde mental e para o desenvolvimento deste trabalho.

Á todos os professores e servidores envolvidos com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Unipampa, e, àqueles que de uma forma ou de outra me ajudaram e possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Meu agradecimento ao Professor Elton e aos membros da banca María Verónica Césio Cesconi e Emerson Carvalho pelas contribuições.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

AUMENTO DA FITORREMEDIAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO POR *Plectranthus neochilus*, ATRAVÉS DE ESTIMULOS LUMINOSOS COM DIODOS EMISSORES DE LUZ

AUTOR: Murilo Ricardo Sigal Carriço

ORIENTADOR: Rafael Roehrs

Data e Local da Defesa: Uruguaiiana, 26 de fevereiro de 2021

Plectranthus neochilus é uma planta herbácea e aromática muito utilizada na medicina local para o tratamento de indigestão, doenças relacionadas ao sistema digestivo, infecções de pele, doenças respiratórias, insuficiência hepática e dispepsia. Além disso o *P. neochilus* é um conhecido agente fitorremediador do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). As propriedades medicinais do chá são devidas as propriedades funcionais dos compostos bioativos da planta. Estes compostos por sua vez, são resultantes do metabolismo secundário, principalmente os compostos fenólicos e os alcaloides, nas espécies do gênero *Plectranthus*. Esses metabólitos são responsáveis pelo sistema de defesa das plantas, e possuindo conhecido potencial antioxidante, despertando interesse por sua variedade de ações farmacológicas. Estas alterações podem contribuir para a o aumento da fitorremediação do 2,4-D pelo boldo, tendo em vista o possível aumento da tolerância ao estresse oxidativo causado pela intoxicação por pesticidas. Nesta perspectiva a presente dissertação visa investigar o uso do boldo (*P. neochilus*) em dois vieses distintos, objetivando encontrar a melhor forma de preparar a infusão (melhor forma de extrair os compostos bioativos fenólicos) testando diferentes condições de infusão do boldo. E em outro viés, tendo como objetivo aumentar o potencial fitorremediador do boldo frente ao herbicida 2,4-D, utilizando estímulos luminosos através de LED de diferentes cores, em ambos os casos validando os métodos cromatográficos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para a quantificação de 9 compostos fenólicos em infusões de *P. neochilus*, e outro método para a quantificação do 2,4-D em águas de fitorremediação. Primeiramente as infusões (10 mg/mL) foram realizadas nas seguintes condições: 1) folhas inteiras frescas com e sem agitação; 2) folhas maceradas secas com e sem agitação. O método utilizou extração em fase sólida (EFS) seguindo da análise por CLAE-DAD para a quantificação dos compostos fenólicos (rutina quercetina e os ácidos 3-4-dihidroxibenzoico, rutina, cafeico, cumárico, clorogênico, ferúlico, sinérgico e gálico). Investigamos os níveis de compostos fenólicos totais, sólidos solúveis e capacidade

antioxidante total (DPPH e redução do fosfomolibdênio) nas infusões. Já a influência dos LED na fitorremediação do 2,4-D pelo *P. neochilus* foi avaliada com as seguintes amostras: luz natural, LED cor branco, LED cor azul e LED cor vermelho com e sem a planta durante 28 dias. Amostras de 10 mL de água foram sendo retiradas a cada 7 dias para o monitoramento da fitorremediação em todos os tratamentos. Os métodos cromatográficos passaram pelos seguintes parâmetros de validação: seletividade, linearidade (r^2), precisão, limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ), desvio padrão relativo (RSD) e recuperação (apenas o para o método dos compostos fenólicos). Ambos os métodos cromatográficos se mostraram confiáveis e reprodutíveis para a quantificação dos compostos de interesse, passando por todas as etapas de validação. As infusões com folha seca tiveram maior quantidade de compostos fenólicos e sólidos solúveis, e conseqüentemente maior potencial antioxidante, bem como Rutina e ácido cafeico foram quantificados apenas nestas infusões. Entretanto, a infusão com agitação proporcionou maior extração de compostos fenólicos e sólidos solúveis. A eficiência da associação dos LEDs com o *P. neochilus* nos 28 dias ocorreu na seguinte sequência: luz ambiente + planta (47.0%); branco + planta (37.10%); azul + planta (26.80%); vermelho + planta (3.32%). A vantagem do uso dos LEDs em associação com a planta foi confirmada pelos resultados obtidos com seus respectivos controles que ficaram entre 40.0% e 55.0%. Os resultados mostraram que infusões de *P. neochilus* com folhas secas preparadas sob constante agitação proporcionaram maior extração de compostos bioativos, e mostrou pela primeira vez o aumento da fitorremediação de 2,4-D em água por *P. neochilus*, através de estímulos luminosos com LEDs.

Palavras-chave: Infusão; Compostos fenólicos; CLAE-DAD; Biorremediação; Luz; LED.

ABSTRACT

Masters' dissertation
Graduate Program in Biochemistry
Federal University of Pampa (UNIPAMPA)

INCREASED PHYTOREMEDIATION OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID BY *Plectranthus neochilus*, THROUGH LUMINOUS STIMULATIONS WITH LIGHT EMITTING DIODES

AUTHOR: Murilo Ricardo Sigal Carriço

SUPERVISOR: Rafael Roehrs

Date and Place of Defense: Uruguiana, February 26, 2021

Plectranthus neochilus is a herbaceous and aromatic plant widely used in local medicine for the treatment of indigestion, diseases related to the digestive system, skin infections, respiratory diseases, liver failure, and dyspepsia. In addition, *P. neochilus* is a known phytoremediation agent of the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The medicinal properties of tea are due to the functional properties of the plant's bioactive compounds. These compounds, in turn, are the result of secondary metabolism, mainly phenolic compounds and alkaloids, in species of the genus *Plectranthus*. These metabolites are responsible for the defense system of plants and have known antioxidant potential, arousing interest in their variety of pharmacological actions. These changes can contribute to the increase in phytoremediation of 2,4-D by bilberry, in view of the possible increase in tolerance to oxidative stress caused by pesticide poisoning. In this perspective, this dissertation aims to investigate the use of bilberry (*P. neochilus*) in two different biases, aiming to find the best way to prepare the infusion (best way to extract the bioactive phenolic compounds) by testing different conditions of infusion of the bilberry. And in another way, aiming to increase the phytoremediation potential of the boldo against the herbicide 2,4-D, using light stimuli through LEDs of different colors, in both cases validating the chromatographic methods by high performance liquid chromatography coupled to detector diode array (CLAE-DAD) for the quantification of 9 phenolic compounds in infusions of *P. neochilus*, and another method for the quantification of 2,4-D in phytoremediation waters. First, the infusions (10 mg / mL) were performed under the following conditions: 1) fresh whole leaves with and without agitation; 2) dry macerated leaves with and without agitation. The method used solid phase extraction (EFS) following analysis by HPLC-DAD for the quantification of phenolic compounds (rutin quercetin and 3-4-dihydroxybenzoic acids, rutin, caffeic, coumaric, chlorogenic, ferulic, synergic, and gallic). We investigated the levels of total phenolic compounds, soluble solids, and total antioxidant capacity (DPPH and reduction of phosphomolibdenum) in infusions. The influence of LEDs on the

phytoremediation of 2,4-D by *P. neochilus* was evaluated with the following samples: natural light, white LED, blue LED and red LED with and without the plant for 28 days. Samples of 10 mL of water were taken every 7 days to monitor phytoremediation in all treatments. The chromatographic methods passed the following validation parameters: selectivity, linearity (r^2), precision, limits of detection and quantification (LOD and LOQ), relative standard deviation (RSD), and recovery (only for the phenolic compounds method). Both chromatographic methods proved to be reliable and reproducible for the quantification of the compounds of interest, going through all the validation steps. Dry leaf infusions had a higher amount of phenolic compounds and soluble solids, and consequently greater antioxidant potential, as well as Rutin and caffeic acid were quantified only in these infusions. However, the stirred infusion provided greater extraction of phenolic compounds and soluble solids. The efficiency of the association of LEDs with *P. neochilus* in the 28 days occurred in the following sequence: ambient light + plant (47.0%); white + plant (37.10%); blue + plant (26.80%); red + plant (3.32%). The advantage of using LEDs in association with the plant was confirmed by the results obtained with their respective controls, which were between 40.0% and 55.0%. The results showed that infusions of *P. neochilus* with dry leaves prepared under constant agitation provided greater extraction of bioactive compounds and showed for the first time the increase in 2,4-D phytoremediation in water by *P. neochilus*, through light stimuli with LEDs.

Keywords: Infusion; Phenolic compounds; HPLC-DAD; Bioremediation; Light; LED.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 2,4-D	24
FIGURA 2. MECANISMO DE ATENUAÇÃO TÍPICO DAS PLANTAS CONTRA XENOBIÓTICOS. OS XENOBIÓTICOS PODEM SER ESTABILIZADOS OU DEGRADADOS NA RIZOSFERA, ADSORVIDOS OU ACUMULADOS NAS RAÍZES E TRANSPORTADOS PARA A PARTE AÉREA, VOLATILIZADOS OU DEGRADADOS NO INTERIOR DO TECIDO VEGETAL. A DESINTOXICAÇÃO DE PLANTAS GERALMENTE ENVOLVE CONVERSÃO OU MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (FASE I) SEGUIDA DE CONJUGAÇÃO (FASE II) SEGUIDA DE SEQUESTRO ATIVO (FASE III).	32
FIGURA 3 - GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.	33
FIGURA 4 - . EQUILÍBRIO ENTRE ANTIOXIDANTES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)...	34
FIGURA 5 - VIAS DE DESINTOXICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO PELA CATALASE (CAT), PELO CICLO DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX) E PELO CICLO DA ASCORBATO PEROXIDASE (APX). MONODEHIDROASCORBATO (MDA), ÁCIDO ASCÓRBICO (ASA), DESIDROASCORBATO (DHA), DESIDROASCORBATO REDUTASE (DHAR), GLUTATIONA REDUTASE (GR). SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), MDA REDUTASE (MDAR), GLUTATIONA OXIDADA (GSSG), GLUTATIONA (GSH).	35
FIGURA 6 - CICLO BIOSINTÉTICO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.	37
FIGURA 7 - EXEMPLOS DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E SEUS PRECURSORES, LINHAS VERMELHAS INDICAM GRUPAMENTO REFERENTE A VIA DO ACETATO MALONATO.	39
FIGURA 8 - ESTRUTURA GERAL DOS ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS, ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS E FLAVONÓIDES. (GUTIÉRREZ-GRIJALVA. 2018)	40
FIGURA 9 - PROCEDIMENTO DE FORTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	48
FIGURA 10 - NÍVEIS DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE <i>P. NEOCHILUS</i> . ONDE FENÓLICOS TOTAIS SÃO EXPRESSOS EM MILIGRAMAS DE EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO POR LITRO DE EXTRATO (MGÉAG.L ⁻¹) (A), NÍVEIS DE FLAVONOIDES TOTAIS EXPRESSOS EM MILIGRAMAS DE EQUIVALENTES DE RUTINA POR L DE EXTRATO (MGÉR.L ⁻¹) (B), POTENCIAL ANTIOXIDANTE EXPRESSOS POR MICROGRAMAS DE EQUIVALENTE DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR mL DE EXTRATO (μGÉAA. L ⁻¹) (C) E A VARIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS TRATAMENTOS DE FITORREMEDIAÇÃO PARA SEUS RESPECTIVOS CONTROLES (D). METODOLOGIA DESCRITA NO APÊNDICE 1.	120
FIGURA 11 - NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) NAS FOLHAS (A-1), RAÍZES (B-1) E CAULES (C-1) DE <i>P. NEOCHILUS</i> CONDICIONADAS A FITORREMEDIAÇÃO E	

FITOESTIMULAÇÃO NAS CORES BRANCO, AZUL E VERMELHO E LUZ AMBIENTE E SEUS RESPECTIVOS CONTROLES, CONDICIONADAS AS MESMAS CONDIÇÕES DE LUZ, SEM A ADIÇÃO DE PESTICIDA NA ÁGUA. A-2, B-2 E C-2 APRESENTAM A VARIAÇÃO NOS NIVEIS DE ERO DOS TRATAMENTOS COM SEUS RESPECTIVOS CONTROLES DO AMBIENTE. AS LINHAS INDICAM AS COMPARAÇÕES COM $P < (0,05)$ (*), $P < 0,01$ (**) E $P < 0,001$ (*). METODOLOGIA DESCRITA NO APÊNDICE 1.....	121
--	-----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PLANTAS INFESTANTES CONTROLADAS E DOSES. TABELA RETIRADA DA BULA DO AMINOL 806.....	25
TABELA 2 - DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE FITORREMEDIAÇÃO.....	26
TABELA 3 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DE CADA MECANISMO DE FITORREMEDIAÇÃO	27
TABELA 4. ENZIMAS VEGETAIS E MICROBIANAS COM UM PAPEL NA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS. FAMÍLIA DE ENZIMAS.....	29
TABELA 5. LIMITES PORCENTUAIS DO TEOR DO ANALITO QUE DEVEM ESTAR CONTIDOS NO INTERVALO DE LINEARIDADE PARA ALGUNS MÉTODOS ANALÍTICOS (RETIRADA DE ANVISA. 2017).....	44
TABELA 6 - RECUPERAÇÃO DO ANALITO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO.....	48

LISTA DE SIGLAS

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ / $\mu\text{g}/\text{L}$ – microgramas por litro

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ - $\mu\text{g}/\text{mL}$ – microgramas por mililitro

2,4-D – ácido 2,4- diclorofenoxiacético

2,4-DCP – 2,4- diclorofenol

APX - ascorbato peroxidase

AsA - ácido ascórbico

ATP – adenosina trifosfato

CAT - Catalase

CLAE Erro! Fonte de referência não encontrada. / **HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência / High Performance Liquid Chromatography

DAD – Diarranjo de diodos

DCF – Diclorofluoreceína

DHA - desidroascorbato

DHAR - desidroascorbato redutase

DML+A - Folha seca e macerada submetida a agitação durante seu preparo;

DML-A - Folha seca e macerada sem agitação durante seu preparo.

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EAA – Equivalentes de ácido ascórbico

EAG – Equivalentes de ácido gálico

ER – equivalentes de rutina

ERO/ROS – espécies reativas de oxigênio

FL+A - Folha fresca (recém-colhida) submetida a agitação durante o seu preparo;

FL-A - Folha fresca (recém colhida) sem agitação durante o preparo;

g.i.a/ha – gramas de ingrediente ativo por hectare

g.L⁻¹ – gramas por litro

GPX - glutathione peroxidase

GR - glutathione reductase

GSSG - glutathione oxidada

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

kg.ha⁻¹ – quilogramas por hectare

Kow - Coeficiente de partição octanol-água

L.ha⁻¹ – Litro por hectare

L.i.a/ha – litros de ingrediente ativo por hectare

LD – Limite de detecção

LED – Diodos emissores de Luz

LD Limite de detecção / Limit of quantification

log – Logaritmo

LOQ / LQ - Limite de quantificação / Limit of quantification

MDA – monodehidroascorbato

MDAR – monodehidroascorbato reductase

mg – miligramas

mg.L⁻¹ / mg/L – miligramas por litro

mL – mililitros

ml.min⁻¹ – mililitros por minuto

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

P450 – Citocromo P450

pH – Potencial hidrogeniônico

pKa – Potencial de constante de ionização ácida

r² – Coeficiente de determinação

RS – Rio Grande do Sul

Erro! Fonte de referência não encontrada. – Relative Standar Device/ Desvio padrão relativo

SOD – Superóxido dismutase

t_{1/2} – Meia vida

v/v – volume por volume

µg.mg – microgramas por miligrama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1 Pesticidas.....	23
2.1.1 O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e sua problemática no RS.....	23
2.2 Fitorremediação	25
2.2.1 Fitoextração	28
2.2.2 Fitoestabilização	28
2.2.3 Fitovolatilização.....	28
2.2.4 Fitodegradação	28
2.2.5 Rizodegradação	28
2.2.6 Rizofiltração.....	29
2.3. Ação dos xenobióticos nas plantas.....	30
2.3.1. Processo de detoxificação das plantas	30
2.3.2 Fitotoxicidade	32
2.4 Metabolismo secundário.....	36
2.5 A influência da luz no metabolismo	40
2.6 Validação de métodos	42
2.6.1 Seletividade	43
2.6.2 Linearidade	43
2.6.3 Faixa de aplicação	44
2.6.4. Precisão	45
2.6.4.1. Repetitividade	46
2.6.5. Exatidão.....	47
2.6.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	49
2.6.7 Robustez	50
3. OBJETIVO	51
3.1. Objetivo geral	51
3.2. Objetivo Específico	51
4. MANUSCRITO 1	52
5. MANUSCRITO 2.....	80
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS	112
7. CONCLUSÃO.....	122
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	123
9. REFERÊNCIAS	125

10. APÊNDICES	139
Apêndice 1 – Metodologia da quantificação do potencial antioxidante, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e ERO.....	139

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas são agentes químicos ou biológicos que visam combater, destruir, prevenir, repelir ou mitigar pragas em diversos ambientes (ESCOTO et al. 2019). Nas últimas duas décadas, os pesticidas têm sido amplamente utilizados para garantir a alta produção agrícola (CAI et al. 2020). No entanto o uso inadequado de pesticidas pode levar toxicidade de águas superficiais ou subterrâneas além do solo, e consequentemente de organismos vivos (ESCOTO et al. 2019; DE CINQUE MARIANO e OKUMURA 2013).

O herbicida ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D) é um pesticida clorado utilizado na agricultura para impedir o crescimento de ervas daninhas de folhas largas pela (XU et al. 2020). O herbicida é um disruptor endócrino, podendo ser considerado um agente, teratogênico, carcinogênico e tóxico em altas concentrações podendo ainda levar a efeitos adversos no sistema imunológico e no sistema reprodutivo (LAM et al 2015; XU et al. 2020; LI et al. 2020)

O uso deste herbicida cresceu no Brasil de 12116 toneladas de princípio ativo para mais de 57389 de 2009 a 2017 (ASCOM/SEAPDR, 2019). O 2,4-D ganhou atenção da mídia no Sul (RS) do Brasil pela deriva do pesticida ocasionada pela sua má aplicação, causando prejuízo em dezenas de propriedades em vários municípios do estado do Rio Grande do Sul, principalmente em cultivos de uvas, oliveiras, maçãs, milho, azevém, campo nativo na piscicultura (COLUSSI, 2019a). Antes do aumento alarmante do uso do 2,4-D, o herbicida já tinha sido encontrado em rios no município de Santa Maria (RS, Brasil) nos anos de 2003, 2004, 2005 ($\leq 3,4 \mu\text{g.L}^{-1}$) (MARCHESAN et al. 2010). Embora as concentrações encontradas estivessem abaixo da concentração máxima permitida pela Organização Mundial da Saúde de $70 \mu\text{g.L}^{-1}$ em recursos hídricos (HAN et al. 2010), os danos ocasionados pela toxicidade do herbicida, somado ao aumento registrado do consumo e sua alta solubilidade em água (GLOZIER et al. 2012) tornam-se uma preocupação de saúde pública.

Para a remoção destes contaminantes de águas e solos a fitorremediação é uma técnica que possui pouco impacto ambiental, pois não altera a estrutura do solo, quando comparada as técnicas de engenharia de recuperação de solo (ROSTAMI e AZHBARPOOR, 2019). Uma vez que se baseia no fato de que as plantas possuem enzimas em seu metabolismo (enzimas hidrolíticas, transferases, oxidases e redutases) que são capazes de promover a desintoxicação dos vários contaminantes (HATZIOS 1991; MANDELBAUM et al., 1995; RAMBORGER et. al, 2017a).

O *Plectranthus neochilus* (boldo) é um conhecido agente fitorremediador do herbicida ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D) (RAMBORGER et al. 2017a; RAMBORGER et al.

2020a) e do Sulfentrazone (PEREIRA, 2018). Em ambos os casos o *P. neochilus* promoveu a remediação significativa das concentrações dos pesticidas. O boldo é resistente a mudanças climáticas, de temperatura, além de ser de fácil crescimento e reprodução não só no solo, mas também na água, fatores que contribuem para seu sucesso como organismo fitorremediador (RAMBORGER et al. 2017a; RAMBORGER et al. 2020a).

O *Plectranthus neochilus* é conhecida do sul do Brasil como “Boldo” ou “Boldo falso” devido ao fato de existir outra espécie de planta também chamada da mesma maneira, o *Peumus boldus* também chamado de “Boldo” ou “Boldo do Chile”. O *Plectranthus neochilus* é uma planta herbácea e aromática muito utilizada na medicina local para o tratamento de indigestão e doenças relacionadas ao sistema digestivo. Contudo, segundo existem relatos na medicina popular de sua utilização no tratamento de infecções de pele, doenças respiratórias, insuficiência hepática e dispepsia. Na literatura também se encontra registros do potencial antibacteriano, antiesquistossomótico e inseticida, mas todos de seu óleo essencial (CREVELIN et al. 2015).

Uma das formas mais comuns do uso de plantas na medicina tradicional é na forma de chá. O chá é uma bebida resultante do processo de infusão das mais diversas partes de espécies vegetais, folhas, raízes, flores e frutos. O chá também é uma das bebidas mais consumidas do mundo (RODRIGUES, 2015) e uma das mais antigas já registradas pela literatura. As propriedades medicinais do chá são devidas as propriedades funcionais dos compostos bioativos da planta. Estes compostos por sua vez, são resultantes do metabolismo secundário da mesma, possuindo potencial antioxidante significativo (NISHIYAMA et al. 2010), destacando-se principalmente os compostos fenólicos e os alcaloides, nas espécies do gênero *Plectranthus* (RAMBORGER et al. 2020b).

Esses metabólitos são responsáveis pelo sistema de defesa das plantas, permitindo a adaptação da mesma em seu meio, assim, despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem (PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Metabólitos secundários são produtos do metabolismo vegetal, não diretamente relacionados com os chamados processos primários para a planta, como fotossíntese, respiração e formação do protoplasma. E graças a isso, este conjunto de vias de biossíntese recebe o nome de metabolismo secundário, formando compostos derivados de ácidos graxos, compostos fenólicos, terpenos e nitrogenados (MEYER et al., 2013). Apesar disso, os compostos

originados dessas vias são vitais para as plantas, apresentando funções de defesa contra herbívoros e patógenos, alelopatia, proteção contra raios UV, poluição, atração de polinizadores e dispersores, regulação do metabolismo e sinalização molecular

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (ROCHA et al., 2011). Estes compostos incluem: fenóis simples e outros glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, derivados dos ácidos benzoico e cinâmico, a-pirones (cumarinas e isocumarinas), ligninas, flavonoides (flavononas, antocianinas e catequinas) e quinonas (STANGARLIN et al., 2011). No grande grupo dos compostos fenólicos, os flavonoides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam e, são considerados os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes naturais (BROIZINI et al., 2007). De acordo com Moraes e colaboradores (2009) esses compostos são capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis. Esses substratos, ou radicais livres originam-se de processos biológicos que naturalmente acontecem no organismo, como a respiração celular, envolvendo várias organelas: mitocôndria, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas (SOARES, 2002). Estes radicais possuem funções biológicas como a fagocitose, por outro lado, de acordo com Silva (2010), sua produção de forma exagerada pode causar diversos danos ao organismo, como hipertensão, cancro, diabetes e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. E para Hirata (2014) são responsáveis por efeitos relacionados ao envelhecimento.

Em contrapartida o consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas (MORAIS et al., 2009) nos últimos tempos tem sido associado, segundo Droge (2002), a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

A composição do metabolismo secundário nas plantas é influenciada diretamente pela qualidade da luz. Ahmad et. al (2014) obtiveram variações na composição fenólica e crescimento radicular utilizando fotoperíodo inverso em *Piper nigrum*. Nadeem et al. (2019) obtiveram alterações nas composições de eugenol, duas antocianinas e outros três compostos fenólicos quando estimulava culturas de *Ocimum basilicum* por diodos emissores de luz (LED) de diferentes cores. Essas alterações atribuem as plantas um acréscimo no potencial antioxidante. Fazal et al. (2016) estimulando culturas de *Prunella vulgaris* a diferentes luzes espectrais, obteve variações nos níveis de flavonoides, fenólicos totais e no potencial antioxidante desta planta, quando tratadas principalmente com luzes verdes, amarelas,

vermelhas e azuis. Essa elevação do potencial antioxidante contribui para o aumento da eficiência dos mecanismos de defesa da planta contra o estresse oxidativo.

O aumento das defesas contra o estresse oxidativo contribui para o aumento da tolerância frente a intoxicação a pesticidas, tendo em vista que alguns pesticidas contribuem para a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MITTON et al. 2018). O fotoestímulo estimula a produção de compostos do metabolismo secundário, responsável pela defesa contra o estresse. Além de apresentar outros benefícios, como influencia em características morfológicas e na taxa fotossintética, como encontrado por Kim et. al (2004), em plântulas de crisântemos estimuladas com lâmpadas fluorescentes e a combinação de diodos emissores de luz (LED) azuis e vermelhos. Estes parâmetros contribuem para a tolerância da planta a intoxicação por pesticidas, tornando este, um ponto importante para considerarmos uma planta boa fitorremediadora (MITTON et al. 2018). Isso vai ao encontro aos estudos recentes que demonstram que a luz além de estimular mecanismos de defesa contra ERO, aumenta a fitorremediação de metais, sem causar dano oxidativo visível (LUO e al. 2020).

Como foi dito anteriormente, o *P. neochulis* possui diversas características que contribuem para sua ação fitorremediadora eficiente. Algumas destas características possivelmente podem ser influenciadas através de estímulos luminosos, tendo em vista a influência de faixas espectrais específicas de luz (cores) na influência do metabolismo secundário, potencial antioxidante e ação fitorremediadora de diversas plantas (FAZAL et al. 2016; MITTON et al. 2018; NADEEM et al. 2019; AHMAD et. al 2014; LUO e al. 2020). Nesta perspectiva acreditamos que é possível estimular o aumento da fitorremediação do 2,4-D por *P. neochilus*, através do uso de estímulos luminosos com diodos emissores de luz (LED).

Este trabalho investiga o uso do boldo (*P. neochilus*) em dois vieses distintos, inicialmente, tivemos como objeto de pesquisa o chá do boldo. A presente dissertação buscou investigar a melhor forma de preparar a infusão, levando em consideração alterações de parâmetros simples durante o seu preparo, como a condição da folha durante no preparo do chá, com a folha fresca ou com a folha seca, e investigamos também a agitação da solução durante o preparo da infusão. Ambos os parâmetros são rotineiros e simples, durante o preparo de uma infusão de folhas. E outro viés com o objetivo de aumentar o potencial fitorremediador do boldo frente ao herbicida 2,4-D através de estímulos luminosos. E para ambos os estudos é necessário a quantificação precisa do que consta em cada objeto de estudo, os compostos fenólicos nas

infusões de boldo, e a quantificação do 2,4-D na avaliação da fitorremediação do herbicida pela planta.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pesticidas

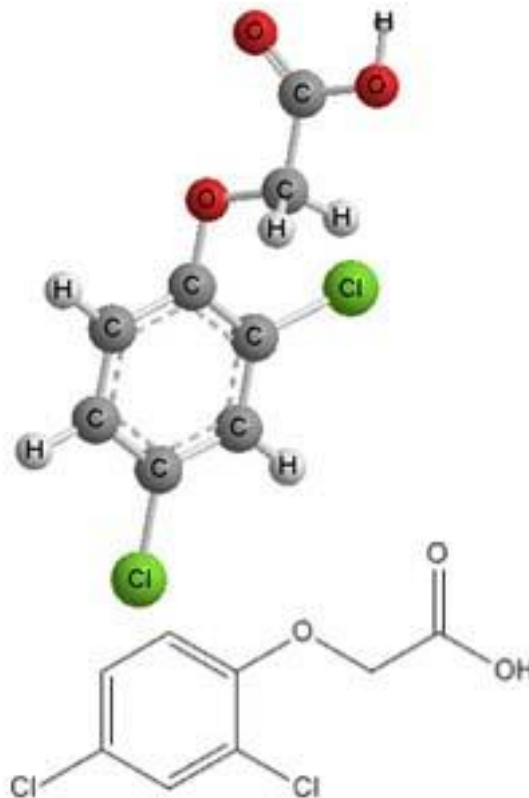
Pesticidas são compostos químicos diversificados muito utilizados tanto na agricultura, como em uso doméstico para o controle de pragas. Portanto, sua aplicação permite que os alimentos sejam produzidos em maior quantidade e qualidade, como também, permitem um melhor controle sobre muitas doenças humanas, que são transmitidas por vetores de insetos ou roedores (CAIRNS e SHERMA, 1992). Este grupo de compostos pode atuar no controle de diferentes pragas alvo, como insetos, larvas, ácaros, roedores, ou ervas daninhas (Almeida et al., 1985). Dessa maneira, sua aplicação é muito vasta e vantajosa. No entanto, apesar destas vantagens, esses compostos são altamente tóxicos e prejudiciais para o ambiente e para os seres vivos. Portanto, o uso excessivo de pesticidas pode gerar resíduos nos produtos finais (culturas, água e solo), causando potenciais riscos à saúde humana (MA et al., 2014).

Quando os pesticidas são aplicados no ambiente eles atingem vários locais, pois, podem ser transportados pela água das chuvas e ventos, o que pode levar a contaminação de lavouras e terras vizinhas, onde sua presença pode ser indesejável ou prejudicial (MORENO et al., 2006; HAJŠLOVÁ e ZROSTLIKOVA, 2003). Devido a essa capacidade de transporte/contaminação, muitos pesticidas são encontrados em corpos d'água superficiais e subterrâneos, pois os mesmos são escoados superficialmente ou subsuperficialmente (REICHENBERGER et al., 2007; SANGCHAN et al., 2012), lixiviados (TIKTAK et al., 2004; REICHENBERGER et al., 2007), levados pelo fluxo de água preferencial (KLADIVKO et al., 2001; BROWN e BEINUM, 2009; TANG et al., 2012), levados pela erosão eólica ou do solo (LARNEY et al., 1999; WU et al., 2004), como também, pela aplicação por spray, que gera a deriva destes compostos (STEPHENSON et al., 2006; FELSOT et al., 2011).

2.1.1 O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e sua problemática no RS

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (nome IUPAC *(2,4-dichlorophenoxy acetic acid)* (figura 1) é um dos herbicidas usado no controle de plantas daninhas de folhas largas em ambientes agrícolas e não agrícolas, e é registrado para uso em ambientes terrestres e aquáticos. Os principais locais incluem pastagens e gramados residenciais, estradas e terrenos agrícolas (GERVAIS. 2008), a tabela 1 apresenta as doses recomendadas e a indicação para quais plantas infectantes.

Figura 1 - Estrutura química do 2,4-D



Fonte: GERVAIS (2008).

Nos estudos relacionados à toxicidade deste herbicida, já se sabe que em organismos vivos este composto é um disruptor endócrino, é considerado um agente teratogênico, carcinogênico e tóxico em altas concentrações pois pode levar a efeitos adversos no sistema imunológico e no sistema reprodutivo (LAM et al 2015; XU et al. 2020; LI et al. 2020). No Brasil a utilização do 2,4-D teve um aumento significativo no período entre 2009 a 2017, onde passou de aproximadamente 12116 toneladas de princípio ativo para mais de 57389 (ASCOM/SEAPDR, 2019).

A agricultura no estado do Rio grande do Sul tem como principais produtos a soja e o arroz, estes cultivos dividem espaço e fronteiras com o cultivares de menor escala, como uva e oliveiras. O 2,4-D ganhou visibilidade na mídia pela deriva ocorrida deste pesticida ocasionada pela má aplicação do mesmo, causando prejuízo em dezenas de propriedades em vários municípios do estado do Rio Grande do Sul, principalmente em cultivos de uvas, oliveiras, maçãs, milho, azevém, campo nativo e na piscicultura (ASCOM/SEAPDR, 2019; COLUSSI e ROLLSING. 2019; COLUSSI. 2019; COLUSSI, ROLLSING e SOARES 2018a; COLUSSI, ROLLSING e SOARES 2018b).

Tabela 1 - Plantas infestantes controladas e doses. Tabela retirada da bula do Aminol 806.

Cultura	DOSE		PLANTAS INFESTANTES	
	g.i.a/ha	L.i.a/ha	Nome comum	Nome científico
Arroz	403 a 1.209	0,5 a 1,5	Carrapicho-decarneiro	<i>Acanthospermum hispidum</i>
			Mentrasto	<i>Ageratum conyzoides</i>
			Caruru-rasteiro	<i>Amaranthus deflexus</i>
Café	806 a 1.209	1,0 a 1,5	Caruru-roxo	<i>Amaranthus hybridus</i>
			Caruru-de-espinho	<i>Amaranthus spinosus</i>
			Caruru-de-mancha	<i>Amaranthus viridis</i>
Cana-de-açúcar	403 a 1.209	0,5 a 1,5	Picão-preto	<i>Bidens pilosa</i>
			Mostarda	<i>Brassica rapa</i>
			Trapoeraba	<i>Commelina benghalensis</i>
			Amendoim-bravo	<i>Euphorbia heterophylla</i>
			Picão-branco	<i>Galinsoga parviflora</i>
Milho	403 a 1.209	0,5 a 1,5	Corde-de-viola	<i>Ipomoea aristolochiaefolia</i>
			Corde-de-viola	<i>Ipomoea purpurea</i>
			Rubim	<i>Leonorus sibiricus</i>
Soja	806 a 1.209	1,0 a 1,5	Mastruz	<i>Lepidium virginicum</i>
			Beldroega	<i>Portulaca oleracea</i>
			Nabo-bravo	<i>Raphanus raphanistrum</i>
trigo	403 a 604,5	0,5 a 0,75	Poaia-branca	<i>Richardia brasiliensis</i>
			Guanxuma Serralha	<i>Sida rhombifolia</i> <i>Sonchus oleraceus</i>

Fonte: ADAMA. BRASIL. 2016. *g i.a./ha – gramas de ingrediente ativo por hectare. ** L p.c./ha – litros de produto comercial por hectare

A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu uma concentração máxima nos recursos hídricos de 70 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (HAN et al. 2010). Embora não exista registros da concentração de 2,4-D em recursos hídricos no RS, os danos ocasionados pela sua toxicidade juntamente ao aumento registrado da utilização e sua característica de alta solubilidade na água tornam-se uma preocupação de saúde pública. Nesta perspectiva técnicas que removam, transformem, desintoxiquem ou acumulem os poluentes presentes nestes recursos, tanto em recursos hídricos quando em solos são importantes.

2.2 Fitorremediação

A fitorremediação é definida como o uso eficiente de plantas para remover, desintoxicar ou imobilizar contaminantes ambientais, recuperando solos e água contaminados. O mecanismo envolve a absorção de poluentes pelas raízes, e acúmulo nos tecidos e no corpo, e levando a decomposição e a transformação de poluentes em formas menos prejudiciais. (ANSARI et al. 2020). Além do mais a fitorremediação é uma técnica ecológica vantajosa para a descontaminação de ambientes, por não necessitar de processos físico-químicos ou de

engenharia como incineração de solos ou escavação, além de possuir menor custo em relação a estas técnicas, tendo como vantagem sua possível execução *in situ* (PATRA. et al. 2020 YANG et al.2005).

Além disso, esta técnica possibilita diferentes mecanismos para a desintoxicação de água, solo e ar contaminados principalmente com metais e compostos orgânicos. Todos estes mecanismos ocorrem após a absorção do xenobiótico pela planta, estes mecanismos estão descritos na tabela 2, para cada técnica de fitorremediação (YANG. Et al. 2005).

Tabela 2 - Diferentes estratégias de fitorremediação.

Técnicas de fitorremediação	Mecanismo de ação	Meio tratado
Fitoextração	Acúmulo direto de contaminantes nas brotações das plantas, com a subsequente remoção das brotações das plantas	Solo
Rizofiltração (fitofiltração)	Absorver e adsorver poluentes nas raízes das plantas	Água de superfície e água bombeada pelas raízes
Fitostabilização	Os exsudatos radiculares fazem com que os metais precipitem e a biomassa se torne menos biodisponível	Águas subterrâneas, solo, rejeitos de minas
Fitovolatilização	As plantas evaporam certos íons metálicos e orgânicos voláteis	Solo, águas subterrâneas
Fitodegradação (biorremediação assistida por planta)	Degradação microbiana na região da rizosfera	Águas subterrâneas na rizosfera e no solo
Fitotransformação	Absorção das plantas por contaminantes orgânicos e degradação	Águas superficiais e subterrâneas
Remoção de contaminantes aéreos	Captação de vários orgânicos voláteis pelas folhas	Ar

Fonte: YANG et al. (2005)

A literatura nos mostra que embora tenhamos relatado que de forma geral a fitorremediação apresenta vantagens atraentes quando comparado a outros processos mais complexos de remediação de águas e solos contaminados, esta técnica conta principalmente com maior tempo de execução. Entretanto quando analisamos cada técnica especificamente (como descrita na tabela 2), todas apresentam cuidados específicos, somados a prós e contras ímpares. Estas informações estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Vantagens e desvantagens de cada mecanismo de fitorremediação .

Mecanismo de fitorremediação	Vantagens	Desvantagens
Fitoextração	<ol style="list-style-type: none"> 1. O custo é genuinamente barato, em contraste com as estratégias habituais. 2. A medida do material residual que deve ser descartado diminui até 95%. 3. Às vezes, o contaminante pode ser reutilizado. 4. Contaminante expulso de todos os tempos do solo. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Extensão do metal "assentada" dentro das raízes. 2. Taxa de absorção de metais pelas raízes.
Fitostabilização	<ol style="list-style-type: none"> 1. Não é necessária transferência de material / biomassa de risco 2. Extremamente bem-sucedido quando se espera uma imobilização rápida para salvar as águas subterrâneas e superficiais 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Permanência de contaminantes no solo 2. Utilização de amplas revisões de tratamento / solo 3. Verificação obrigatória necessária
Fitodegradação	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tanto financeira como naturalmente vizinhança 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Requer que mais de uma estação de desenvolvimento seja produtiva 2. O solo deve estar abaixo de 3 pés por dentro e por fora e as águas subterrâneas a 10 pés da superfície 3. Os contaminantes podem, em qualquer caso, ressurgir o modo natural de vida através de criaturas ou rastejantes assustadores material vegetal
Rizodegradação	<ol style="list-style-type: none"> 1. Trabalho <i>in situ</i>, sem influências inquietantes. 2. Não há evacuação de materiais manchados. 3. Pode ocorrer mineralização final do contaminante. 4. Baixo custo de estabelecimento e manutenção 	<ol style="list-style-type: none"> 1. É necessário o avanço da ampla zona radicular - tempo de espera 2. Profundidade da raiz restrita devido à estrutura física do solo 3. A questão natural da planta pode ser utilizada como fonte de C em vez de contaminante> diminuir a medida da biodegradação de contaminantes
Fitovolatilização	<ol style="list-style-type: none"> 1. O contaminante, partícula mercúrica, pode ser transformado em uma substância menos letal (ou seja, Hg essencial) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. O mercúrio descarregado no ar provavelmente será reutilizado pela precipitação e depois salvo novamente em lagos e mares, realizando a geração de metil-mercúrio por organismos microscópicos anaeróbicos.
Rizofiltração	<ol style="list-style-type: none"> 1. Capacidade de utilizar plantas terrestres e oceânicas para aplicações <i>in situ</i> também, <i>ex situ</i>. 2. Os contaminantes não são translocados em brotos. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Necessidade constante de alterar o pH 2. As plantas podem precisar ser desenvolvidas inicialmente no berçário 3. Ocasionalmente são coletadas e transferidas as plantas 4. A configuração do tanque deve ser muito construída

2.2.1 Fitoextração

A fitoextração ou fitoacumulação utiliza plantas hiper-acumuladoras capazes de extrair os contaminantes da água ou solos e acumulá-los nos seus tecidos. Estas plantas hiper-acumuladoras são capazes de acumular vários elementos inorgânicos em níveis até cem vezes maiores que outras espécies, crescendo sob as mesmas condições (ROSA. 2013). As plantas utilizadas para a fitoextração devem possuir características de crescimento rápido, alta biomassa, fácil de cultivar, fácil de colher, altamente tolerante ao estresse de metais e não é comestível para evitar a entrada na cadeia alimentar (PATRA et al. 2020; PATRA et al 2019).

2.2.2 Fitoestabilização

A fitoestabilização é o processo cujo contaminantes dos solos e águas são imobilizados pelo uso de plantas, por adsorção, acúmulo nas raízes ou precipitação na zona radicular, desta forma impedindo seu movimento (JEEVANANTHAM, et al 2020; TANGAHU et al. 2011). Com a imobilização dos xenobióticos (principalmente metais) proporcionada por esta técnica, além de diminuir a lixiviação de metais tóxicos para águas subterrâneas e zona agrícola, diminui a concentração de metais na cadeia alimentar (PATRA et al. 2020).

2.2.3 Fitovolatilização

Este mecanismo consiste na remoção dos contaminantes através das folhas das plantas para a atmosfera através da transpiração da planta (TANGAHU et al. 2011). Os contaminantes tornam-se modificados na forma solúvel em água e não tóxica durante o transporte da raiz para as folhas ao longo das moléculas de água e compartimentação nos vacúolos e, em seguida, os contaminantes são volatilizados (JEEVANANTHAM, et al 2020).

2.2.4 Fitodegradação

A fitodegradação consiste no processo de degradação dos contaminantes pela planta através de processos metabólitos dentro da própria planta. Este processo ocorre através de enzimas como oxigenases e nitro-redutases que são produzidas pelas plantas que catalisam a degradação dos xenobióticos, este processo é ideal para poluentes orgânicos que são móveis nas plantas, como os herbicidas (JEEVANANTHAM, et al. 2020; ROSA. 2013).

2.2.5 Rizodegradação

É o processo de degradação ou quebra de metais pesados e contaminantes orgânicos presentes no solo, ocorre na área do solo ao redor das raízes das plantas (rizosfera). O mecanismo que envolve a associação de microrganismos com as plantas (RAMBORGGER, 2017b). As raízes mudam as condições do solo aumentando a aeração, ajustando a umidade e açúcares, álcoois e ácidos orgânicos atuam como fonte de carbono dos micróbios do solo. Em

outras palavras, as raízes da planta aumentam a atividade microbiana, perdendo o solo e transportando água para a rizosfera. Esta técnica é também chamada de biodegradação aprimorada da rizosfera, fitoestimulação, biorremediação assistida por plantas (GIARDINI, 2010; JEEVANANTHAM, et al 2020)

A tabela 4 apresenta algumas das enzimas que realizam esse processo.

Tabela 4. Enzimas vegetais e microbianas com um papel na degradação de compostos orgânicos.	Ação Catalítica	Exemplos de Fontes Conhecidas
Família de Enzimas		
Laccase	Degradação de vários compostos aromáticos.	<i>Populus</i> spp.
Dioxigenase	Degradação de vários compostos aromáticos.	<i>Medicago sativa</i>
Nitrilase	Cliva grupos cianeto de nitrilas aromáticas e alifáticas.	<i>Armoracia rusticana.</i> <i>Medicago sativa</i>
Nitroredutase	Reduz grupos nitro de compostos nitroaromáticos, remove o nitrogênio de estruturas cíclicas.	<i>Salix</i> spp. <i>Populus</i> spp.
Fosfatase	Cliva grupos fosfato de organofosforados.	<i>Spirodela polyrhiza</i>
Citocromo P 450 monooxigenase	Hidroxilação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.	Maioria das bactérias aeróbicas, todos os fungos e plantas.

Fonte: Dados reorganizados de NAHLER, et al (2009)

2.2.6 Rizofiltração

A rizofiltração envolve adsorção e precipitação dos contaminantes metálicos no substrato de crescimento ao redor das zonas radiculares. Nesse processo, a contaminação das águas subterrâneas, águas superficiais, ocorre através das raízes da planta (DUSHENKOV et al., 1995; ANSARI et al. 2020). Desta forma, o mecanismo da rizofiltração se baseia no fato que os contaminantes presentes na água poluída ou solo, são absorvidos pelas raízes ou adsorvidos nas raízes das plantas. Esse mecanismo é semelhante ao da fitoextração, entretanto

é realizado principalmente na área do solo nas raízes da planta (JEEVANANTHAM, et al 2020).

2.3. Ação dos xenobióticos nas plantas

2.3.1. Processo de detoxificação das plantas

As plantas desempenham um papel fundamental na remoção de compostos tóxicos do ambiente, quando tratamos de compostos orgânicos, o processo de remoção envolvendo várias etapas das quais muitos detalhes ainda precisam ser conhecidos e elucidados. Estes compostos, sendo por ação direta ou indireta da planta podem ser estabilizados ou degradados na rizosfera da planta, absorvido e acumulado nas raízes ou ainda transportado pela planta, até serem volatilizado ou degradado por seu metabolismo (COLLINS, FLYER e GROSSO 2006).

Muitos compostos orgânicos por serem xenobióticos não possuem transportadores específicos nas plantas, e se movem por difusão entre os tecidos devido ao gradiente de potencial criado pela transpiração, somado a isso a translocação destes compostos varia de acordo com suas características físico-químicas, como solubilidade em água, $\log K_{ow}$, pK_a além das próprias características da planta. Contudo a absorção tem o controle primário sobre a translocação de xenobióticos, o metabolismo influencia tanto a captação de xenobióticos quanto sua ação fitotóxica, tornando o composto menos ou mais ativo (KVESITADZE et al., 2006; DORDIO e CARVALHO, 2011).

A partir do momento que os xenobióticos orgânicos são absorvidos pelas raízes das plantas e são translocados para diferentes órgãos, eles penetram nas células vegetais e são expostos a transformações metabólicas da planta. Desta forma, podendo ser degradado parcialmente ou completamente, onde pode ser transformado em compostos menos tóxicos e ligados aos tecidos vegetais (KVESITADZE et al., 2006; DORDIO e CARVALHO, 2011). De forma geral, isso é visto como um processo de desintoxicação, muito semelhante ao dos mamíferos. Uma vez que um xenobiótico orgânico é absorvido e translocado, ele passa por uma ou várias fases de transformação metabólica. Três possíveis fases de transformação metabólica de compostos orgânicos em plantas superiores podem ser identificadas fase I, fase II e fase III (SANDERMANN, 1994), o mecanismo de passagem dos xenobióticos podem ser observados na figura 2.

2.4.1.1. Fase I

A fase I é conhecida por fase de transformação ou conjugação, onde compostos lipofílicos adquirem um grupamento hidrofílico (hidroxila, amina, carboxila, sulfidril), catalisado por enzimas da fase I. Nesta fase o metabolismo oxidativo dos xenobióticos é

realizado principalmente por monooxigenase do citocromo P450, esta fase é de vital importância nos processos oxidativos para bioativar os compostos em compostos quimicamente reativos. Desta forma a solubilidade em água do composto aumentam, o que também causa uma afinidade aumentada para enzimas que catalisam a transformação posterior na fase II (DORDIO e CARVALHO, 2011).

As reações de fase I são a primeira etapa necessária para tornar uma molécula em um xenobiótico menos tóxico; essas reações modificam a molécula para estar pronta para as reações da Fase II, no entanto, se já tiver um grupo funcional adequado para o metabolismo da Fase II, o composto pode ser usado diretamente para a Fase II (DORDIO e CARVALHO, 2011).

2.4.1.2. Fase II

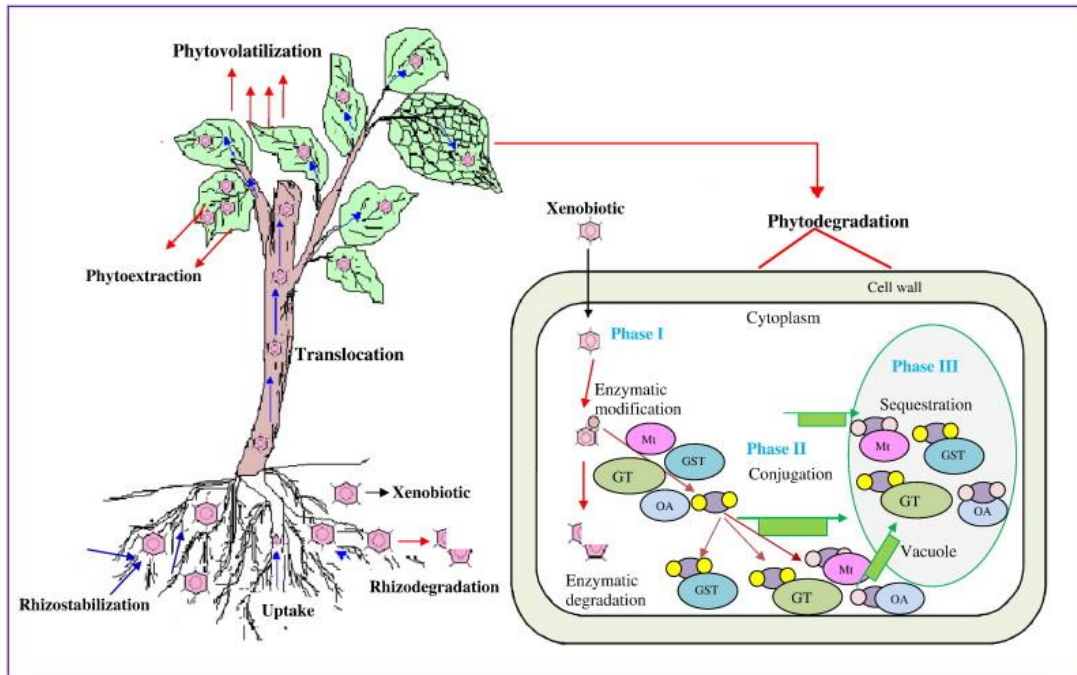
A fase II, chamada de fase de conjugação, se caracteriza pela conjugação do xenobiótico a moléculas endógenas como proteínas, peptídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares pectinas e ligninas (COLEMAN et al., 1997; KORTE et al., 2000; DIETZ e SCHNOOR, 2001). A conjugação com essas moléculas aumenta o peso molecular e reduz significativamente a atividade biológica destes compostos tendo como produto final metabólitos menos tóxicos do que os oriundos da fase I (DORDIO e CARVALHO, 2011). As enzimas responsáveis pela catalização dessas conjugações são enzimas como glutationa-S-transferases, glucosil transferase e N-malonil transferases estão associadas à Fase II (EAPEN et al., 2007).

2.4.1.3. Fase III

As reações de fase III são exclusivas das plantas porque não excretam xenobióticos como os animais. Portanto, as plantas precisam remover, de alguma forma, o xenobiótico de seu próprio sistema. Transportadores vacuolares conduzidos por ATP são as principais enzimas envolvidas na fase III, processamento posterior dos conjugados pode ocorrer na matriz vacuolar (EAPEN et al., 2007; DORDIO e CARVALHO, 2011).

A fase III do metabolismo de xenobióticos envolve compostos modificados ficando compartimentalizados em vacúolos ou se ligando a componentes da parede celular, como lignina ou hemicelulose. A compartimentação vacuolar é uma etapa importante na desintoxicação de conjugados xenobióticos em plantas, pois os compostos conjugados (acoplados com pectina, lignina, xilana e outro polissacarídeo os conferindo maior solubilidade) são removidos de locais vulneráveis no citosol e transportados para vacúolos ou apoplasto por transportadores ligados à membrana do tonoplasto, onde não interferem no metabolismo celular (COLEMAN et al., 1997).

Figura 2. Mecanismo de atenuação típico das plantas contra xenobióticos. Os xenobióticos podem ser estabilizados ou degradados na rizosfera, adsorvidos ou acumulados nas raízes e transportados para a parte aérea, volatilizados ou degradados no interior do tecido vegetal. A desintoxicação de plantas geralmente envolve conversão ou modificação enzimática (fase I) seguida de conjugação (fase II) seguida de sequestro ativo (fase III).



Fonte: Imagem retirada de Abhilash, Jamil e Singh (2009)

2.3.2 Fitotoxicidade

Todas as plantas de forma geral possuem mecanismos de defesa que as protegem de agentes tóxicos presentes em baixas quantidades. Como foi dito anteriormente, a taxa de absorção destes compostos pela planta vai controlar, translocação e metabolização desses compostos vão regular a indução de das respostas da planta, seja fisiológica ou bioquímica.

2.3.2.1. Respostas fisiológicas

Respostas fisiológicas como clorose, necrose e regulação do crescimento são facilmente avaliados. Parâmetros fisiológicos quantitativos como crescimento relativo ou níveis de pigmentos fotossintéticos também podem ser utilizados para avaliar as respostas toxicológicas da planta (DORDIO e CARVALHO, 2011). O aparelho fotossintético é um dos principais alvos de estresse nas plantas. A maioria das respostas metabólicas induzidas por condições de estresse têm consequências na aptidão da planta para manter a fotossíntese eficientemente (RMIKI et al., 1999). Desta forma, alterações nos níveis de clorofilas e carotenoides estão correlacionadas com os níveis de estresse na planta. Para as plantas em geral, os níveis de carotenoides tendem a aumentar para fornecer proteção contra a formação de radicais livres de oxigênio. Ao mesmo

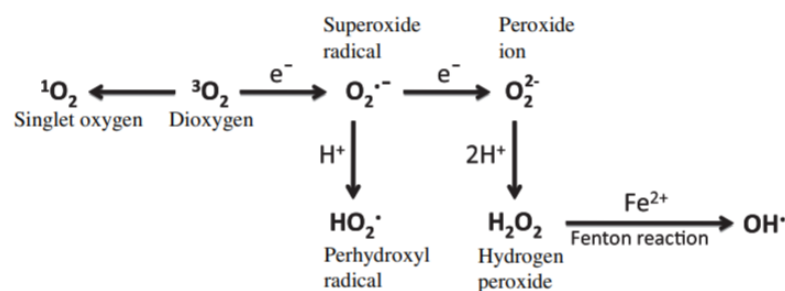
tempo que existe a tendência a uma diminuição nos níveis de clorofila total. Essa tendência pela intoxicação de diversas classes de xenobióticos foi observada anteriormente.

2.3.2.2 Respostas bioquímicas

2.3.2.2.1. Formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A evolução dos processos metabólicos aeróbicos, como respiração e fotossíntese, inevitavelmente levou à produção de ERO na mitocôndria, cloroplasto e peroxissomo. Em condições normais de crescimento os ERO são produzidos naturalmente em baixas quantidades nas organelas e pela cadeia de transportadora de elétrons fotossintética super reduzida (YOU e CHAN, 2015). As alterações bioquímicas induzidas pela presença de xenobióticos orgânicos levam à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em excesso. Essas espécies químicas são formas parcialmente reduzidas de oxigênio atmosférico (O_2). Eles normalmente resultam da excitação do tripleto O_2 para formar oxigênio singleto (1O_2) ou da transferência de um, dois ou três elétrons para O_2 para formar, respectivamente, radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou 3O_2 (que se dismuta em água e radicais hidroxila, OH) como é visto com detalhes na figura 3 (APEL e HIRT, 2004; DORDIO e CARVALHO, 2011 e NOCTOR et al., 2014). Além das organelas, a membrana plasmática juntamente com o apoplasto é o principal local de geração de ERO em resposta a sinais endógenos e estímulos ambientais exógenos (YOU e CHAN, 2015).

Figura 3 - Geração de Espécies reativas de oxigênio.

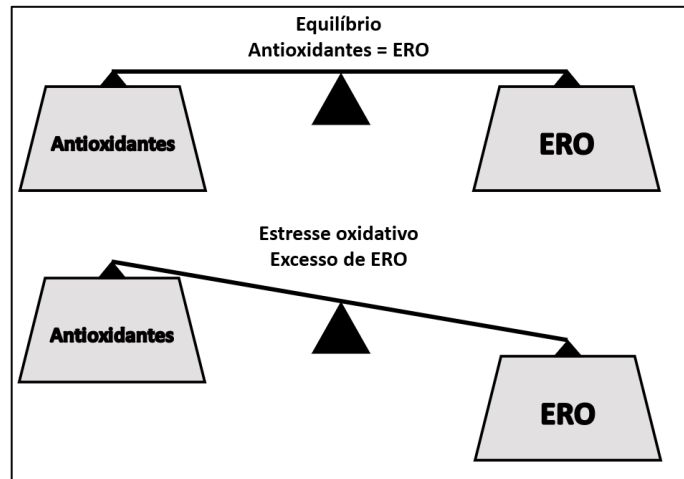


Fonte: Imagem criada por Gill e Tuteja (2010).

Em condições normais as ERO são eliminadas facilmente por diferentes componentes de defesa antioxidante confinados geralmente em locais específicos (APEL e HIRT, 2004). Entretanto, sua superprodução pode ser desencadeada por fatores abióticos de estresse, como a exposição a xenobióticos como pesticidas. Quando expostas a estes compostos, as plantas ativam vias para metabolizar esses compostos que desencadeiam grandes quantidades de ERO e podem perturbar a homeostase entre a produção e eliminação de ERO, resultando em estresse oxidativo. Como consequência desses distúrbios, os níveis intracelulares de ERO podem

aumentar rapidamente, e desta forma prejudicando a viabilidade celular (figura 4) (DORDIO e CARVALHO, 2011).

Figura 4 - . Equilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (ERO).



Feito pelo autor.

As ERO são capazes de oxidar irrestritamente uma grande quantidade de componentes celulares, e se não controlados, levam ao dano de biomoléculas como peroxidação de lipídios de membrana, oxidação de proteínas, inibição de enzimas e danos de DNA e RNA (MITTLER, et al. 2002).

Devido a isto, os níveis de ERO devem ser precisamente controlados (mantidos em uma pequena faixa de variação), e para isso as células vegetais possuem mecanismos para monitorar e eliminar quantidades excessivas de ERO. Desta forma a tolerância das plantas aos agentes tóxicos estão relacionadas à sua capacidade de lidar com ERO durante a produção (DORDIO e CARVALHO, 2011).

Esta regulação fina dos níveis de ERO são ainda mais importantes tendo em vista que estas moléculas também possuem a função de sinalizadoras para a ativação da resposta ao estresse e vias de defesa. Sendo assim, ERO podem ser vistos como indicadores celulares de estresse e como mensageiros secundários na via de transdução de sinal de resposta ao estresse, bem como a medição da atividade de enzimas antioxidantes desintoxicação de ERO (MITTLER, 2002; APEL e HIRT, 2004).

2.3.3 Mecanismos de desintoxicação de ERO

Dois diferentes mecanismos estão envolvidos na modulação dos níveis de ERO, um que realiza a modulação fina dos níveis de ERO para fins de sinalização, e outro que realiza a desintoxicação de ERO em excesso, especialmente durante o estresse oxidativo. Estes mecanismos existem em todas as plantas e são divididos em não enzimáticos produzidos pelo metabolismo secundário (flavanonas, antocianinas, carotenoides e ácido ascórbico (AsA)), e

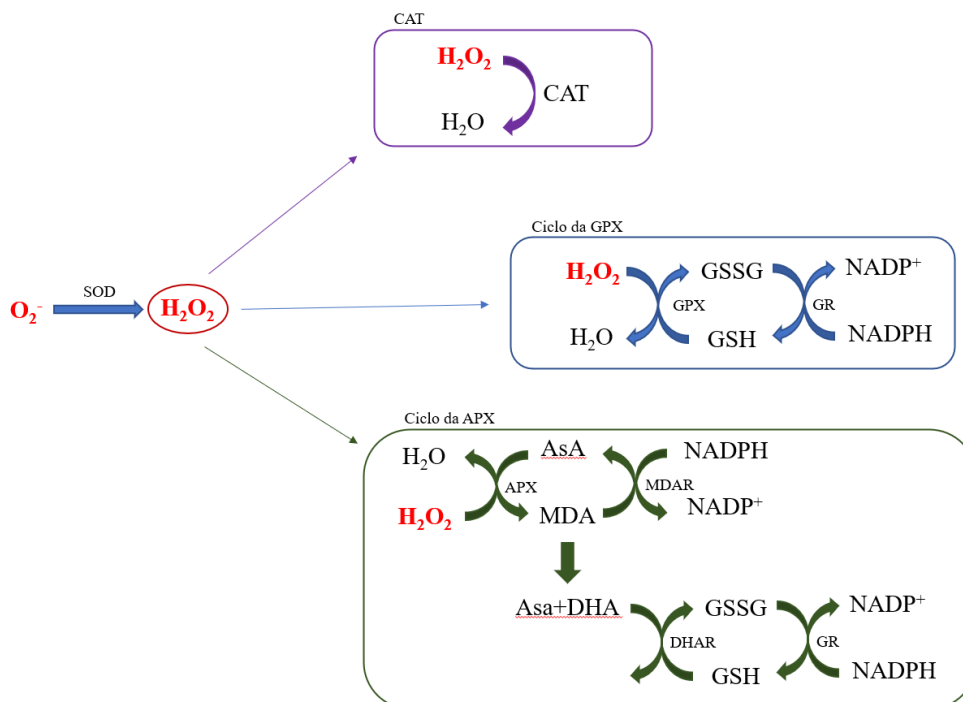
enzimáticos. As principais enzimas responsáveis pela desintoxicação de ERO incluem superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutaciona peroxidase (GPX) e catalase (CAT), suas vias são apresentadas na figura 5 (MITTLER, 2002; APEL E HIRT, 2004; DORDIO e CARVALHO, 2011).

As plantas possuem vários genes que codificam SOD e APX, com diferentes isoformas direcionadas ao cloroplasto, mitocôndria, peroxissomos, apoplasto e citosol. A GPX está localizada no citosol, o CAT está localizado majoritariamente nos peroxissomos. Desta forma a extensão do estresse oxidativo na célula é determinada pelas concentrações de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Logo, o equilíbrio das atividades SOD, APX e CAT serão cruciais para suprimir os níveis de ERO tóxicos na célula (GARG e MANCHADA, 2009).

2.3.3.1 Mecanismos de desintoxicação enzimáticos

As enzimas envolvidas neste processo estão localizadas em diferentes compartimentos celulares, tendo sua expressão controlada por estímulos ambientais e endógenos, dependendo da necessidade da remoção de ERO, como demonstra os mecanismos da figura 5.

Figura 5 - Vias de desintoxicação das espécies reativas de oxigênio pela Catalase (CAT), pelo ciclo da Glutaciona Peroxidase (GPX) e pelo ciclo da Ascorbato peroxidase (APX). Monodehidroascorbato (MDA), ácido ascórbico (AsA), desidroascorbato (DHA), desidroascorbato redutase (DHAR), Glutaciona Redutase (GR). Superóxido dismutase (SOD), MDA redutase (MDAR), glutaciona oxidada (GSSG), glutaciona (GSH).



Fonte: feita pelo autor.

A SOD é a primeira linha de defesa contra as ERO, dismutando superóxido (O_2^-) em H_2O_2 , para que em seguida enzimas como APX, GPX e CAT desintoxiquem o H_2O_2 . A catalase (presente no peroxissomo) catalisa diretamente a decomposição do peróxido de hidrogênio em O_2 e H_2O , a APX por outro lado requer um sistema de regeneração de ascorbato e glutathiona (GSH), como pode ser visualizado na figura 5 (GARG e MANCHADA, 2009; DORDIO e CARVALHO, 2011)

A desintoxicação de H_2O_2 em H_2O por APX ocorre por oxidação de ascorbato em monodehidroascorbato (MDA), se regenerado por MDA redutase (MDAR) usando NADPH. O MDA se dismuta espontaneamente em ascorbato e desidroascorbato (DHA). Sua regeneração é mediada pela desidroascorbato redutase (DHAR) conduzida pela oxidação de GSH a glutathiona oxidada (GSSG). E por fim glutathiona redutase (GR) regenera GSH a partir de GSSG usando NADPH. Como o APX, o GPX também desintoxica H_2O_2 em H_2O , mas usa GSH diretamente como agente redutor. O ciclo de GPX é fechado pela regeneração de GSH a partir de GSSG por GR usando NADPH (MITTLER, 2002; GARG e MANCHADA, 2009; DORDIO e CARVALHO, 2011).

2.3.3.2 Mecanismos não enzimáticos

Os compostos fenólicos são importantes nos processos de desintoxicação e resposta ao estresse oxidativo, são metabólitos secundários presentes em todas as plantas, e podem ter um papel importante tanto em mecanismos não enzimáticos como enzimáticos (guaiacol peroxidase). Além do mais, os compostos fenólicos possuem ação antioxidante que os permite neutralizar diretamente radicais livres, os tornando uma importante ferramenta contra a propagação do estresse oxidativo (DORDIO e CARVALHO, 2011).

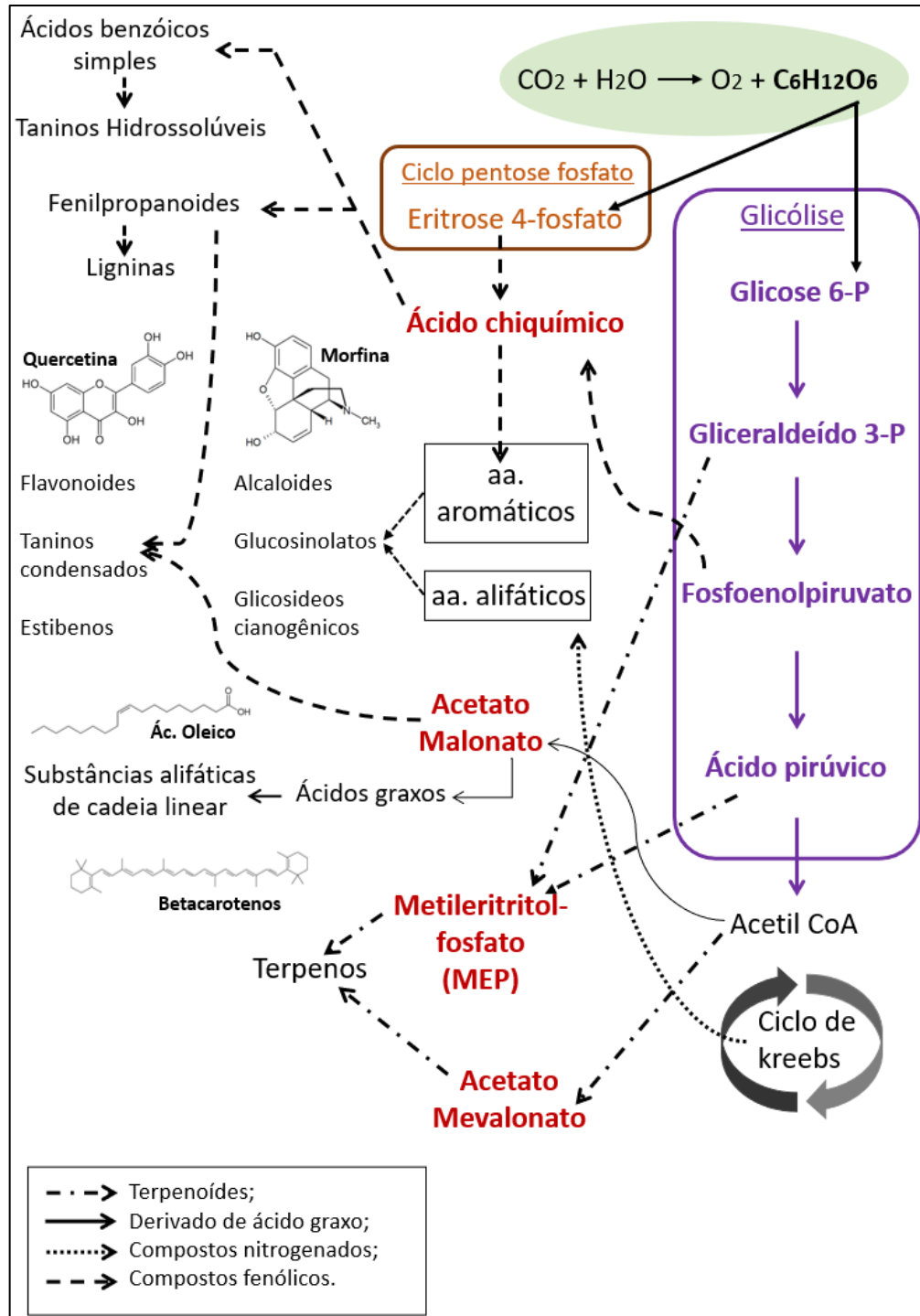
2.4 Metabolismo secundário

Metabólitos secundários são produtos do metabolismo vegetal, não diretamente relacionados com os chamados processos primários para a planta, como fotossíntese, respiração e formação do protoplasma. E graças a isso, este conjunto de vias de biossíntese recebeu o nome de metabolismo secundário.

Os metabólitos secundários são extremamente diversos (com mais de 50 mil compostos), suas rotas metabólicas não são gerais, pois as reações bioquímicas não ocorrem independentemente em mesmo produtor, o que origina metabólitos extremamente diversos. Muitos metabólitos secundários são formados por sequências de reações análogas àquelas do metabolismo primário, a origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via intermediários principais: o ácido chiquímico, acetato malonato,

acetato mevalonato e metileritritolfosfato, como pode ser visualizado na figura 6. Através delas serão formados os quatro grupos principais: derivados de ácidos graxos, compostos fenólicos, terpenos e nitrogenados (MEYER et al., 2013).

Figura 6 - Ciclo biosintético dos metabólitos secundários.



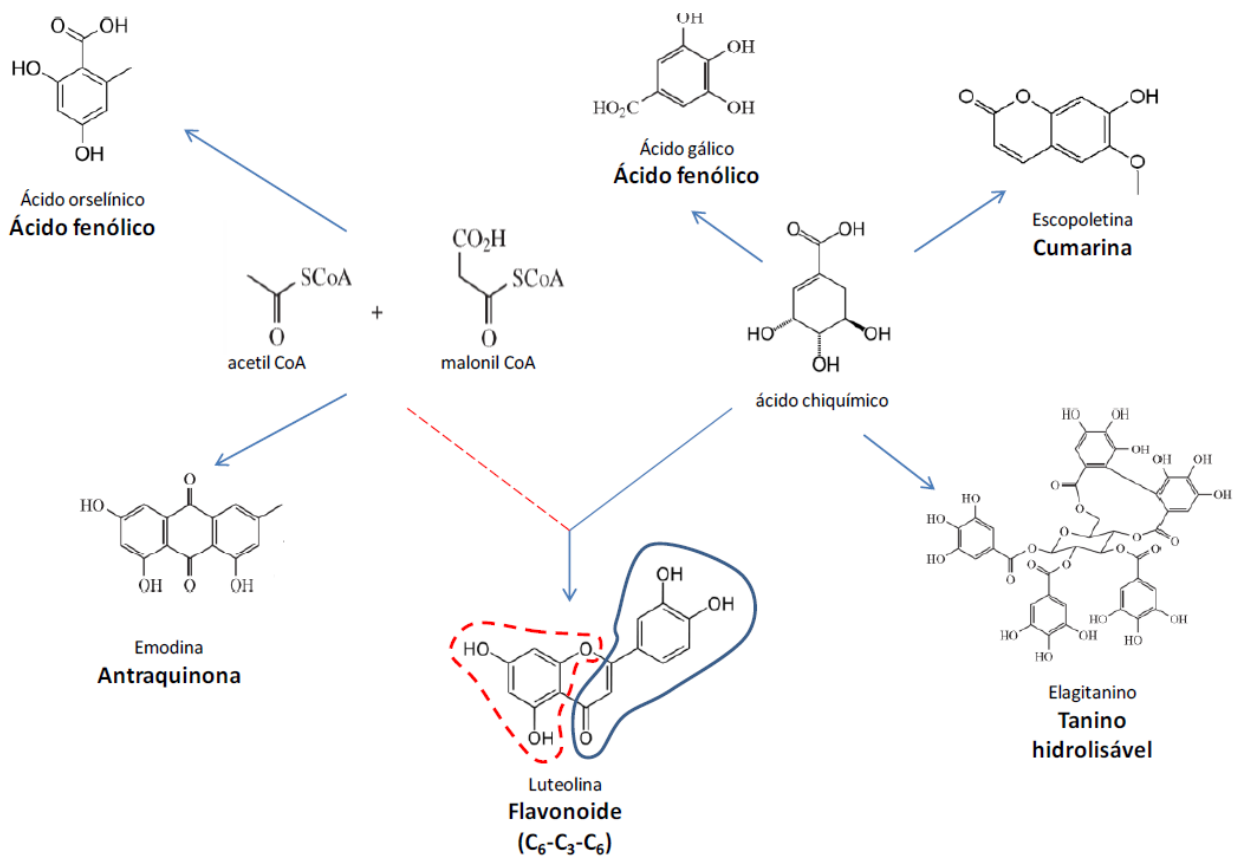
Feita pelo autor. As setas indicam as formações das principais classes de metabólitos secundários. As estruturas representam exemplos de metabólitos sintetizados via metabolismo vegetal secundário. Em negrito estão as principais vias que geram estes compostos

Apesar disso, os compostos originados dessas vias são vitais para as plantas, apresentando funções de defesa contra herbívoros e patógenos, alelopatia, proteção contra raios UV, poluição, atração de polinizadores e dispersores, regulação do metabolismo e sinalização molecular. Os compostos do metabolismo secundário são também responsáveis por mediar as interações da planta com o ambiente, responsável pela cor e aroma. Os compostos do metabolismo secundário devido aos sua constituição, de forma conjunta ou isolada (princípio ativo) atribui a atividade medicinal e/ou tóxica a estas plantas (DOS SANTOS, 2007; MEYER et al., 2013).

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza, mais de 8.000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas. Estes compostos apresentam em sua estrutura, vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas. Os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo ($-C=O$) de algumas moléculas de flavonoides garantem a esses compostos sua alta atividade antioxidante (SILVA et al. 2010). A importância dos compostos fenólicos está diretamente relacionada com a atividade fisiológica, a habilidade de capturar estas espécies reativas de oxigênio, quelar íons metálicos, inibir a nitrosação, inibir o potencial de auto-oxidação e a apresentam a capacidade de modular certas enzimas celulares ativas (PORT'S. 2011)

Os compostos fenólicos podem ser sintetizados pela via do ácido chiquímico, pela via do acetato malonato ou ainda pelas duas, como os flavonoides que tem biossíntese mista: a via do ácido chiquímico fornece um anel C6 - C3 enquanto a via do acetato malonato oferece o outro anel C6. Estes compostos podem ser encontrados na forma livre (agliconas), ligados a açúcares (glicosídeos), proteínas, terpenos, entre outros. Dentre as substâncias fenólicas temos: ácidos fenólicos, quinonas, fenilpropanoides, cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas (MEYER, et al., 2013). Exemplos de compostos fenólicos e seus precursores estão expostos na figura 7.

Figura 7 - Exemplos de substâncias fenólicas e seus precursores, linhas vermelhas indicam grupamento referente a via do acetato malonato.



Fonte: (MEYER et al. 2013)

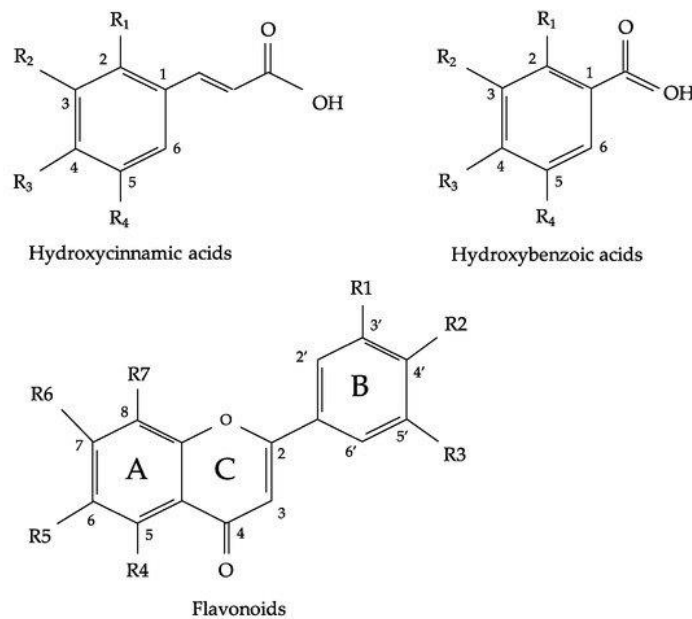
Flavonoides e ácidos fenólicos são moléculas caracterizadas por terem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados. Flavonoides e ácidos fenólicos são compostos com uma ampla gama de estruturas e podem ser classificados com base no número e arranjo de seus átomos de carbono em: flavonoides (flavonóis, flavonas, flavan-3-ols, antocianidinas, flavanonas, isoflavonas e outros) e não flavonóides (ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos, estilbenos e outros) (Gutiérrez-Grijalva. 2018)

Os flavonoides constituem a maior classe de fenólicos e compreendem um grupo de compostos amplamente distribuídos em frutas e vegetais, se apresentando em diversas variações. Todos os flavonoides são derivados dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina e são compostos C_{15} dispostos em três anéis ($C_6-C_3-C_6$) como mostra a figura 8 (Gutiérrez-Grijalva. 2018). Estes grupos possuem uma grande diversidade de efeitos biológicos como atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral e inibição da danificação do colágeno (PEREIRA e DAS GRAÇAS CARDOSO, 2012).

Os ácidos hidroxicinâmicos são parte dos fenólicos não flavonoides e o principal subgrupo dos ácidos fenólicos, formados por um anel benzênico, um grupo carboxila e um ou

mais grupo hidroxila, tendo como base os ácidos cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico (Gutiérrez-Grijalva. 2018). A partir disso, a literatura apresenta uma grande diversidade de efeito para os ácidos fenólicos, como antioxidante, antimicrobiana, antiúlcera e anticancerígena (citotóxica e proliferativo) (PRESTOS et al. 2006; DE BARROS et al. 2008; TERPIC et al. 2010; CHAOUKI, et al. 2010; BABILI, et al. 2011).

Figura 8 - Estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzoicos e flavonóides. (GUTIÉRREZ-GRIJALVA. 2018)



Fonte: GUTIÉRREZ-GRIJALVA. 2018

2.5 A influência da luz no metabolismo

Fontes de luz, como lâmpadas fluorescentes e incandescentes são frequentemente usadas para cultivo de plantas. Essas fontes são utilizadas para aumentar os níveis de fluxo de fótons fotossintéticos, entretanto contêm comprimentos de onda localizados fora do espectro do utilizado na fotossíntese, e desta forma de baixa qualidade para promover benefícios para as plantas (KIM et al. 2004). Uma fonte de luz mais eficiente para a construção de sistemas de iluminação são os diodos emissores de luz (LED), que possuem diversas vantagens em comparação as fontes de luz usadas para o tratamento com as plantas, como pequena massa e volume, durabilidade, longa vida útil operacional, especificidade de comprimento de onda e bandas estreitas de comprimento de onda, superfícies emissoras relativamente frias, geração de pouco calor e saída de fótons que é linear com a corrente elétrica de entrada. Essas fontes de luz portanto, são ideais para uso em projetos de iluminação de plantas e permitem que os comprimentos de onda sejam combinados com os fotorreceptores da planta (LIN et al. 2013)

Alterações na qualidade luminosa proporcionam diferentes respostas morfogênicas e fotossintéticas que podem variar entre diferentes espécies de plantas. Estas respostas são de grande importância em técnicas recentes de cultivo de plantas uma vez que a viabilidade de ajustar os espectros de iluminação permite controlar o crescimento, desenvolvimento e a qualidade nutricional da planta (LIN et al. 2013).

O desenvolvimento da planta é fortemente influenciado pela qualidade da luz, que se refere à cor ou ao comprimento de onda que é irradiado. Li et al. (2010) demonstrou que o uso de luz de LED azul e vermelho são eficientes no aumento do peso fresco e seco de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), LED vermelho é eficaz para o crescimento da raiz e LED azul é importante para a síntese da clorofila e o desenvolvimento dos estômatos das plântulas. Li et al. (2018) demonstrou que a adição de luz amarela aos tratamentos com espectros combinados de LEDs vermelho e azul promoveu o crescimento de plântulas de batata in vitro, e o LED vermelho foi o mais vantajoso para o crescimento de plântulas de batata in vitro. Kim et al. (2004) encontraram alongamento no caule de brotos de crisântemo com estímulo através de LED vermelho e vermelho distante. Em contra partida Hahn et al. (2000) relataram um efeito reverso da luz vermelha no crescimento do caule em plântulas de *Rehmannia glutinosa*. Tennesen et al. (1994) sugeriram também que a luz vermelha monocromática causa desequilíbrio na distribuição da energia luminosa disponível para os fotossistemas (I e II), desta forma inibindo o crescimento dos ramos. A inibição do alongamento do broto foi observada sob luz vermelha em plantas com flores herbáceas, como calêndula e salvia (HEO et al., 2002). Johkan et al. (2012) em diferentes tratamentos com luz de LED verde, utilizando variações no comprimento de onda (na margem do verde) e de intensidade, notaram crescimento dos brotos ou das raízes dependendo das condições do tratamento com brotos de alface (*Lactuca sativa*).

Em relação a influência dos estímulos luminosos no metabolismo secundário de plantas superiores, Ahmad et. al (2014) observaram variações na composição fenólica e crescimento radicular de *Piper nigrum* utilizando fotoperíodo inverso. Kim et. al (2003) encontraram variações morfológicas e na taxa fotossintética na exposição de plântulas de crisântemos a lâmpadas fluorescentes e a combinação de diodos emissores de luz (LED) azuis e vermelhos. Já Fazal et al. (2016), encontraram resultados positivos quando houve estímulo em culturas de *Prunella vulgaris* em diferentes luzes espectrais, obtendo variações na quantidade de acúmulo de biomassa, flavonoides, fenólicos totais e no potencial antioxidante destas plantas quando tratadas principalmente com luzes verdes, amarelas, vermelhas e azuis. Nadeem et al. (2019) obtiveram alterações nas composições de eugenol, duas antocianinas e outros ácidos fenólicos

quando estimulava culturas de *Ocimum basilicum* por diodos emissores de luz (LED) de diferentes cores.

Além disso, a luz é um fator essencial para saúde das plantas, por influenciar não só no metabolismo secundário. As alterações podem ocorrer a nível enzimático, acarretando na variação da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (G-POD) e as enzimas ascorbato peroxidase (APX), desidroascorbato redutase (DHAR), monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e glutathiona redutase (GR) (SHOHAEL et al. 2006) que são os mecanismos de defesa contra radicais livres mais eficiente das plantas (MITTLER. 2002; DONG et al. 2014; LUO et al, 2020)

2.6 Validação de métodos

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ou “*High performace liquid chromatography*” (HPLC) é uma técnica que se destaca pela sua capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativa em uma grande gama de compostos farmacêuticos, ambientais, biológicas e em alimentos. Contudo para garantir a realização de análises químicas com confiabilidade é necessário confirmar sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Desta forma, para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI, et al. 2004). Desta forma o objetivo final do processo de validação é fornecer evidências de que o método fornece resultados confiáveis, para todas as medições futuras de análise de rotina estejam próximas o suficiente do valor verdadeiro desconhecido para o conteúdo do analito na amostra (RAPOSO e IBELLI-BIANCO, 2020).

O processo de validação pode ser dividido em dois tipos distintos, a validação dentro do laboratório (*in house validation*), onde ocorrem as etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido no local ou para verificar que um método anteriormente descrito na literatura. Este processo é utilizado nas etapas iniciais da validação e para a publicação de artigos científicos, avaliando todas as etapas do desempenho da metodologia exceto a reprodutibilidade, sendo por tanto a etapa antecessora da validação completa (*full validation*) (RIBANI, et al. 2004) cujo se adiciona a avaliação do desempenho interlaboratorial dentro de uma matriz, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia (RIBANI, et al. 2004; HORWITZ, 2002).

Consta na literatura uma grande quantidade de artigos de validação de método *in house* para uma vasta variedade de compostos e matrizes distintas, dentre os parâmetros utilizados para a validação estão: curva analítica, linearidade, seletividade, recuperação, precisão, limite

de detecção, limite de quantificação e robustez (INMETRO, 2016; ANVISA 2017 e RIBANI et al. 2004).

2.6.1 Seletividade

Seletividade é o parâmetro que avalia a capacidade do método de quantificar o analito alvo na presença de outros analitos, matrizes ou outros materiais potencialmente interferentes. Em outras palavras a seletividade avalia o grau de interferência de outros ingredientes presentes na amostra, como impurezas, produtos de degradação, excipientes bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes (HORWITZ, 2002; RIBANI, et al. 2004).

A seletividade é o primeiro passo para um processo de validação e pode ser obtida de diferentes formas. A primeira maneira de avaliar a seletividade é através da comparação da matriz isenta dos compostos de interesse com a matriz fortificada com eles. Deve ser notado se algum interferente está sendo eluído no mesmo tempo de retenção que os compostos de interesse. Detectores mais modernos como o Detector de Arranjo de Diodos (DAD), permite a comparação do espectro UV do padrão com o espectro do padrão na amostra fortificada, desta forma podendo confirmar a pureza do composto (RIBANI, et al. 2004).

2.6.2 Linearidade

Para análises quantitativas confiáveis, é necessário que se saiba a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada (dentro de uma faixa linear definida). Expressamos essa certeza dessa confiabilidade através da linearidade, que a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2017: INMETRO, 2016).

A linearidade é obtida através de padronização interna ou externa e determinada com a relação entre o sinal obtido e a concentração ou massa no composto de interesse. Essa relação matemática é construída através da curva analítica (com no mínimo 5 pontos) com o uso da equação 1, e posteriormente usada para a obtenção da concentração do analito em uma amostra real (INMETRO, 2016).

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

- y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);
- x = concentração.
- a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade.
- b = interseção com o eixo y , quando $x=0$.

Matematicamente, a obtenção dos coeficientes da curva apresentados acima, podem ser obtidos a partir do conjunto de medições das diferentes concentrações utilizando regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (RIBANI et al. 2004).

Além dos coeficientes que podem ser calculados acima, também é possível obtermos o coeficiente de correlação (r), este parâmetro demonstra o quanto a curva analítica enquanto modelo matemático é adequado, pois o quanto mais próximo de 1 menor é a dispersão dos pontos da curva e a incerteza dos coeficientes estimados (ANVISA, 2017; INMETRO, 2016 e RIBANI et al. 2004). Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado ideal, entretanto no Brasil a ANVISA (2017) e o INMETRO (2016) recomendam coeficientes de correlação maiores que 0,99 e 0,9 respectivamente.

A partir do coeficiente de correlação podemos obter o coeficiente de determinação (r^2) que não é nada a mais que o quadrado do coeficiente de correlação. Enquanto o coeficiente mede o grau de relação entre as duas variáveis (x , y) o r^2 demonstra a variação de y , explicada pela curva de regressão linear.

2.6.3 Faixa de aplicação

A faixa de aplicação é o intervalo entre o menor e o maior valor da substância de interesse que atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade. A faixa de aplicação é expressa na mesma unidade do que seus resultados obtidos pelo aparelho, tolerando diferentes variações de acordo com o uso em questão. A ANVISA (2017) define um intervalo compreendido entre 80-120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120% do limite máximo especificado para determinação de impurezas, conforme mostra a tabela 5 (RIBANI et al. 2004 e ANVISA. 2017).

A concentração do analito a ser quantificado deve estar dentro deste limite, como descrito acima, com 5 níveis de concentrações diferentes com o mínimo de 3 injeções feitas em ordem crescente, com mínimo de variação definidos, com RSD% inferior a 5% (ANVISA. 2017). Estas definições variam de acordo com agências reguladoras, a IUPAC por exemplo, recomenda 6 ou mais níveis de concentrações e a HORWITZ (2002) recomenda de 6 a 8 pontos espaçados igualmente. O Documento de Orientação sobre Controle de Qualidade Analítico e Procedimentos de Validação para Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos e Rações (SANTE/11813. 2017), recomenda ainda que desvio das concentrações calculadas de volta dos

padrões de calibração em relação às concentrações reais, usando a curva de calibração na região relevante, não deve ser superior a $\pm 20\%$.

Tabela 5. Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos (retirada de ANVISA. 2017).

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

Em seguida a quantificação dos compostos de interesse e validação podem ser realizadas por padronização interna ou externa, superposição de matriz e adição de padrão (RIBANI et al 2004). Levando em consideração que a resposta do detector dos analitos no extrato da amostra deve estar dentro da faixa de respostas das soluções padrão de calibração injetadas. Entretanto, os padrões de calibração ainda devem ser injetados pelo menos no início e no final de uma sequência de amostra. Se o desvio entre duas injeções do mesmo padrão de calibração exceder 30% (considerando a resposta mais alta como 100%), as amostras contendo resíduos de pesticidas devem ser reanalisadas (SANTE/11813. 2017).

2.6.4. Precisão

A precisão representa a dispersão entre diferentes ensaios de uma mesma amostra, semelhantes ou até mesmo padrões (em solventes) em condições definidas no método de ensaio. Em outras palavras, avalia as proximidades entre várias medidas efetuadas para uma mesma amostra (ROSA et al. 2013). É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição, as formas mais comuns de representar a precisão é através da repetitividade e

reprodutibilidade e precisão intermediária, sendo comumente expressas em desvio padrão ou desvio padrão relativo. (RIBANI et al. 2004 e ANVISA. 2017).

Ambas repetitividade e reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida. E desta forma desvio padrão relativo é mais indicado, pois é normalizado com base na concentração, e deste modo permanecendo constante na faixa de aplicação (dês que a faixa não seja tão grande) (INMETRO 2016). O desvio padrão relativo é calculado através da fórmula

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (2)$$

Métodos utilizados para quantificar analitos em macro quantidade não podem ultrapassar o limite de 1% ou 2%. Em métodos de análise de traços, entretanto, esse valor pode variar até 20% (RIBANI et al. 2004), como também preconiza SANTE (2017) para validações intralaboratoriais ($\leq 20\%$) na repetitividade e reprodutibilidade.

2.6.4.1. Repetitividade

A repetibilidade se refere ao grau de concordância dos resultados quando as condições são mantidas o mais constante, com o mesmo analista, reagentes, equipamentos e instrumentos executados em um curto período (HORWITZ, 2002). A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra em diferentes preparações e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD%) (RIBANI, 2004). Para a repetitividade, o INMETRO (2016) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A ANVISA sugere que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento.

2.6.4.2. Reprodutibilidade

A precisão através da reprodutibilidade refere-se ao grau de concordância dos resultados quando as condições operacionais são as mais diferentes possíveis (mudança de operador, local, equipamentos). Referindo-se geralmente ao desvio padrão ou ao desvio padrão relativo (%RSD) dos resultados nas mesmas amostras de teste por laboratórios distintos, chamada geralmente de “precisão entre laboratórios” (HORWITZ. 2002). A documentação que apoia os estudos de precisão em nível de reprodutibilidade deve incluir estimativa do desvio padrão absoluto, estimativa do desvio padrão relativo e intervalo de confiança (RIBANI et al. 2004).

2.6.4.3. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a diferentes eventos como diferentes analistas, equipamentos e tempo. A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método (INMETRO. 2016). O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, sendo reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório. A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RIBANI et al. 2004).

2.6.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, representa o nível de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Este valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (ANVISA. 2017 e RIBANI et al. 2004).

A exatidão está associada a precisão e é sempre considerada dentro de limites específicos a um determinado nível de confiança, sendo maior em concentrações em nível traço. O número de ensaios varia de acordo com as diretrizes de cada agência, e com o interesse da pesquisa, a IHC (1995) assim como a ANVISA (2017) recomendam 3 diferentes níveis de concentração em triplicata (totalizando 9 determinações). A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a equação 3.

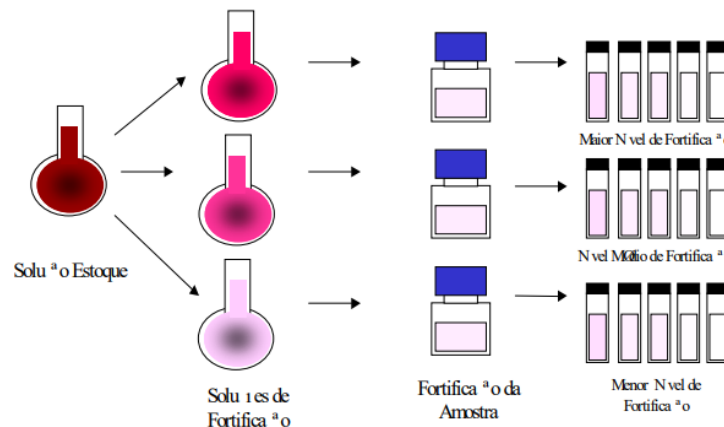
$$exatidão = \frac{valor\ real - valor\ obtido}{valor\ real} \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

A forma mais comum de determinar a exatidão para a validação de processos analíticos é pela recuperação, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. É o método mais utilizado para a avaliação da exatidão na validação de métodos cromatográficos (ROSA, 2013; RIBANI et al. 2004 e LANÇAS, 2004).

Para isso, amostras “branco” são fortificadas em diferentes concentrações e em seguida a concentração do analito adicionado é quantificada. É importante levar em consideração que a eficiência do método varia em função das concentrações da substância, geralmente a dispersão

dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Devido a este motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse, o que é realizado através da fortificação em pelo menos três diferentes concentrações (ROSA. 2013). A figura 9 ilustra o processo de fortificação para a validação de metodologias analíticas.

Figura 9 - Procedimento de fortificação da amostra



Fonte: BRITO (2001).

A recuperação é calculada pela equação:

$$R (\%) = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração real}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

O intervalo aceitável de recuperação para a análise de resíduos geralmente são entre 70 e 120%, com precisão de até 20%. Entretanto esses valores podem variar de acordo com a amostra e os níveis de complexidade analítica (ROSA. 2013), como mostra a tabela 6.

Tabela 6 - Recuperação do analito em função da concentração.

Concentração do analito (%)	Intervalo de Recuperação Aceito (%)
≥ 10,0	98 – 102
≥ 1,0	97 – 103
≥ 0,1	35 – 105
≥ 0,01	90 – 107
≥ 0,001 - ≥ 0,00001	80 – 110
≥ 0,000001	60 – 115
≥ 0,0000001	40 – 120

Fonte: BRITO, 2001

Ou taxas de recuperação fora da faixa de 70-120% ainda podem ser aceitas se forem consistentes ($RSD \leq 20\%$) e a base para isso estiver bem estabelecida (ex.: devido à distribuição do analito em uma etapa de partição), entretanto a recuperação média não deve ser inferior a 30% ou superior a 140%. Mas para isso uma correção para recuperação é necessária ou um método mais preciso deve ser usado se possível (SANTE. 2017).

2.6.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) conhecido por LOD (*Limit of Detection*) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada para um determinado procedimento. O LOD pode ser obtido de 3 diferentes formas, o método visual, método de relação sinal-ruído e o mais comumente usados, o método (cálculo) baseado nos parâmetros da curva analítica. O método de estimativa do LOD baseado nos parâmetros da curva analítica apresenta maior confiabilidade estatística, levando em conta que leva em consideração o intervalo de confiança da regressão (BRITO et al. 2003; RIBEIRO et al. 2008). O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos (equação 5), o valor é expresso na mesma unidade de concentração, geralmente as mesmas da curva analítica.

$$LOD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{equação 5})$$

Onde “s” é o valor do desvio padrão da amostra, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação, e “S” o coeficiente angular da curva analítica.

Geralmente a determinação da razão sinal/ruído é feita pela comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado. A razão sinal/ruído com valor 3:1 é considerada aceitável para estimar o LD (BRITO et al. 2003; RIBEIRO et al. 2008; HARRIS. 2012).

O Limite de quantificação (LQ) conhecido por LOQ (*Limit of Quantification*) representa a menor concentração de uma substância que pode ser medida com confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental (ROSA, 2013 e RIBANI et al. 2004). É um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas (ANVISA. 2003).

Os mesmos critérios do LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva analítica (S) (RIBANI et al. 2004; HARRIS. 2012) seguindo a seguinte equação (6):

$$LOQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{equação 6})$$

Entretanto, SANTE (2017) recomenda que o LOQ seja o nível de pico mais baixo da validação atendendo a esses critérios de aceitabilidade de desempenho do método.

2.6.7 Robustez

A robustez de um método é a sua capacidade de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos sem alterar significativamente sua exatidão e precisão, é uma medida da quantidade de variabilidade que o método pode suportar sem perder confiabilidade (RIBEIRO et al 2008). A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel. A robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de metanol ou acetonitrila na fase móvel em $\pm 2\%$; o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (RIBANI et al. 2004), e a ANVISA (2017) recomenda ainda diferentes lotes ou fabricantes de colunas e fluxo da fase móvel. Caso com essas alterações o método ainda estiver dentro dos limites de precisão, exatidão e com seletividade aceitável, estas variações podem ser incorporadas ao procedimento e o método é considerado robusto.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Desenvolver e aprimorar a melhor forma de extrair os compostos fenólicos em infusões de *P. neochilus* e aumentar a eficiência da fitorremediação de 2,4-D por *P. neochilus* através de estímulos luminosos (fotoestímulo).

3.2. Objetivo Específico

- Avaliar a melhor forma de infusão dos compostos fenólicos das folhas de *P. neochilus*.
- Desenvolver e validar método cromatográfico por HPLC-DAD para a quantificação de compostos fenólicos em infusões de *P. neochilus*.
- Avaliar a cor de luz que mais estimula a fitorremediação de 2,4-D por *Plectranthus neochilus*.
- Desenvolver e validar método cromatográfico para a quantificação do herbicida 2,4-D.

4. MANUSCRITO 1

Os dados sobre a validação do método cromatográfico por HPLC-DAD para a quantificação de compostos fenólicos em infusões de *P. neochilus*, e a otimização no preparo das infusões estão apresentados no formato de manuscrito organizado e formatado nas orientações para autores na revista *Food Chemistry* (<https://www.elsevier.com/journals/food-chemistry/0308-8146/guide-for-authors>), Qualis A2 (F. I. 6,306) na área de CBII (ano 2013-2016).

23 literature. The medicinal potential of teas is due to the functional properties of bioactive
24 compounds present in plants. These compounds are the result of the secondary metabolism of
25 vegetables and are responsible for their defense system and their adaptation to the environment.
26 In this sense, they arouse great interest in its use due to the pharmacological activities arising
27 from its bioactive compounds. One of these activities that are highlighted in research is the
28 antioxidant potential that is linked to the phenolic compounds obtained in infusions (Nishiyama
29 et al., 2010; Pereira & Cardoso, 2012).

30 Phenolic compounds are defined as substances having an aromatic ring with one or more
31 hydroxyl substituents, including functional groups (Rocha et al., 2011). They include simple
32 and other glycosylated phenols, phenol-carboxylic acids, benzoic and cinnamic acid
33 derivatives, coumarins and isocoumarins, lignins, flavonoids (flavones, anthocyanins, and
34 catechins), and quinones (Stangarlin et al., 2011). In the large group of phenolic compounds,
35 flavonoids and phenolic acids are the most prominent and are considered the most common
36 antioxidants from natural sources (Broinizi et al., 2007). These compounds are capable of
37 retarding or inhibiting the oxidation of oxidizable substrates, or reactive species, known as free
38 radicals (Morais et al., 2009).

39 These free radicals, or reactive species, originate from biological processes that
40 naturally occur in organisms (animals and plants), such as cellular respiration, and involve
41 several organelles (Soares, 2002). These compounds have biological functions such as
42 phagocytosis and are responsible for cell aging (Hirata et al., 2004). On the other hand, its
43 production of exaggerated form can cause diverse damages to the organism. This imbalance in
44 its production can lead to several biological dysfunctions such as hypertension, cancer, diabetes,
45 and neurodegenerative diseases (Silva, 2014). One way to decrease the production of reactive
46 species in organisms is through the consumption of natural antioxidants and this can be made
47 through the consumption of infusions (teas) (Morais et al., 2009) because this consumption has

48 been associated with a lower incidence of oxidative stress-related diseases (Droge, 2002).
49 Therefore, finding the best conditions for preparing and extracting antioxidant compounds from
50 an infusion becomes of utmost importance for health.

51 In this perspective, this work should aim to evaluate which form of extraction best
52 extracts phenolic and antioxidant compounds from the leaves of *P. neochilus*. For this, we seek
53 to develop and validate an analytical method for the detection and quantification of phenolic
54 compounds (3-4-dihydroxybenzoic acid, rutin, caffeic acid, coumaric acid, chlorogenic acid,
55 ferulic acid, synergic acid, quercetin, and gallic acid) by SPE - HPLC with the relation to
56 antioxidant potential, to investigate the best conditions.

57 **2 Material and Methods**

58 *2.1 Plant Material*

59 *P. neochilus* was grown in the greenhouse of the Federal University of Pampa, Uruguaiana,
60 RS, Brazil (-29.830897, -57100322), identified and registered by the number 108/2016. The
61 plant name was confirmed on “The Plant List” on the website
62 (<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-158340>). For the analyzes, it was used the
63 leaves that were collected in the period of May and June of 2017.

64 *2.2 Standards, reagents and equipments*

65 The standards of gallic acid (CAS Number: 149-91-7), quercetin (CAS Number: 117-
66 39-5), rutin (CAS Number: 207671-50-9), 3-4-dihydroxybenzoic acid (CAS Number: 99-50-
67 3), caffeic acid (CAS Number: 331-39-5), syringic acid (CAS Number: 530-57-4), chlorogenic
68 acid (CAS Number: 327-37-9), coumaric acid (CAS Number: 501-98-4), ferulic acid (CAS
69 Number: 537-98-4), ascorbic acid (CAS Number: 50-81-7) and the reagents Folin-Ciocalteu
70 and 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl - DPPH (CAS Number: 1898-66-4) were obtained from

71 Sigma-Aldrich. The solvents methanol and acetonitrile (HPLC grade) were obtained by J.T.
72 Baker and sulfuric acid from Fomaia. The reagents of ammonium molybdate and sodium
73 carbonate were obtained by Proquímios and sodium phosphate from Vetec.

74 The kiln (New Ethics 404-2DE) was obtained from Ethik Technology (São Paulo). The
75 heating plate with a magnetic stirrer (New Ethics 114) and the molecular device SpectraMax
76 M5's 96-well microplate reader from Ethik Technology (São Paulo). The HPLC-DAD was
77 obtained from Kyoto-Japan and it was composed with Inertsil ODS-3 5 μm (4.6×250 mm)
78 column to GL Science (from Japan), the Young Lin (YL) 9100 diode array (HPLC-DAD) with
79 Auto Sampler (YL9150) and equipped with quaternary pumps (YL9110) connected to a
80 degasser (YL9101).

81 *2.3 Analytical method*

82 The conditions of the chromatographic method were: mobile phase composed with
83 ultrapure water (pH 3)/acetonitrile (5:95 v/v) with the gradual increase of acetonitrile until
84 100% in 35 minutes. After 38 minutes, the initial conditions were restored and maintained in
85 an isocratic mode until the 50 minutes of chromatographic run. The flow rate was $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
86 and the volume of the injected sample was $20 \mu\text{L}$.

87 Phenolic compounds were identified by comparing the retention time and spectral data
88 of their respective standards. The quantification of these compounds in the sample analysis was
89 performed according to the calibration curve obtained with the reference standards. The
90 wavelength used for the detection of gallic acid, 3-4-dihydroxybenzoic, rutin, and syringic acid
91 was 220 nm. For caffeic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, and ferulic acid, the wavelength
92 was 320 nm, and for quercetin, it was 368 nm. The calibration curve for each compound was:
93 3-4-dihydroxybenzoic acid, rutin, caffeic acid, coumaric acid, chlorogenic acid, ferulic acid,

94 syringic acid, quercetin, gallic acid. The validation parameters (selectivity, linearity, accuracy,
95 LOD, and LOQ) were analyzed according to Ribani et al. (2004).

96 2.3.1 Method validation

97 2.3.1.1 Selectivity and linearity

98 The analytical curve was prepared with stock solutions of the phenolic compounds
99 standards that were prepared by accurately weighing 10.0 mg of each one and dissolving it in
100 10.0 mL of methanol to obtain a 1,000 mg.L⁻¹ of stock solution. The work solution was obtained
101 by diluting 1 mL of each standard stock solution in 10 mL of methanol (a mixture of the 9
102 phenolic compounds in 100 mg.L⁻¹). Then, appropriate dilutions were performed to build the
103 analytical curve with 6 points (0.5; 1.0; 2.5; 5.0; 7.5 and 10 mg.L⁻¹). The linearity was assessed
104 by the correlation coefficient (R²) and selectivity was evaluated by comparing the standard
105 DAD spectra with the 2.5 mg.L⁻¹ spiked sample.

106 2.3.1.2 Precision

107 Precision was tested with repeatability and reproducibility. The repeatability was
108 determined by measuring the response of all the phenolic compounds three times in the same
109 day. The reproducibility was performed by repeating the extraction with phenolic compounds
110 three times with 0.5 mg.L⁻¹ and 2.5 mg.L⁻¹ concentrations. The results were reported in terms of
111 *relative standard deviation (RSD)*.

112 2.3.1.3 Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

113 The LOD and LOQ were performed using equations (1) and (2) with the lowest curve
114 concentration of all phenolic compounds.

115 Equation 1) $LOD=3.3 \times /S$

116 Equation 2) $LOQ=10 \times /S$

117 σ = standard device and S = angular coefficient of the respective calibration curves.

118 *2.3.1.4 Accuracy*

119 Accuracy was measured by recovery (%) spiking different levels (80, 100 and 120%.)
120 of phenolic compounds mixture. The sample (matrix) used was the infusion process of dry and
121 macerated leaves without stirring (DMLWA - section 2.5). However, the infusion was prepared
122 with 10× more leaves than described in item 2.5. The extraction of the phenolic compounds
123 was carried out according to steps of SPE extraction described in section 2.4 in triplicate.

124 *2.4 Extraction of phenolic compounds by SPE*

125 It was made using 10 mL of the infusions (sample) with Strata-X cartridges (500 mg/6 mL,
126 from Phenomenex) previously conditioned with 3 mL of methanol, 3 mL of water, and 3 mL
127 of acidified water (pH 3, 1:1 H₃PO₄). After percolating the sample, the cartridges were washed
128 with 3 mL of acidified water (pH 3, 1:1 H₃PO₄) and then, the elution step, was performed with
129 3 mL of acetonitrile and 3 mL of methanol that was evaporated to dryness and resuspended in
130 1.5 mL of methanol. This concentrated solution was filtered in a nylon syringe filter (0.22 μm,
131 13 mm diameter) and analyzed by HPLC-DAD.

132 *2.5 Groups of infusions*

133 All groups were prepared with 0.1 g of leaf in a beker with distilled water (100 mL at 80°C)
134 for 10 minutes. The time of infusion and the mass-volume ratio were chosen according to the
135 positive results obtained by Nishiyama et al. (2010). The concentration was chosen considering
136 the number of leaves and the suitability for possible dilution tests. All samples were filtered and
137 stored at -20°C until analysis. The samples (infusions) were divided into the following groups:

138 - FL+A: 0.1 g Fresh leaves (freshly harvested) submitted to agitation during its preparation.

139 - FL-A: 0.1 g Fresh leaves (freshly harvested) without agitation during its preparation.

140 - DML+A: 0.1 g Dry and macerated leaves submitted to agitation during its preparation.

141 - DML-A: 0.1 g Dry and macerated leaves without agitation during its preparation.

142 The dried leaves (DMLSA and DMLWA) were heated in a kiln at 50°C until dryness and
143 then they were macerated. To measure the amount of soluble solids, each infusion (25 mL) was
144 placed in a mortar and heated to 40°C until dry. Their weight was measured daily until it
145 remained constant.

146 *2.6 Quantification of total phenols*

147 This quantification was performed by the Folin-Ciocalteu method of Karou et al. (2005)
148 according to the changes made by Faller and Fialho (2009). The present study used a different
149 volume of sample and reagents (15 μL of the infusion was added to the microplate, with 37.5
150 μL of Folin solution - 1 mol.L^{-1}). After five minutes of reaction, 37.5 μL of sodium carbonate
151 solution (20%) was added and the volume was filled with distilled water to 300 μL . The solution
152 was incubated for 30 minutes in a private light environment and then read at 750 nm. A blank
153 control (water) was used to discount the absorbance of the infusion and the positive control
154 (sodium carbonate, Folin-Ciocalteu, and water) to discount the blank solution. The calibration
155 curve was constructed with 5 points between 1 and 38 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ of gallic acid. The results were
156 expressed in micrograms of gallic acid equivalent per mg of infusion ($\mu\text{gGAE.mg}^{-1}$).

157 *2.7 Antioxidant potential*

158 The total antioxidant capacity (TAC) was based in Prieto et al. (1999) through the
159 formation of the phosphomolybdenum complex. This method used 30 μL of the infusion with
160 270 μL reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium
161 molybdate, 1:1:1) in 96-well microplates. The samples were incubated at 95 °C for 90 minutes

162 and the data was read in 695 nm of absorbance. The blank control (water with infusion) was
163 used to discount the absorbance of the infusion and the positive control (reagent solution with
164 water) was used to discount the blank solution. The calibration curve was performed with 5
165 points between 2 and 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ of ascorbic acid. The results were expressed in micrograms of
166 ascorbic acid equivalent per milligram of infusion ($\mu\text{gAAE}\cdot\text{mg}^{-1}$). This analysis was performed
167 in quintuplicate.

168 The quantification of the antioxidant potential by the inhibition of DPPH capture was
169 according to Rufino et al. (2007), with modifications in the volume of the reagents and samples
170 to adapt in a microplate. It used 15 μL of the infusion with 185 μL of distilled water and 50 μL
171 of 0.3 mM DPPH solution was used in 96-well microplates. The sample was then incubated for
172 30 minutes deprived of light and subsequently read at 518 nm of absorbance. The results were
173 expressed in micrograms of ascorbic acid equivalents per milligram of infusion and percent
174 inhibition (%) obtained through the equation (3):

175 Equation 3) $IP\% = 100 \{ (Abs.sample - Abs.Blank) \cdot 100 \} / (Abs.Negative Control)$.

176 Abs is absorbance.

177 The blank control is the absorbance of the infusion (water with the infusion) and the
178 positive control is the absorbance of the blank solution (DPPH solution with water).

179 2.8 Statistical analysis

180 The linear regression of the analytical curve was used for the validation of
181 chromatographic method and the quantification of phenolic compounds. For antioxidant
182 potential, soluble solids and the quantification of total phenolic compounds data were analyzed
183 by the One Way ANOVA test followed by Tukey's test.

184 **3 Results and discussion**

185 *3.1 Analytical method and quantification of phenolic compounds in infusions*

186 The validation of analytical data is extremely important because the values represent
 187 the reality of the analytes in the sample. The analytical curve was constructed within the range
 188 of 0.5 to 10.0 mg.L⁻¹ for all compounds except rutin that was 1.0 to 10.0 mg.L⁻¹. The
 189 chromatographic method was linear with R² between 0.9972 and 0.9995 with LOD below 94
 190 µg.L⁻¹ and LOQ below 284 µg.L⁻¹. The parameters for the curve's calibration of the 9 phenolic
 191 compounds are shown in Table 1.

192 **Table 1.** Validation parameters of the analytical curve for quantification of the 9 phenolic compounds.

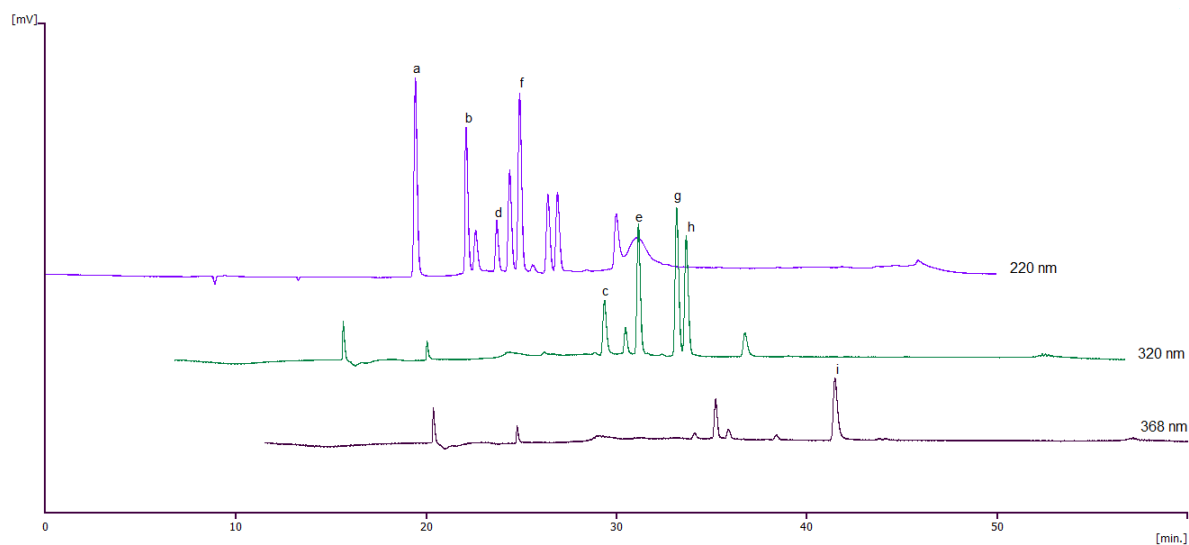
Compound	Linear range (mg.L⁻¹)	y = ax + b	R²	LOD (µg.L⁻¹)	LOQ (µg.L⁻¹)
Gallic acid	0.5 - 10.0	425.23x-3.294	0.9982	44.02	133.40
3-4- dihydroxybenzoic acid	0.5 -10.0	306.26x+7.619	0.9978	18.79	56.97
Chlorogenic acid	0.5 - 10.0	131.97x+20.566	0.9982	57.58	174.50
Rutin	1.0 - 10.0	90.883x+19.833	0.9988	93.52	283.99
Caffeic acid	0.5 - 10.0	291.85x-16.139	0.9986	24.40	73.93
Syringic acid	0.5 -10.0	464.79x+194.3	0.9987	40.16	121.69
Coumaric Acid	0.5 - 10.0	336.42x+10.501	0.9994	20.58	62.36
Ferulic acid	0.5 - 10.0	272.97x+8.863	0.9995	71.92	217.95
Quercetin	0.5 - 10.0	192.44x-24.665	0.9972	32.58	98.70

193 The table 2 demonstrated that the method has succeeded with the precision for average
 194 values tested in all compounds (RSD < 6.8%). These values are very good in terms of
 195 repeatability according to INMETRO (2016), which considers RSD values up to 20%.

196 **Table 2.** The precision of analytical method through repeatability for two concentrations of the mixture of phenolic
 197 compounds. Injections were performed in triplicate.

Compound	Repeatability (RSD,%)	
	0.5 mg.L⁻¹	2.5 mg.L⁻¹
Gallic acid	4.02	1.27
3-4-dihydroxybenzoic acid	1.67	0.95
Chlorogenic acid	6.72	3.20
Rutin	2.34	2.02
Caffeic acid	2.88	1.51
Syringic acid	1.68	0.72
Coumaric acid	1.33	1.78
Ferulic acid	4.91	1.31
Quercetin	4.40	2.21

198 The results of Tables 1 and 2 are in accordance with overlapping chromatograms shown
 199 in Figure 1, which represents symmetrical and narrow peaks.



200

201 **Figure 1.** Standard chromatogram of 10 mg.L⁻¹ mixture of the phenolic compounds; (a) gallic acid, (b) 3-4-
 202 dihydroxybenzoic acid, (c) chlorogenic acid, (d) rutin, (e) caffeic acid, (f) syringic acid, (g) coumaric acid, (h)
 203 ferulic acid and (i) quercetin.

204

The results in Figure 2-A also showed that the detector used (DAD) allows efficiency
 205 and separation resolution. This efficiency can also be seen in Table 3, which shows the low
 206 values of LOD and LOQ obtained by our study and other studies that also used phenolic
 207 compounds (Putnik et al., 2016; Gonçalves et al., 2019). Through a literature search, we
 208 compared the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of our study with other
 209 studies as shown in Table 3.

210

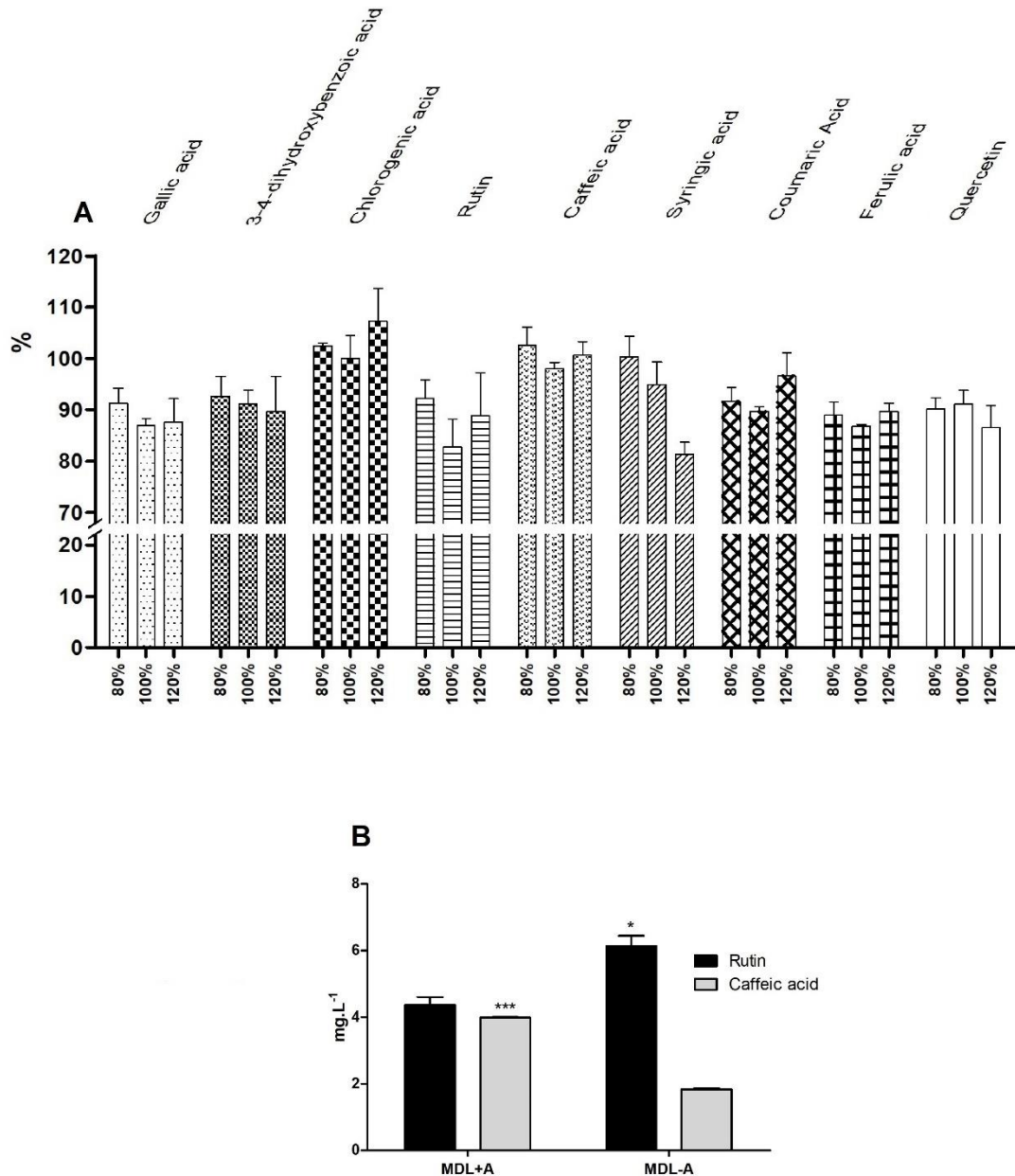
Table 3. Comparison between the LOD and LOQ obtained by the present study and those of other studies that
 211 also used the DAD detector.

Phenolic compounds	Ours results (µg.L ⁻¹)		Others studies (µg.L ⁻¹) 1)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Gallic acid	44.02	133.40	466.50 ^a	495.80 ^a
3-4-dihydroxybenzoic acid	18.79	56.97	700.00 ^c	2300.00 ^c
Chlorogenic acid	57.58	174.50	1600.00 ^c	8000.00 ^c

Rutin	93.52	283.99	710.00 ^d	2386.00 ^d
Caffeic acid	24.40	73.93	96.50 ^a	96.70 ^a
Syringic acid	40.168	121.69	118.10 ^a	124.40
Coumaric Acid	20.58	62.36	275.80 ^a	290.40 ^a
Ferulic acid	71.92	217.95	70.00 ^b	250.00 ^b
Quercetin	32.58	98.70	220.00 ^b	740.00 ^b

212 ^arepresents the study by González-González et al. (2019), ^brepresents the study by Madrera and Velles (2020), ^c
 213 represents the study by da Silva et al. (2019) and ^d represent the study by Gomes et al. (2017). When necessary,
 214 the results of other studies were converted to $\mu\text{g.L}^{-1}$ for comparison.

215 Regarding the accuracy of the chromatographic method, the values obtained are shown
 216 in Figure 2-A through the % recovery (% RC) of each phenolic compound. These data are
 217 within what is recommended by INMETRO (2016) and ANVISA (2017).



218

219 **Figure 2.** Figure 2-A: Recoveries (RC) of each phenolic compound in DML-A infusion spiked with 80, 100 and
 220 120% to recovery. Figure 2-B: Phenolic compounds quantified in DML+A and DML-A infusions. $P < 0.05$ (*) and
 221 $P < 0.0001$ (***) were significant for the same compounds. DML+A: dry and macerated leaf submitted to agitation;
 222 DML-A: Dry and macerated leaf without agitation.

223 The data in figure 2-A show a good recovery for each phenolic compound, because the
 224 values obtained ranged from 81.39 to 107.28%, with %RSD (data not shown) from 0.38% to
 225 9.94%. These results are similar to those found in other method validation studies for phenolic

226 compounds (Natividade et al. 2013; Padilha et al. 2017) and RSDs values were lower than the
227 maximum limit of 20% (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017).

228 Regarding the identification and quantification of phenolic compounds by HPLC-DAD
229 in all infusions (FL+A, FL-A, DML+A, and DML-A), only rutin and caffeic acid were found
230 in the infusions of DML+A and DML-A, the infusions of FL+A and FL-A did not contain the
231 compounds of interest within our detection limit, thus the data are shown in Figure 2-B.
232 Although the leaf weight used was the same for all infusions, the FL+A and FL-A groups
233 contained less soluble solid material (see section 3.2 - Solids Soluble).

234 The main compound identified was rutin with $4.36 \pm 0.24 \text{ mg.L}^{-1}$ in the DML+A
235 infusion and $6.13 \pm 0.31 \text{ mg.L}^{-1}$ in the DML-A infusion, followed by caffeic acid with $3.99 \pm$
236 0.02 mg.L^{-1} in DML+A infusion and $1.83 \pm 0.02 \text{ mg.L}^{-1}$ in DML-A infusion as shown in figure
237 2-B. The results were different from those found by Ramborger et al. (2017), who quantified
238 caffeic acid, coumaric acid, and ferulic acid with *P. neochilus* at 10.0 mg.L^{-1} of dry leaf
239 infusion. However, Matias et al. (2019) find rutin, caffeic, chlorogenic, and rosmarinic acid in
240 several aqueous extracts (10 g of plant material was boiled in 100 mL of distilled water) of
241 different species including infusions of *P. neochilus*. Although chlorogenic acid was included
242 in our method, it is known that the phenolic composition varies according to several factors in
243 plants, such as water availability, temperature, seasonality, and collection time (Ribeiro et al.,
244 2019; Ko et al., 2018). These aspects possibly influenced this variation in the composition found
245 by us about the other studies. In addition, Figure 2-B showed that the preparation of dry leaves
246 infusion provided greater extraction of rutin compared to caffeic acid. It was also noted that
247 agitation increased the extraction of caffeic acid, possibly due to the greater extraction of
248 compounds by the agitation. However, the agitation decreased the quantification of rutin. In
249 this case, we believe that is due to the degradation of rutin or, its complexation with others and
250 more compounds extracted by agitation. It can be seen in Table 4 that showed the greater

251 extraction of other compounds through the amount of soluble solids in DML+A. Therefore, the
 252 amount of soluble solids can have led to a greater saturation of the solution, not extracting the
 253 same amount of rutin or promoting its complexation with other compounds.

254 3.2 Soluble phenolic compounds and antioxidant capacity

255 After the development of the analytical method and its application in the different
 256 infusion preparations (groups), this study verified the amount of soluble solids, total phenolic
 257 composition, and antioxidant activity of the same groups. The data regarding soluble solids and
 258 total phenolic composition are shown in Table 4 and the antioxidant potential in Table 4.

259 **Table 4.** Comparison of the amount of soluble solids, presented in milligrams per milliliter of infusion and total
 260 phenolic content in micrograms of gallic acid equivalents per milligram of infusion and antioxidant potential.

Infusion	Soluble Solids ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Total Phenolic ($\mu\text{gGAE.mg}^{-1}$)	TAC ($\mu\text{gAAE.mg}^{-1}$)	Inhibition of DPPH radical (%)
FL+A	Nd	Nd	Nd	38.41 ± 1.13
FL-A	Nd	Nd	Nd	37.88 ± 0.61
DML+A	850.00 ± 0.01	12.40 ± 2.08	19.54 ± 2.55	54.85 ± 0.99
DML-A	812.50 ± 265.00	10.53 ± 1.24	15.72 ± 0.8	52.66 ± 2.65

261 *Nd - not detected.

262 These results showed that the infusion DML+A presented a higher amount of soluble
 263 solids ($850.00 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0.01$) when compared to DML-A ($812.50 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 265.00$), just like
 264 the total phenolic compounds ($12.40 \mu\text{gGAE.mg}^{-1}$ in DML+A and $10.53 \mu\text{g GAE.mg}^{-1}$ in DML-
 265 A). The FL+A and FL-A were below minimum reliability weight and detection, in other words,

266 they contained less soluble solids materials. There is no research with *P. neochilus* or genus
267 *Plectranthus* that mentions the concentrations of the total phenolic compounds under these
268 conditions of infusions and preparation. There is only the study of Pires et al. (2016) with
269 ethanolic extracts of the different parts of *P. neochilus* that presented lower concentrations than
270 those obtained in the present study ($3.26 \text{ mgGAE.g}^{-1}$ at $5.40 \text{ mgGAE.g}^{-1}$).

271 The antioxidant potential for the different infusions is shown in Table 4 and showed that
272 in the preparations with fresh leaves, only the DPPH method detected activity of $38.41\% \pm 1.13$
273 and $37.88\% \pm 0.61$ with and without agitation respectively. Also, the results with the DPPH
274 method showed greater antioxidant capacity when using the dry leaf with agitation $54.85\% \pm$
275 0.99 (DML+A) and $52.66\% \pm 2.65$ (DML-A). In the test with the phosphomolibdenium, a total
276 antioxidant capacity of $19.54 \mu\text{gAAE.mg}^{-1} \pm 2.55$ in DML+A and $15.72 \mu\text{gAAE.mg}^{-1} \pm 0.80$
277 in DML-A.

278 For the percent inhibition, it was considered the inhibition values equal to or greater
279 than 50% as significant. Total antioxidant capacity (TAC) by the formation of the
280 phosphomolibdium and inhibition of DPPH radical.

281 The percentage of inhibition of DPPH is a parameter that demonstrates if the samples
282 have the significant antioxidant capacity or not (Brand-Williams et al., 1995; Bondet et al.,
283 1997; Schaich et al., 2015). About the study of Freitas et al. (2014) conducted with *Plectranthus*
284 *amboinicus*, they obtained just 40% inhibition of free radicals with DPPH in ethanol extract.
285 The other infusions were below 40%, showing a low antioxidant capacity.

286 The bad results for fresh leaf infusions (FL+A and FL-A) may be due to the amount of
287 leaf needed to reach the same concentrations (seen in soluble solids, section 3.2). According to
288 Bandeira et al. (2011) and Bocardi (2007), the fresh leaves of *P. neochilus* have a high water
289 content (93.12% and 93.70%), which implies using more leaves to reach the same concentration

290 as the leaves dry (which is absent from water, dry matter only). Also, the low results found for
291 these two infusions maybe because they were not macerated (only the dried leaves) which
292 implies a greater surface area in infusions with the dry leaf. Through these results, together with
293 those found for the quantification of phenolic compounds, soluble solids and total phenolics,
294 the importance of the way in which infusions are prepared is evident.

295 **4 Conclusion**

296 The present study was able to develop and validate a HPLC-DAD chromatographic method
297 for 9 phenolic compounds within the required parameters and presented excellent results in all
298 stages of validation of the analytical method. The values obtained for each evaluated parameter
299 were: r^2 0.99722-0.9995, LOD and LOQ $< 94 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $< 284 \mu\text{g.L}^{-1}$, repeatability with RSDs
300 $< 6.8\%$ and recuperation of 81.39-107.28% in DML-A. This method allowed the detection of
301 caffeic acid ($3.99 \pm 0.02 \text{ mg.L}^{-1}$ in DML+A and $1.83 \pm 0.02 \text{ mg.L}^{-1}$ in DML-A) and rutin (4.36
302 $\pm 0.24 \text{ mg.L}^{-1}$ in DML+A and $6.13 \pm 0.31 \text{ mg.L}^{-1}$ in DML-A). These results obtained in the
303 application of the chromatographic method together with those obtained by soluble solids, total
304 phenolic compounds and antioxidant capacity showed that preparation of the infusion with the
305 drying of the leaves, maceration and agitation promoted the best results to the phenolic
306 compounds for the species *P. neochilus*.

307 **5. Credit authorship contribution statement**

308 **Murilo Carriço Sigal:** development, execution of the study and writing. **Bruna Piaia**
309 **Ramborger:** formal and written analysis. **Mateus Cristofari Gayer:** Formal and written
310 analysis. **Jefferson de Jesus Soares:** Planning and methodology of the study. **Elton Luis**
311 **Gasparotto Denardin:** Supervision. **Rafael Roehrs:** Writing, methodology and supervision.

312 6. Funding sources

313 This study was funded by Federal University of Pampa (UNIPAMPA) and financed in part
314 by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

315 7. Declaration of Competing Interest

316 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal
317 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

318 8. Acknowledgement

319 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
320 Nível Superior – Brasil (CAPES)

321 9. References

- 322 Bandeira, J. M., Barbosa, F. F., Barbosa, L. M. P., Rodrigues, I. C. S., Bacarin, M. A., Peters,
323 J. A., & Braga, E. J. B. (2011). Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero
324 *Plectranthus*. [Essential oil composition of four *Plectranthus* species]. *Revista Brasileira de*
325 *Plantas Mediciniais*, 13(2), 157-164. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000200006>.
- 326 Bocardi, J. M. B. (2007). Etnofarmacologia das plantas medicinais de céu azul e composição
327 química do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schltr [Ethnopharmacology of blue sky
328 medicinal plants and chemical composition of *Plectranthus neochilus* Schltr essential oil]
329 [Master's thesis, State University of Ponta Grossa]. State University of Ponta Grossa
330 Repository. <http://tede2.uepg.br/jspui/handle/prefix/2055>.
- 331 Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. L. W. T. (1997). Kinetics and Mechanisms of
332 Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *LWT-Food Science and*
333 *Technology*, 30(6), 609-615. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>.

- 334 Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method
335 to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
336 [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- 337 Brito, E., Gomes, E., Falé, P. L., Borges, C., Pacheco, R., Teixeira, V., ... & Serralheiro, M. L.
338 M. (2018). Bioactivities of decoctions from *Plectranthus* species related to their traditional use
339 on the treatment of digestive problems and alcohol intoxication. *Journal of*
340 *Ethnopharmacology*, 220, 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.006>.
- 341 Broinizi, P. R. B., Andrade-Wartha, E. R. S. D., Silva, A. M. D. O., Novoa, A. J. V., Torres, R.
342 P., Azeredo, H. M. C., ... & Mancini-Filho, J. (2007). Avaliação da atividade antioxidante dos
343 compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju
344 (*Anacardium occidentale* L.) [Evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds
345 naturally contained in by-products of the Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.)]. *Ciência*
346 *e Tecnologia de Alimentos*, 27(4), 902-908. [https://doi.org/10.1590/S0101-](https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400035)
347 [20612007000400035](https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400035).
- 348 Crevelin, E. J., Caixeta, S. C., Dias, H. J., Groppo, M., Cunha, W. R., Martins, C. H. G., &
349 Crotti, A. E. M. (2015). Antimicrobial activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus*
350 against cariogenic bacteria. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
351 <https://doi.org/10.1155/2015/102317>.
- 352 da Silva, B., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2019). Simplex-centroid design and
353 Derringer's desirability function approach for simultaneous separation of phenolic compounds
354 from *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys by HPLC/DAD. *Journal of*
355 *Chromatography A*, 1585, 182-191. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.072>.

- 356 Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological*
357 *reviews*, 82(1), 47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
- 358 Faller, A. L. K., & Fialho, E. (2009). Polyphenol availability in fruits and vegetables consumed
359 in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 43(2), 211-218. [https://doi.org/10.1590/S0034-](https://doi.org/10.1590/S0034-89102009005000010)
360 [89102009005000010](https://doi.org/10.1590/S0034-89102009005000010).
- 361 Freitas, R. C., Azevedo, R. R. S., Souza, L. I. O., Rocha, T. J. M., & dos Santos, A. F. (2014).
362 Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthus amboinicus*
363 (Lour.) e *Mentha x villosa* (Huds.) [Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of
364 the species *Plectranthus amboinicus* (Lour.) and *Mentha x villosa* (Huds.)]. *Revista de Ciências*
365 *Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 35(1), 113-118.
366 <http://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/163>.
- 367 Gomes, S. V. F., Portugal, L. A., dos Anjos, J. P., de Jesus, O. N., de Oliveira, E. J., David, J.
368 P., & David, J. M. (2017). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a
369 Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora*
370 species. *Microchemical Journal*, 132, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.021>.
- 371 Gonçalves, J., Ramos, R., Rosado, T., Gallardo, E., & Duarte, A. P. (2019). Development and
372 validation of a HPLC–DAD method for quantification of phenolic compounds in different
373 sweet cherry cultivars. *SN Applied Sciences*, 1(9), Article 954. [https://doi.org/10.1007/s42452-](https://doi.org/10.1007/s42452-019-0680-4)
374 [019-0680-4](https://doi.org/10.1007/s42452-019-0680-4).
- 375 González-González, R. M., Barragán-Mendoza, L., Peraza-Campos, A. L., Muñoz-Valencia, R.,
376 Ceballos-Magaña, S. G., & Parra-Delgado, H. (2019). Validation of an HPLC-DAD method
377 for the determination of plant phenolics. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(5), 689-693.
378 <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.06.002>.

- 379 Hirata, L. L., SATO, M. E. O., & SANTOS, C. A. D. M. (2004). Radicais livres e o
380 envelhecimento cutâneo [Free radicals and skin aging]. *Acta Farm. Bonaerense*, 23(3), 418-
381 424. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6678>.
- 382 Karou, D., Dicko, M. H., Simpore, J., & Traore, A. S. (2005). Antioxidant and antibacterial
383 activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African journal of*
384 *biotechnology*, 4(8), 823-828. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/15190>.
- 385 Ko, H. C., Lee, J. Y., Jang, M. G., Song, H., & Kim, S. J. (2018). Seasonal variations in the
386 phenolic compounds and antioxidant activity of *Sasa quelpaertensis*. *Industrial Crops and*
387 *Products*, 122, 506-512. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.031>.
- 388 Lukhoba, C. W., Simmonds, M. S. J., & Paton, A. J. (2006). Plectranthus: A Review of
389 Ethnobotanical Uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 1-24.
390 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.011>.
- 391 Madrera, R. R., & Valles, B. S. (2020). Development and validation of ultrasound assisted
392 extraction (UAE) and HPLC-DAD method for determination of polyphenols in dry beans
393 (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 85, Article 103334.
394 <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103334>.
- 395 Matias, D., Nicolai, M., Fernandes, A. S., Saraiva, N., Almeida, J., Saraiva, L., ... & Rijo, P.
396 (2019). Comparison Study of Different Extracts of *Plectranthus madagascariensis*, *P.*
397 *neochilus* and the Rare *P. porcatus* (Lamiaceae): Chemical Characterization, Antioxidant,
398 Antimicrobial and Cytotoxic Activities. *Biomolecules*, 9(5), Article 179.
399 <https://doi.org/10.3390/biom9050179>.
- 400 Morais, S. M. D., Cavalcanti, E. S., Costa, S. M. O., & Aguiar, L. A. (2009). Ação antioxidante
401 de chás e condimentos de grande consumo no Brasil [Antioxidant action of teas and seasonings

- 402 more consumed in Brazil]. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1B), 315-320.
403 <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200023>.
- 404 National Health Surveillance Agency (ANVISA). Resolution of the Collegiate Board nº 166
405 (July 24, 2017) (enacted).
406 http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401.
- 408 National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO) (2016). Orientação
409 sobre validação de métodos analíticos [Guidance on validation of analytical methods].
410 http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf.
- 411 Natividade, M. M. P., Corrêa, L. C., de Souza, S. V. C., Pereira, G. E., & de Oliveira Lima, L.
412 C. (2013). Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method
413 validation and characterization of São Francisco Valley samples. *Microchemical Journal*, 110,
414 665-674. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.08.010>.
- 415 Nishiyama, M. F., Costa, M. A. F., Costa, A. M. D., Souza, C. G. M. D., Bôer, C. G., Bracht,
416 C. K., & Peralta, R. M. (2010). Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos
417 do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de
418 extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida [Brazilian green tea (*Camellia sinensis*
419 var *assamica*): effect of infusion time, mode of packaging and preparation on the extraction
420 efficiency of bioactive compounds and on the stability of the beverage]. *Ciência e Tecnologia*
421 de Alimentos, 30, 191-196. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000500029>.
- 422 Padilha, C. V. D. S., Camarão Telles Biasoto, A., Corrêa, L. C., dos Santos Lima, M., & Pereira,
423 G. E. (2017). Phenolic compounds profile and antioxidant activity of commercial tropical red

- 424 wines (*Vitis vinifera* L.) from São Francisco Valley, Brazil. *Journal of Food Biochemistry*,
425 41(3), Article e12346. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12346>.
- 426 Pereira, R. J., & Cardoso, M. G. (2012). Metabólitos secundários vegetais e benefícios
427 antioxidantes [Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits]. *Journal of*
428 *biotechnology and biodiversity*, 3(4), 146-152. [https://www.todafruta.com.br/wp-](https://www.todafruta.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Metab%C3%B3litos-secund%C3%A1rios-ARTIGO.pdf)
429 [content/uploads/2016/09/Metab%C3%B3litos-secund%C3%A1rios-ARTIGO.pdf](https://www.todafruta.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Metab%C3%B3litos-secund%C3%A1rios-ARTIGO.pdf).
- 430 Pires, F. B., Dolwitsch, C. B., Loose, R. F., Dal Prá, V., Schneider, V. M., Schmidt, M. E. P.,
431 ... & da Rosa, M. B. (2016). Perfil cromatográfico e atividade antioxidante frente aos radicais
432 pero-xila (ROO•), superóxido (O₂•-) e DPPH da folha, flor, ramo e inflorescência da
433 *Plectranthus barbatus* [Chromatographic profile and antioxidant activity front peroxy radical
434 (ROO•), superoxide (O₂•-) and DPPH of the leaf, flower, twig and inflorescence of
435 *Plectranthus barbatus*]. *Ciência e Natura*, 38(3), 1496-1503.
436 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=467547716037>.
- 437 Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant
438 capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the
439 determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
440 <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
- 441 Putnik, P., Kovačević, D. B., Penić, M., Fegeš, M., & Dragović-Uzelac, V. (2016). Microwave-
442 assisted extraction (MAE) of dalmatian sage leaves for the optimal yield of polyphenols:
443 HPLC-DAD identification and quantification. *Food Analytical Methods*, 9(8), 2385-2394.
444 <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0428-3>.
- 445 Ramborger, B. P., Gularte, C. A. O., Rodrigues, D. T., Gayer, M. C., Carriço, M. R. S.,
446 Bianchini, M. C., ... & Roehrs, R. (2017). The phytoremediation potential of *Plectranthus*

- 447 *neochilus* on 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and the role of antioxidant capacity in herbicide
448 tolerance. *Chemosphere*, 188, 231-240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.164>.
- 449 Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., & Melo, L. F. C. (2004).
450 Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos [Validation for chromatographic and
451 electrophoretic methods]. *Química nova*, 27(5), 771-780. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017)
452 [40422004000500017](https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017).
- 453 Ribeiro, D. A., de Macêdo, D. G., Boligon, A. A., Menezes, I. R. A., de Almeida Souza, M. M.,
454 & da Costa, J. G. M. (2019). Influence of seasonality on the phenolic composition of *Secondatia*
455 *floribunda* A. DC (Apocynaceae) during its phenological cycle. *Acta Physiologiae Plantarum*,
456 41(12), 185. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2975-x>.
- 457 Rocha, W. S., Lopes, R. M., Silva, D. B. D., Vieira, R. F., Silva, J. P. D., & Agostini-Costa, T.
458 D. S. (2011). Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado
459 [Total phenolics and condensed tannins in native fruits from Brazilian savanna]. *Revista*
460 *Brasileira de Fruticultura*, 33(4), 1215-1221. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000400021)
461 [29452011000400021](https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000400021).
- 462 Rodrigues, V. C., da Silva, M. V., dos Santos, A. R., Zielinski, A. A., & Haminiuk, C. W.
463 (2015). Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas. *International*
464 *Journal of Food Science & Technology*, 50(9), 2038-2045. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12858>.
- 465 Rufino, M. D. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S. D., Morais, S. M. D., Sampaio, C. D. G., Pérez-
466 Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2007). *Metodologia científica: determinação da atividade*
467 *antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH* [Scientific methodology:
468 *determination of the total antioxidant activity in fruits by capturing the free radical DPPH*].

- 469 Embrapa Tropical Agroindustry.
470 https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf.
- 471 Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant
472 efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional*
473 *Foods*, 14, 111-125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>.
- 474 Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes [Phenolic acids as antioxidants].
475 *Revista de nutrição*, 15(1), 71-81. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>.
- 476 Stangarlin, J. R., Kuhn, O. J., Toledo, M. V., Portz, R. L., & Pascholati, S. F. (2011). A defesa
477 vegetal contra fitopatógenos [The plant defense against pathogens]. *Scientia Agraria*
478 *Paranaensis*, 10(1), 18-46. [http://e-](http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/5268/3929)
479 [revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/5268/3929](http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/5268/3929).

10. Appendix

Appendix 1- Highlights

The HPLC-DAD method is able to quantify the 9 phenolic compounds.

The infusion with dry leaves in agitation extracted more phenolics and caffeic acid.

Stirring increases extraction of phenolic compounds during the infusions.

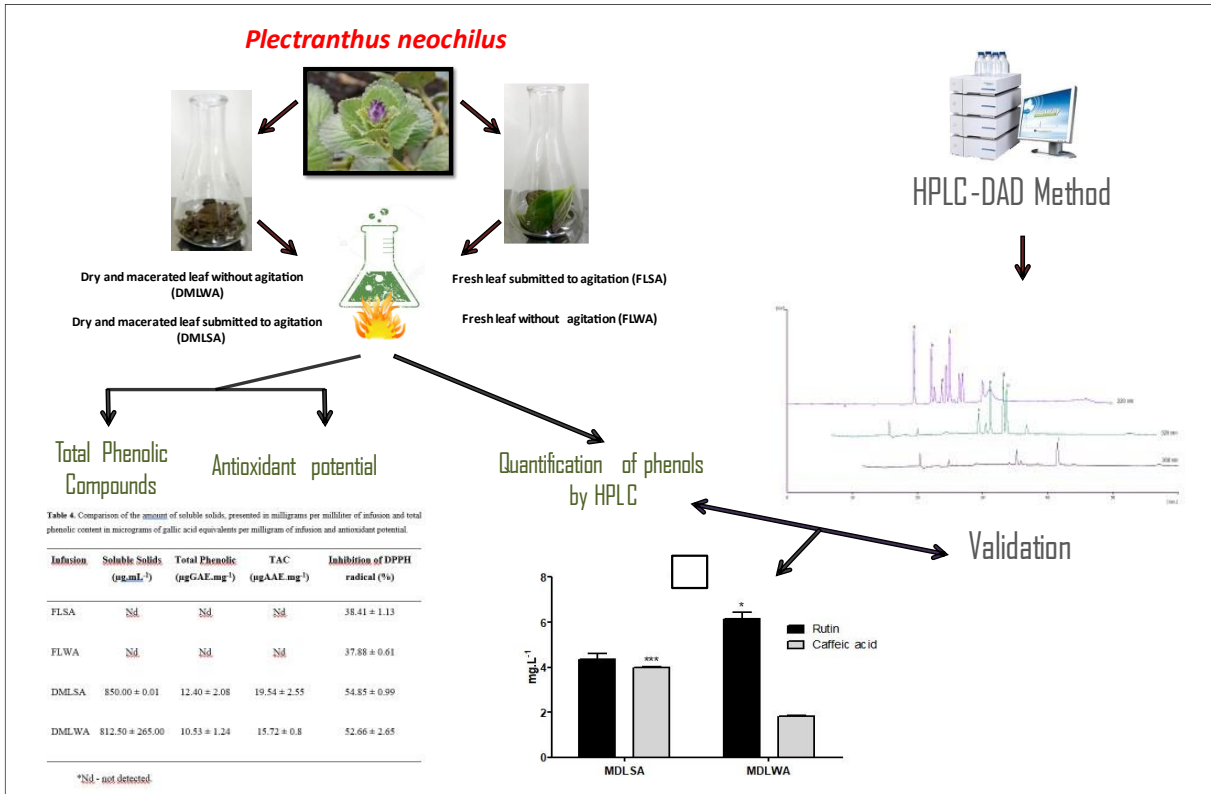
The larger surface area of the dry leaf makes the extraction more efficient.

Appendix 2 - Abstract

This work aims to evaluate which form of infusion best extracts phenolic compounds and antioxidants in *P. neochilus*'s leaves whose pharmacological actions are related. We seek to develop and validate an analytical method by HPLC-DAD to quantify phenolic compounds (3-4-dihydroxybenzoic, caffeic, cumarian, chlorogenic, ferulic, synergic, gallic acids in addition to rutin and quercetin) and to analyze the best way to prepare infusion. The validation parameters followed were selectivity, linearity, precision, limits of detection and quantification and recovery. Thus, the infusions (10 mg.L⁻¹) were prepared varying the condition of the leaf (freshly collided or dried) and use of agitation during the infusion. We also quantified the antioxidant potential, level of total phenolic compounds and soluble solids in all infusions. The chromatographic method showed satisfactory results in all stages of validation. Among the 4 different infusions, the conditions that provided the best extraction were the infusion with dry leaves with agitation, presenting a greater amount of total phenolic compounds, antioxidant potential soluble solids and caffeic acid than other infusions. Thus, the infusion with dry leaf

under agitation provided the greatest extraction of bioactive compounds from the leaves of *P. neochilus*.

Appendix 3 – Graphical abstract

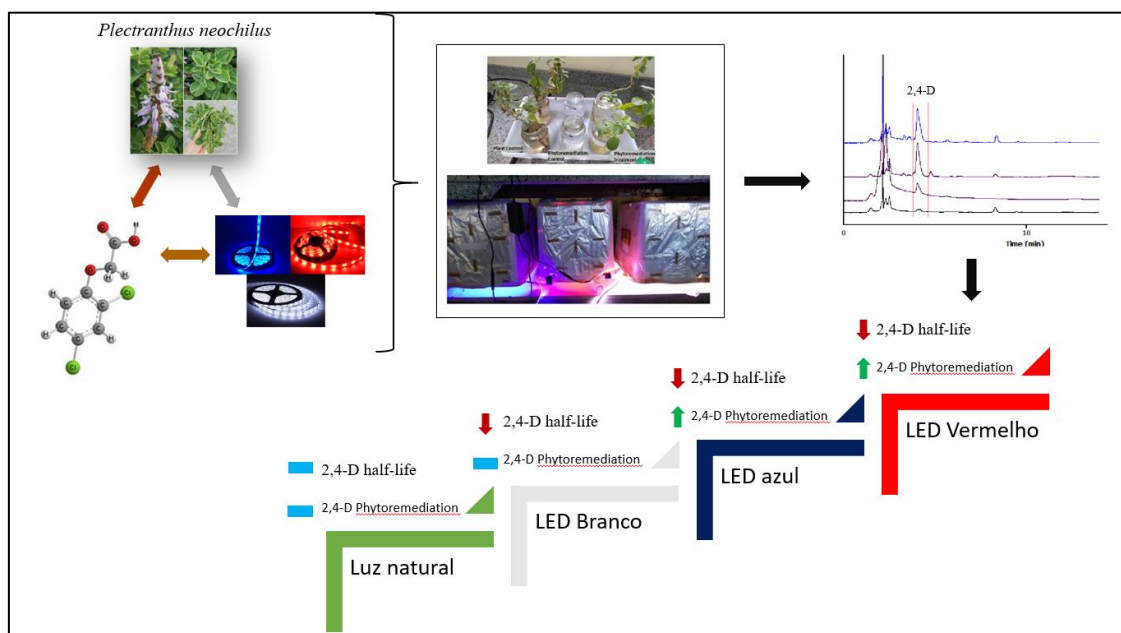


5. MANUSCRITO 2

Os dados sobre a o aumento a eficiência da fitorremediação de 2,4-D por *P. neochilus* através de estímulos luminosos (fotoestímulo) com LEDs está apresentados no formato de manuscrito organizado e formatado nas orientações para autores na revista *Chemosphere* (<https://www.elsevier.com/journals/chemosphere/0045-6535/guide-for-authors>), com Qualis A2 (F. I. 5,778) na área de CBII (ano 2013-2016).

24 by Light Emitting Diodes (LEDs) with *P. neochilus* to promote phytoremediation of 2,4-D in
 25 water. To this end, we developed and validated a method for quantifying 2,4-D by HPLC-DAD
 26 / RF-SPE. Phytoremediation was evaluated with the following samples: natural light, white
 27 LED, blue LED, and red LED with and without the plant. The data corresponding to the
 28 validation of the method was within the required parameters: R^2 : 0.9926; RSD: 1.74%; LOD:
 29 0.075 mg.L^{-1} ; LOQ: 0.227 mg.L^{-1} and recovery by SPE was 76.57%. The efficiency of the
 30 association of LEDs with *P. neochilus* in the 28 days occurred in the following sequence:
 31 ambient light + plant (47.0%); white + plant (37.10%); blue + plant (26.80%); red + plant
 32 (3.32%). The advantage of using LEDs associated with the plant was confirmed by the results
 33 obtained with their respective controls, which were between 40.0% and 55.0%. This work
 34 showed, for the first time, the efficiency of using LEDs in association with *P. neochilus* for the
 35 phytoremediation of 2,4-D in water.

36 Graphical Abstract



38 **Keywords:** Decontamination; Boldo gambá; Photostimulus; Pesticides; Green technology.

39 1. Introduction

40 Pesticides are chemical or biological agents that aim to combat, destroy, prevent, repel, or
41 mitigate pests in different environments (MARIANO and OKUMURA, 2012). In the past two
42 decades, they have been widely used to ensure high agricultural productivity (CAI, et al. 2020;
43 POPP, et al., 2014). However, its improper use can lead to the toxicity of both surface or
44 groundwater, as well as soils, and consequently of living organisms (BUNZEL et al., 2014;
45 MARIANO & OKUMURA, 2012; SUCAHYO et al., 2008; WANG et al., 2018).

46 The herbicide 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is a chlorinated compound and its
47 commercial product (Aminol 806®) has a toxicological classification I (extremely toxic
48 product) and a potential for environmental hazard III (dangerous to the environment). It is used
49 in agriculture to prevent the growth of broadleaf weeds in rice, coffee, sugar cane, corn,
50 soybeans, wheat, and pastures (ADAMA, 2016; XU et al. 2020). In studies related to toxicity
51 in living organisms, this compound is considered an endocrine disruptor, teratogenic,
52 carcinogenic, and toxic agent in high concentrations, as it can lead to adverse effects on the
53 immune and reproductive system (LAM et al 2015; Li et al. 2020; XU et al. 2020). In Brazil,
54 its use had a significant increase in the period between 2009 and 2017, where it went from
55 approximately 12116 tons of active ingredient to more than 57389 (ASCOM / SEAPDR, 2019).
56 In the state of Rio Grande do Sul (Brazil), 2,4-D gained visibility in the media due to the drift
57 process of this compound, due to its poor application, causing damage in dozens of rural
58 properties. The main crops affected by the 2,4-D drift in southern Brazil were: grapes, olive
59 trees, apples, corn, ryegrass, and native field in fish farming (COLUSSI. 2019; EGAN et al.
60 2014). Cases like these made the World Health Organization (WHO) define a maximum
61 permitted concentration of $70 \mu\text{g.L}^{-1}$ of this compound in water resources (HAN et al. 2010).
62 According to the above, the use of 2,4-D becomes a public health concern, due to the damage

63 caused by its toxicity, the significant increase in its use, and its characteristic of high solubility
64 in water.

65 A solution to the environmental contamination of 2,4-D is phytoremediation, which is
66 configured by using plants to promote the decontamination of the environment (soil, water, and
67 air). This technique has little or no environmental impact, as it uses the metabolism of plants
68 through enzymes (hydrolytic, transferases, oxidases, and reductases) and their systems for
69 absorbing substances from the environment to detoxify various contaminants, both organic and
70 inorganic (DOSNON-OLETTE et al., 2010; EBRAHIMBABAIE, et al., 2020; EEVERS et al.,
71 2017). Besides, this technique does not alter the structure of the contaminated area, it is cheap
72 when compared to physical and chemical techniques for decontamination, and many studies
73 have already implemented its use as an efficient form of decontamination (DOSNON-OLETTE
74 et al., 2010; GENT et al., 2007; HATZIOS 1991; ROSTAMI and AZHDARPOOR, 2019;
75 MANDELBAUM et al., 1995).

76 In this scenario, the use of the species *P. neochilus*, known in Brazil as “boldo gambá” or
77 “boldinho” has already been highly recommended to promote the environmental
78 phytoremediation of 2,4-D in water (RAMBORGGER et al. 2020b RAMBORGGER et al., 2017).
79 This plant belonging to the Lamiaceae family and its leaf tea is considered medicinal, mainly
80 for treating liver and digestive problems. According to Ramborger et al., (2020a), *P. neochilus*
81 is used for several purposes, such as: ornamental (POOLEY, 1998; VAN JAARVELD and
82 THOMAS, 2006), green roof technology (MORAU et al., 2012), and phytoremediation.
83 Knowing that 2,4-D phytoremediation has already been researched with this plant by
84 Ramborger et al., (2017; 2020b), the hypothesis of this work is, if the use of *P. neochilus* in
85 association with Light Emitting Diodes (LEDs) is capable of making phytoremediation more
86 efficient, since, in the works cited (Ramborger et al., 2017; 2020b), 2,4-D was still detected in
87 60 days (40%). In addition, the use of light stimuli is a promising technology to increase the

88 levels of bioactive compounds in several species of plants and there are no records of studies
89 that have used it to stimulate the phytoremediation of pesticides or organic compounds in plants.
90 This data is based on the advantages promoted by LEDs, such as better biomass production and
91 physical-chemical characteristics, increased expression or activity of antioxidant enzymes, as
92 well as, in the increase of secondary metabolism compounds of different plant species (AGATI
93 et al 2013; NADEEM et al. 2019; PANJAI et al. 2019; SHOHAEL et al. 2006).

94 In this perspective, the objective of this study was to increase the efficiency of 2,4-D
95 phytoremediation by *P. neochilus* through light stimuli (LEDs: white, blue, red, and ambient
96 light).

97 **2. Materials and methods**

98 *2.1. Chemicals, reagents, and materials*

99 The 2,4-D used in this study in phytoremediation tests was the commercial base Aminol 806®
100 (Adama, Brazil) which contained the following composition: 806 g.L⁻¹ (80.6% w / v) of
101 dimethylammonium (2,4 -dichloro phenoxy) acetate (2,4-D dimethylamine); 670 g.L⁻¹ (67.0%
102 w / v) acid equivalent of 2,4-D; 429 g.L⁻¹ (42.9% w/v) of other ingredients). The standard active
103 ingredient of 2,4-D used to perform the analytical tests were published by Sigma-Aldrich.
104 HPLC grade methanol and acetonitrile solvents were chosen by J. T. Baker (Netherlands).
105 Strata-X solid-phase extraction (SPE) cartridges (500mg/6mL) were purchased from Allcrom
106 (Milford. MA. USA).

107 *2.2 Plant material*

108 The specimens of *P. neochilus* were grown in the greenhouse of the Universidade Federal do
109 Pampa, Urugaiana, RS, Brazil (Lat.:29.830897, Log.: -57100322). The plants were identified
110 and registered by the herbarium located at the university itself.

111 2.3 Validation of the chromatographic method by HPLC-DAD

112 The equipment used in the analyzes was a Young Lin Liquid Chromatograph (YL) 9100 with
113 diode array decoder (HPLC-DAD), equipped with quaternary pumps (YL9110) connected to a
114 degasser (YL9101) and AutoSampler (YL9150), from Kyoto (Japan) The separation, detection,
115 and quantification of 2,4-D in the chromatographic system was performed with the C18 inertsil
116 ODS-3 5 μm (4.6 x 250 nm) column (GL Sciences, Tokyo, Japan). For the conditions of the
117 chromatographic method, an elution gradient is used with acetonitrile: acidified water (pH 3)
118 in the ratio of 70:30 to 87,2: 18,8 in 6 minutes, this condition remains in isocratic mode until 7
119 minutes. The gradient of the initial conditions was restored up to 10 minutes (acetonitrile:
120 acidified water (pH 3) in the proportion of 70:30) and the elution was maintained in an isocratic
121 way until 14 minutes. The flow remained constant throughout the chromatographic run with
122 1.2 mL.min⁻¹. For the construction of the calibration curve, points 2 were used; 4; 8; 10; 12
123 mg.L⁻¹ and the validation steps were performed according to Ribani, et al. (2004): selectivity,
124 precision, Limit of Detection (LOD), Limit of Quantification (LOQ) and specificity. Intra-day
125 repeatability was assessed through a series of 3 analyzes on the concentration of the lowest
126 point on the curve and expressed by the relative standard deviation (% RSD).

127 2.4 Extraction and quantification of 2,4-D by SPE

128 Flasks with 500 mL of distilled water were fortified with Aminol 806 for extraction and
129 quantification tests with solid-phase extraction (Strata-X) cartridges (SPE), according to Caldas
130 et al. (2010). Initially, 10 ml of water fortified with 2,4-D were previously acidified with 100
131 μL H₃PO₄ (1: 1) and the cartridges were conditioned with 6 ml of methanol, 6 ml of water, and
132 6 ml of water pH 3 (H₃PO₄ 1: 1). The sample was percolated and the analyte was eluted with
133 10 mL of methanol, which was evaporated to dryness in a rotary evaporator (40 °C) under
134 vacuum. Subsequently, 2,4-D was resuspended in 500 μL of methanol for further analysis by
135 HPLC-DAD (method described in section 2.3).

136 2.5 Treatment groups

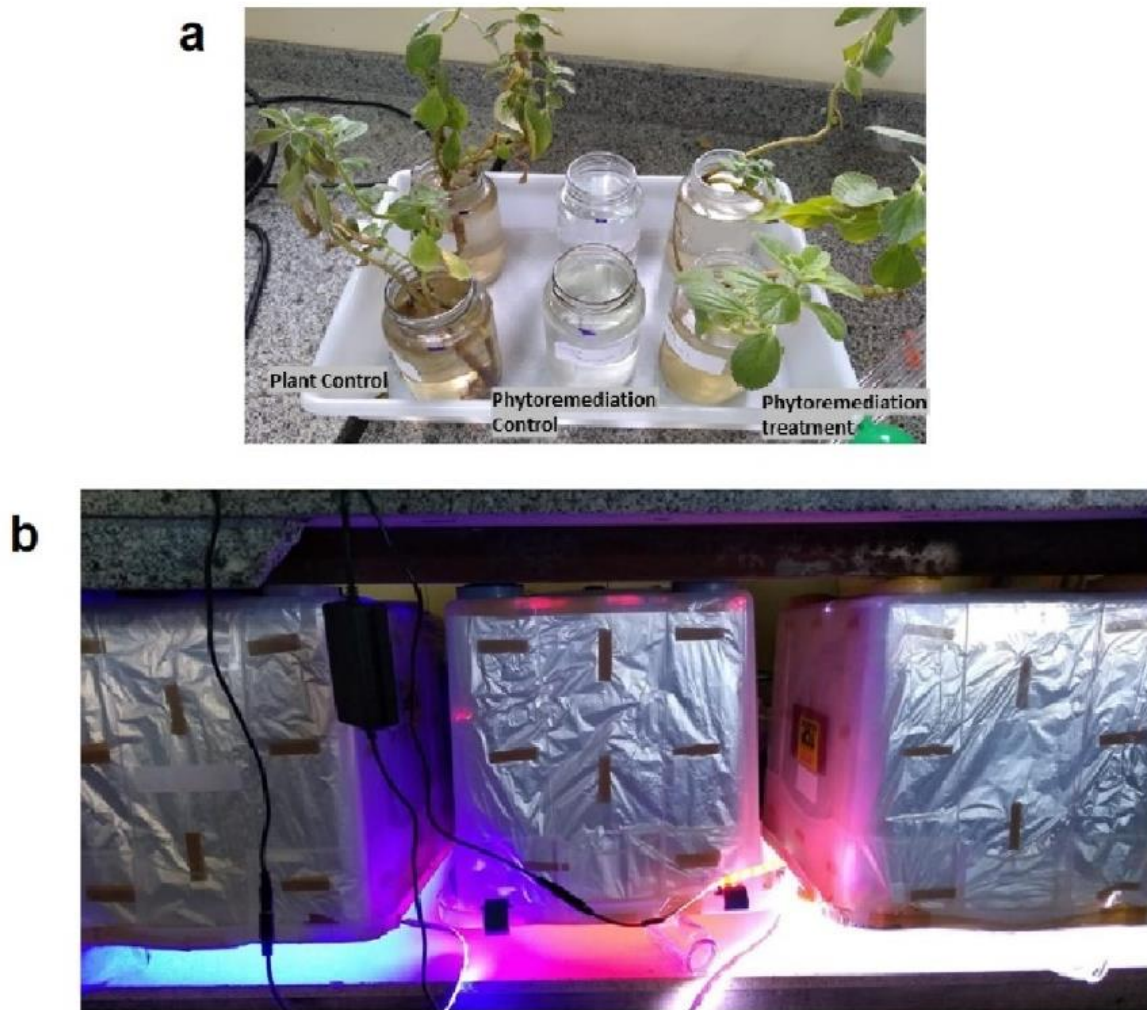
137 To assess the influence of LEDs on the phytoremediation process with *P. neochilus*, chapels
138 were built with LEDs. For this, cardboard boxes were lined internally with aluminum foils and
139 LED strips (purchased from local stores). The LEDs were 5 meters long, 8 mm wide and 300
140 LEDs (3.5 mm x 2.8 mm), consumption of 5 w, generating approximately 200 lm.m⁻¹ (lumens
141 per meter). As colors selected for the treatment were: white, red, and blue, in addition to the
142 control without the LED (natural light) (Figure 1b).

143 For each treatment, the following groups were used according to Ramborger et al. (2017) and
144 can be seen in figure 1:

145 - Plant control: group used to assess variations in the environment in which the plant was
146 inserted, 2 plants with water in 500 mL bottles.

147 - Phytoremediation control: group used to control the self-degradation of 2,4-D, water fortified
148 with the pesticide (2,418 kg.ha⁻¹ of Aminol) in 500 mL bottles.

149 - Phytoremediation treatment according to the LED light: 2 plants with water fortified with 2,4-
150 D (2,418 kg.ha⁻¹ of Aminol) in 500 ml flasks. These treatments can be seen in figure 1a.



151

152 Figure 1. Representation of groups with the different lights used in the experiment. a) composition of groups for
 153 natural light; b) chapel with LEDs in blue, red, and white.

154 All plants used are approximately the same size, leaf area, and root size. The 2,4-D
 155 concentration used in Aminol 806 was twice the maximum allowed concentration for most
 156 cultures found in RS (Brazil). The collections (10 mL) were performed in 0, 7, 14, 21, and 28
 157 days for all users, and the water volume of the treatments was readjusted daily to 500 mL.

158 2.6 2,4-D dissipation rate analysis (days)

159 To verify the phytoremediation and the half-life of the 2,4-D herbicide concentration in the
 160 groups over the days, the first-order equation of was used: $\ln [C_t] = \ln [C_0] - kt$ (ESCOTO et al.

161 2019). C_t , represents the concentration in time (t), C_0 represents the initial concentration, and k
 162 is the degradation constant obtained through the slope of the line equation.

163 The half-life ($t_{1/2}$), which represents how much the initial concentration was reduced to 50%,
 164 was calculated using the following equation: $(t_{1/2}) = \ln 2/k$.

165 2.7 Statistical analysis

166 For the construction of the 2,4-D calibration curve by HPLC-DAD, the linear regression
 167 equation ($y = ax - b$) was used. For data on phytoremediation treatments using the LEDs, two-
 168 way ANOVA with Bonferroni post-test was used. The dissipation rate of 2,4-D was calculated
 169 according to equations 1 and 2. All results are expressed as mean \pm standard error (SE).

170 3. Results and discussion

171 3.1 Data from the analytical development curve 2.4

172 Before chromatographic analysis for the quantification of 2,4-D in the phytoremediation
 173 sample, it was necessary to certify that the chromatographic method generated information,
 174 avoiding misinterpretation of the results. In this perspective, the analytical method went through
 175 the analytical validation process, to be able to quantify the 2,4-D present in the commercial
 176 store (Aminol 806), diluted in water (Table 1).

177 Table 1. Calibration curve data for the 2,4-D standard at concentrations of 2; 4; 8; 10 and 12 mg.L⁻¹. Determination
 178 coefficient (R^2), Relative Standard Deviation (RSD), limit of quantification (LOQ), Limit of Detection (LOD),
 179 Solid phase Extraction (SPE)

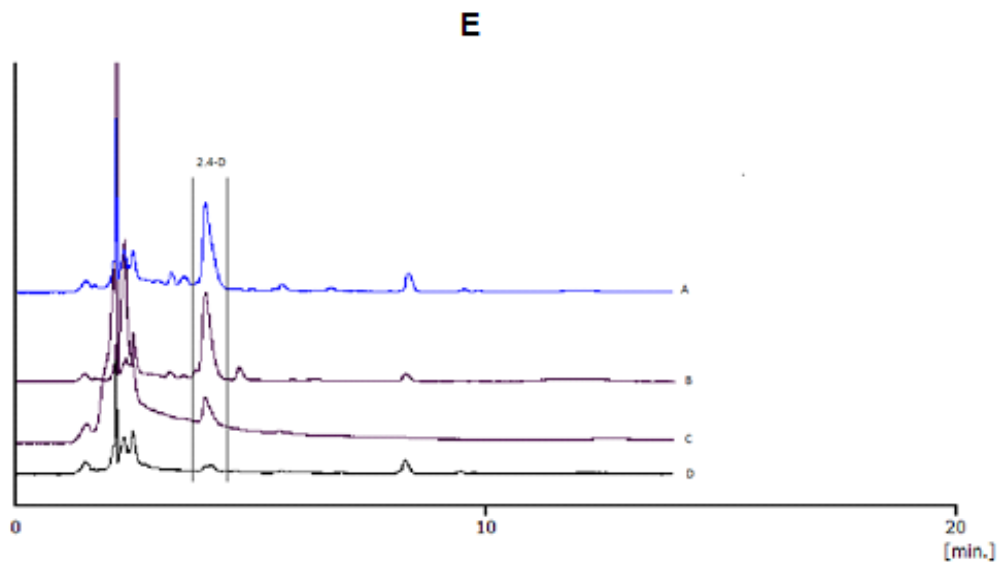
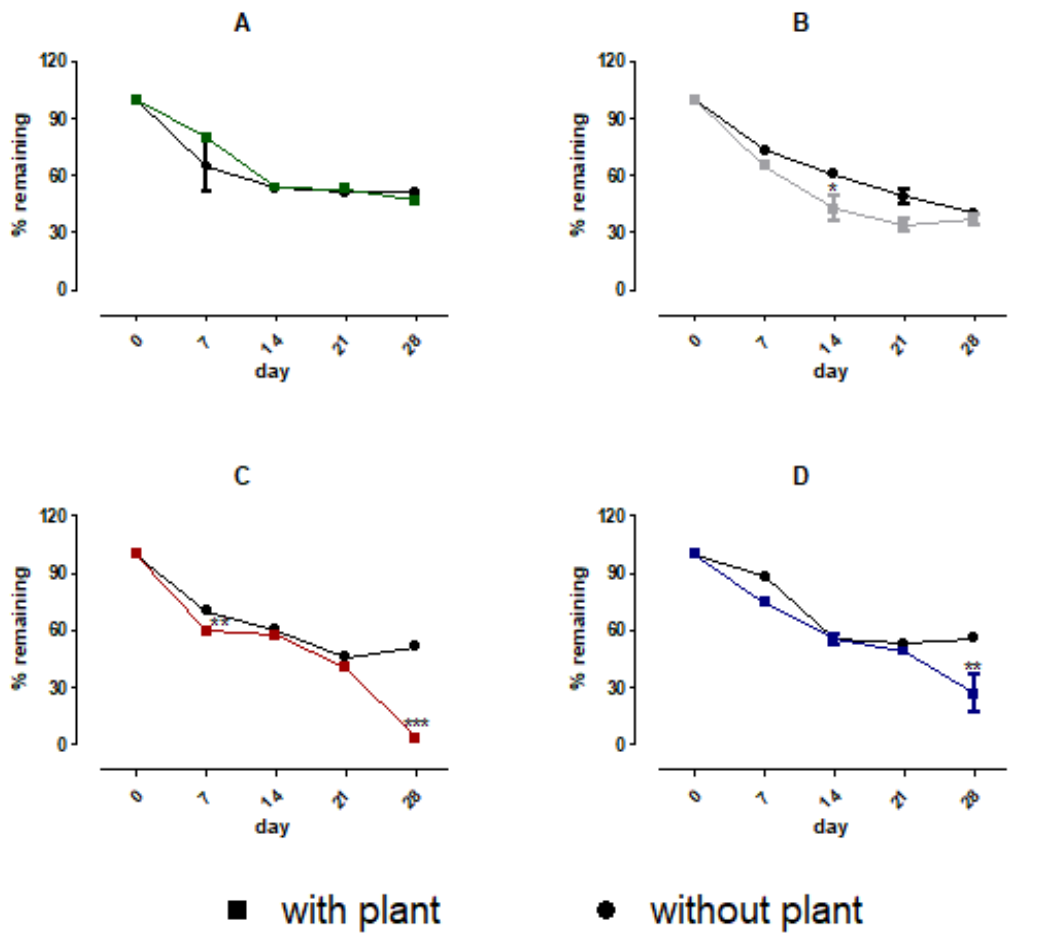
Parameter	2,4-D
Average retention time	4.530 min. \pm 0.003 min.
Linear range	2.0 mg.L ⁻¹ – 12.0 mg.L ⁻¹
Line equation: $y = ax + b$	$y = 40.852x - 23.167$
R^2	0.9926

RSD	1.74%
LOD	0.075 mg.L ⁻¹
LOQ	0.227 mg.L ⁻¹
SPE recovery ± % RSD	76.57% ± 1.98%

180 The average retention time of the herbicide was approximately 4.53 minutes; however, the
 181 method was adjusted up to 17 minutes to establish the initial conditions, due to the interferences
 182 of the real samples (phytoremediation treatment and phytoremediation control), detected in the
 183 retention time. approximately 10 - 13 minutes. Regarding the correlation coefficient (R^2)
 184 obtained (0.9926), it fits within the recommended by ANVISA (≥ 0.99) and INMETRO (≥ 0.90)
 185 (RIBANI et al. 2004). The RSD was approximately 1.74%, within the recommended by AOAC
 186 (Association of Official Agricultural Chemists) according to the linear working range used
 187 (INMETRO, 2016). The values of LOD and LOQ obtained were 0.075 mg.L⁻¹ and 0.227 mg.L⁻¹
 188 ¹, respectively. These data are below the values found in the chromatographic analyzes
 189 performed in this work, which showed the efficiency of the method developed. The SPE
 190 extraction method showed an approximate recovery of $76.57 \pm 1.98\%$, this value fits within the
 191 acceptable recovery parameters (from 70% to 120%) (Ribani et al., 2004).

192 *3.2 Phytoremediation and the influence of photostimulation with LEDs*

193 Figure 2 shows the percentage of decay of the 2,4-D concentration of all treatments. Each graph
 194 illustrates the corresponding 2,4-D degradation of each LED and in the treatment in natural
 195 light in collections performed at 0, 7, 14, 21, and 28 days.



196

197 Figure 2. Percentage of 2,4-D concentration in phytoremediation treatments and auto-degradation controls in
 198 natural light groups (A), white LED (B), red LED (C), blue LED (D) during 28 days of treatment. Figure (E) shows
 199 the overlapping of the chromatograms of the phytoremediation groups with natural light (a), white LED light (b);

200 blue LED light (c) and red LED light (d). Results expressed as mean \pm SD. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$
201 (***) represent a significant difference in relation to phytoremediation groups with their respective natural
202 degradation controls for the same collection day.

203 According to the results of Figure 2 A, the degradation of 2,4-D in the treatment with natural
204 light provided the lowest rate of decrease of 2,4-D. After 28 days, $47.0\% \pm 1.2\%$ of the residual
205 concentration of the pesticide in the treatment water was detected. However, the natural
206 degradation control contained $51.5\% \pm 0.2\%$ of the herbicide in the same 28 days of collection
207 and with no statistically significant difference. This data is not in line with expectations, as
208 Ramborger et al. (2017) obtained a significant reduction in the concentration of 2,4-D in water
209 in the phytoremediation treatment in 30 days with *P. neochilus*, with approximately 63% of the
210 herbicide initially added in the phytoremediation treatment, while the control remained with
211 more than 80%. This difference with the data obtained in the present study may be due to the
212 conditions in which the experiments were conducted, Ramborger et al (2017) conducted their
213 experiment in a greenhouse, with the incidence of sunlight and uncontrolled temperature and in
214 the present study, these conditions were controlled.

215 We observed that 2,4-D showed a similar and linear degradation in all groups up to 14 days,
216 after that, when comparing the results of the other groups (Figure 2 B, C, and D), the importance
217 of the use of LEDs for phytoremediation treatment, as the treatments with the different lights
218 showed a significant difference in a certain period, in addition to a drastic reduction in the
219 concentration of the herbicide, mainly with the red and blue LEDs on the 28th, while the other
220 groups (of all treatments) showed stabilization of the 2,4-D concentration from 14 to 28 days.

221 Although the treatment with white LED provided a significantly lower concentration of 2,4-D
222 in its phytoremediation group, we obtained a higher final concentration (in 28 days), than those
223 found with the other LED treatments, where 37.1% was detected $\pm 1.2\%$ of the pesticide after
224 28 days (Figure 2 B). In addition, the white LED did not show any significant difference in

225 relation to its control ($40.1\% \pm 0.7\%$). However, the use of photostimulus with white LED light
226 was better when compared to phytoremediation with ambient light because on the 14th day the
227 reduction in the concentration of the herbicide was significantly less than that of its natural
228 degradation control (without plant).

229 The treatment with red LED light (Figure 2C) also contributed to the increase in
230 phytoremediation of 2,4-D by *P. neochilus* since in just 7 days there was a reduction to 59.36%
231 $\pm 0.23\%$ of the 2,4-D, while its respective control remained at $70.33\% \pm 2.02\%$ detection of
232 the herbicide. The most interesting thing about the use of the red LED is that this difference
233 was even more pronounced until 28 days, where the plants that received the photo stimulus
234 reduced the amount of the pesticide to $3.33\% \pm 0.92$, while its control remained at $51.14\% \pm$
235 0.44% . The treatment with photostimulation with the blue LED (figure 2 D) also contributed to
236 the efficiency of *P. neochilus* phytoremediation, since in 28 days it was able to help reduce the
237 percentage of 2,4-D to $26.77\% \pm 9.47\%$, while control remained at $55.85\% \pm 0.76\%$. All of
238 these results can best be seen in the chromatogram in Figure 2 E, which shows the decrease in
239 herbicide concentration on day 28 for all lights.

240 2,4-D has a longer half-life in water than in soil, however, there is a greater number of studies
241 with an interest in the degradation of this herbicide in soil (BARBA et al. 2020; GIRARDI et
242 al., 2013; GÓNGORA-ECHEVERRÍA et al., 2019). Roberts et al. (1998) found variations in
243 the half-life of 2,4-D between 6.4 and 8.3 days in the soil. This is probably due to
244 microorganisms present in the soil that easily degrade the acid form of 2,4-D, as well as the
245 amine and ester groups (COLEMAN et al., 2002). Regarding studies with 2,4-D in water,
246 Ramborger et al (2017) detected the herbicide 60 days after the start of phytoremediation
247 treatment in water, making it more important to find and/or improve techniques aiming at its
248 degradation in Water. Rosa et al. (2013) obtained approximately 41% removal of the herbicide
249 as the use of water lettuce (*Lactuca sativa*) in 14 days, however, no study performed a photo

250 stimulus to improve the phytoremediation of 2,4-D. In this perspective, what is found in the
251 literature are more complex techniques, with the use of reagents, or even with the use of
252 radiation for the degradation of 2,4-D. Imoberdorf and Mohseni (2010) used vacuum UV
253 radiation (VUV) to efficiently degrade different concentrations of 2,4-D in approximately 20
254 minutes. However, there was a reduction in yield due to the complexity of the matrix (organic
255 carbons, alkalinity, and H₂O₂). Forti et al. (2020) observed that anodic oxidation with the
256 addition of Fenton's reagent and irradiation using UV light reached 100% degradation of the
257 herbicide, while the separate processes reached less than 50%. Adak et al. (2019) used UV at
258 253 nm with and without H₂O₂, testing different variables during the advanced oxidation
259 process such as fluency, H₂O₂ dose, pH, alkalinity, nitrate concentration, and ionic strength,
260 obtaining more than 97% degradation of the herbicide in a short time. Sandeep et al. (2018)
261 obtained 96% and 83% of 2,4-D photodegradation using UV light (~ 265 nm) and sunlight,
262 respectively, in addition to TiO₂ photocatalyst nanomaterials synthesized by a hydrothermal
263 method. Other studies also bring 2,4-D degradation techniques using microbial degradation
264 (Girardi et al. 2013), Fenton-type reaction or photo-Fenton (CHEN. et al., 2015; FORTI et al.,
265 2020; GONZÁLEZ et al. 2018), adsorption (ANIRUDHAN and MANADAN-ANJU. 2019;
266 HAN et al. 2010; KUŚMIEREK et al. 2016), oxidation (CAI et al. 2018), electrochemical
267 oxidation (GAO et al., 2009) and photoelectrochemical degradation (XU et al. 2020). These
268 works have in common a high amount of reagents and/or materials of high cost for their
269 execution and high complexity of structures. In this sense, our work sought to use a cheap
270 technique, of easy execution, possible adaptation in locu, without the addition of reagents, and
271 mainly, characterized as a green technique for the degradation of 2,4-D.

272 Regarding the concentration of 2,4-D used in this study, it is observed that it is twice that
273 recommended for application in the main cultures, in addition to having used the commercial
274 formulation (Aminol 806, Adama). We assume that high concentrations like this would

275 probably not be found in surface or groundwater due to runoff, leaching, or drift, except for
 276 some environmental accident. With this in mind, the concentration used in this work is
 277 relatively high and the results obtained with *P. neochilus* showed that this plant is capable of
 278 remedying the herbicide and, its phytoremediation potential increased with the red and blue
 279 photo stimulus, being able to minimize the environmental impact caused by the herbicide in the
 280 short term.

281 3.3 Dissipation of the 2,4-D herbicide by *P. neochilus* in association with photostimulation

282 The data for herbicide dissipation kinetics in water for controls and treatments are shown in
 283 Table 2 and Figure 3. Dissipation was verified through the constant k and the half-life time ($t_{1/2}$)
 284 that were obtained from the slope of the curve, relating the \ln of concentration versus time.
 285 The correlation coefficients varied between 0.7221 and 0.9531, suggesting a pseudo 1st order
 286 behavior.

287 Table 2. Dissipation kinetics of the 2,4-D herbicide by *P. neochilus*.

Ligth	Equation	Reaction order	$K/(\text{days})^{-1}$	$t_{(1/2)}$ (days)	R^2
natural without plant	$y = -0.0223x + 0.1544$	Pseudo 1°	0.0223	31.08	0.7539
natural light with plant	$y = -0.0274x + 0.2566$	Pseudo 1°	0.0274	25.30	0.9008
White without Plant	$y = -0.0318x + 0.2793$	Pseudo 1°	0.0318	21.80	0.9911
White with plant	$y = -0.0376x + 0.1783$	Pseudo 1°	0.0376	18.43	0.8565
Red without Plant	$y = -0.0253x + 0.232$	Pseudo 1°	0.0318	27.40	0.8383
Red with plant	$y = -0.1028x + 0.6803$	Pseudo 1°	0.1028	6.74	0.7221
Blue without Plant	$y = -0.0239x + 0.2713$	Pseudo 1°	0.0239	29.00	0.7853

Blue with Plant

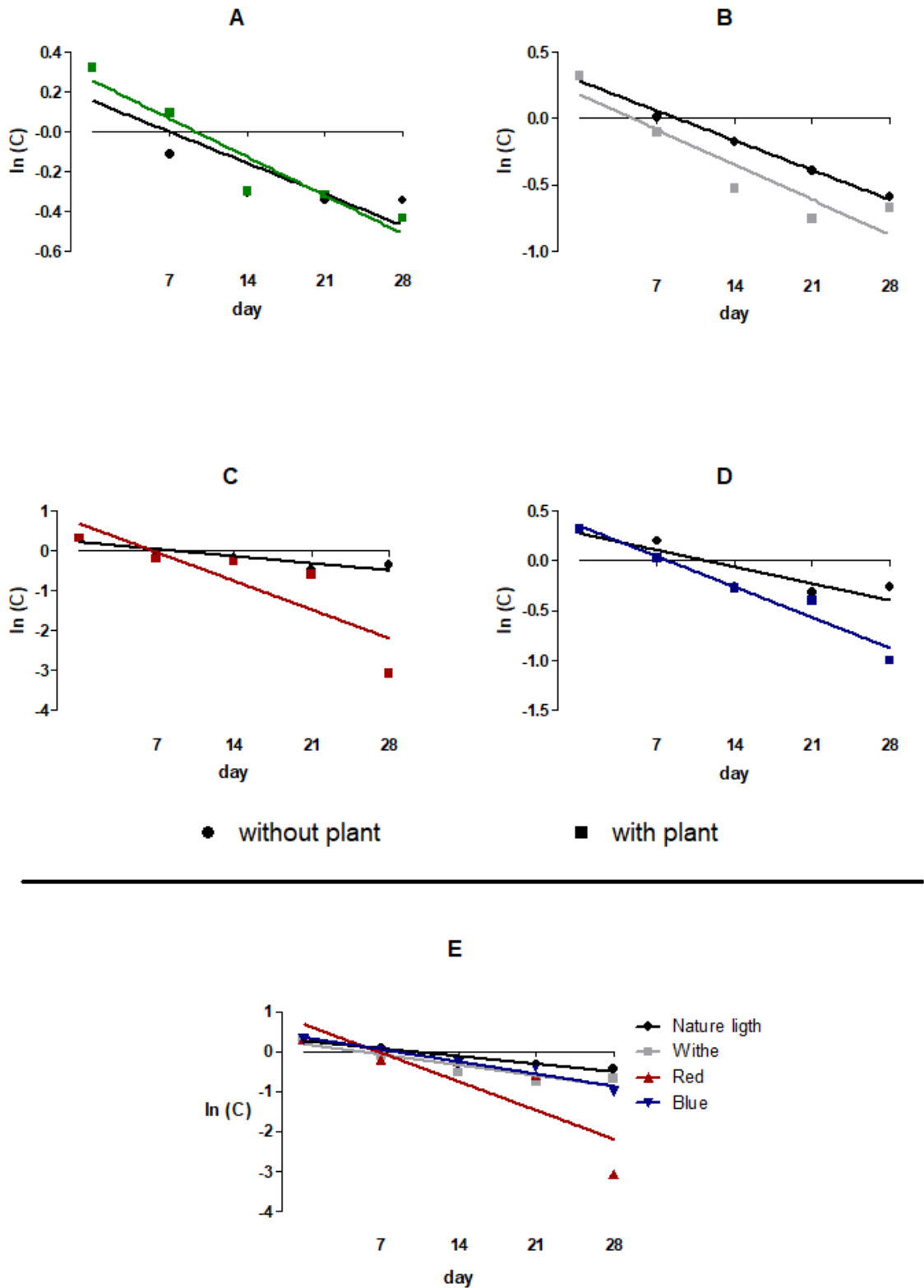
$$y = -0.0437x + 0.3478$$

Pseudo 1°

0.1028

15.86

0.9531



288

289 Figure 3. Graph of the rate of pseudo 1st order for the dissipation of 2,4-D by *P. neochilus* in phytoremediation
 290 treatments and in natural degradation controls. Natural light (A), white LED light (B), red (C), and blue (D), for
 291 28 days. The graphics are at different scales.

292 Dissipation analysis has been used previously in studies of pesticide residues (DEORE et al.
293 2008; ESCOTO et al. 2019; GÓNGORA-ECHEVERRÍA et al 2019), however, there are no
294 studies that demonstrate the dissipation behavior of 2,4 -D in water due to the influence of
295 phytoremediation with *P. neochilus* or another plant in association with the LED photo
296 stimulus.

297 The half-life ($t_{1/2}$) of 2,4-D in aerobic aquatic environments is approximately 15 days
298 (GERVAIS et al. 2008). However, in the present study, the degradation controls (without plant)
299 showed that 2,4-D had a half-life between 31 to 21 days (Table 2). Phytoremediation treatments
300 (with plant), for natural light and white LED light, did not make the 2,4-D phytoremediation by
301 *P. neochilus* more efficient because their $t_{1/2}$ values were 25.3 days and 18.43 days, respectively,
302 while their controls (without plant) were 31.08 and 21.80, respectively (Table 2 and Figures 3
303 A and 3 B). The difference in the dissipation of the herbicide was more accentuated in the
304 treatments with the photoestimulus of the red LED light, where it was obtained a reduction from
305 $t_{1/2}$ to 6.74 in days, while its control stayed with $t_{1/2}$ of 27.4 days (Table 2, figure 3 C). The
306 phytoremediation treatment with blue LED light also showed a reduction in $t_{1/2}$ (15.56 days),
307 while its control remained close to the others ($t_{1/2}$ of 29 days) (Table 2, Figures 3 C and 3 D).
308 Thus, the data from treatments with red and blue LEDs showed a reduction in $t_{1/2}$ of
309 approximately 70% (red LED treatment) and 50% (blue LED treatment) when compared to $t_{1/2}$
310 of their respective controls. This increase in the dissipation of the treatments with red and blue
311 LED light, as well as the other treatments, can be better visualized in figure 3 AND which
312 presented the following dissipation order: LED red > blue > white > natural. Therefore, according
313 to the results obtained, it was possible to observe efficiency in phytoremediation with the
314 association of the photo stimulus, mainly in the red and blue LED lights.

315 The explanation for this fact stems from the role of light in the metabolism of plants. Among
316 the parameters that alter the metabolism of vegetables (temperature, pH, the variation of organic

317 matter, salinity, humidity) (DHIR et al., 2009; RAI, 2009; SUSARLA et al., 2002), light is an
318 essential factor for plant health, as it can influence primary metabolism and, consequently,
319 secondary metabolism. Changes can occur at the enzymatic level, resulting in the variation of
320 the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (G-POD), and
321 the enzymes ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR),
322 monodeshydroascorbate reductase (MDHAR) and glutathione reductase (GR) (SHOHAEL et
323 al. 2006) which are the most efficient defense mechanisms of plants (MITTLER. 2002). The
324 light still plays an important role in the production of secondary metabolites, responsible for
325 antioxidant defense in several plant species. The consequence of the incidence of different
326 colors of light in the production of secondary metabolites directly influences the biosynthesis
327 or degradation of these metabolites and, consequently, the antioxidant activity of their
328 metabolism (AHMAD et. Al 2014; FAZAL et al. 2016; NADEEM et al. 2019). Due to the fact
329 that 2,4-D was found to decrease antioxidant activity in *P. neochilus* (RAMBORGER et al.,
330 2017), due to the increase in reactive species it causes (GROSSMAN, 2010), we believe that
331 treatments with LEDs have contributed to the increase of protections against this oxidative
332 stress. Therefore, the use of LEDs was able to influence plant metabolism, which allowed a
333 high efficiency in phytoremediation by *P. neochilus*.

334 **4. Conclusion**

335 In this work, a chromatographic method by HPLC-DAD was developed and validated for the
336 detection and quantification of the herbicide 2,4-D in water within the recommended analytical
337 parameters. Through this analytical method, it was possible to evaluate the efficiency of the
338 phytoremediation technique in association with the use of LEDs in 28 days. The data obtained
339 showed that the group that received only natural light did not obtain satisfactory results in this
340 period of 28 days. However, phytoremediation efficiency in association with LEDs to degrade
341 2,4-D increased in the following sequence: white (62.99% degradation) <blue (73.22%

342 degradation) <red (96.67 % degradation). These results were confirmed by the analysis of the
343 2,4-D dissipation rate for each group in their respective light. Therefore, the use of LED
344 technology, especially the red LED, in association with *P. neochilus*, promoted the best rate of
345 decrease of 2,4-D in water.

346 **5. Acknowledgments**

347 We thank the Federal University of Pampa (UNIPAMPA) for the possibility of developing this
348 research, CAPES for the material and financial support, and the company Adama for the
349 donation of the commercial pesticide. This study was financed in part by the Coordenação de
350 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

351 **6. References**

352

353 Adak, A., Das, I., Mondal, B., Koner, S., Datta, P., Blaney, L., 2019. Degradation of 2, 4-
354 dichlorophenoxyacetic acid by UV 253.7 and UV-H₂O₂: Reaction kinetics and effects of
355 interfering substances. *Emerging Contaminants*. 5, 53-60.

356 <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2019.02.004>

357 ADAMA. Bula Aminol® 806. **ADAMA Brasil S/A. 2016. Disponível em:** <
358 <https://www.adama.com/documents/407112/415700/Aminol%C2%AE+806+-+Bula>>. Último
359 acesso em abril de 2020.

360 AHMAD, N., Abbasi, B. H., Fazal, H., Khan, M. A., Afridi, M. S., 2014. Effect of reverse
361 photoperiod on in vitro regeneration and piperine production in *Piper nigrum* L. *Comptes*
362 *rendus biologiques*. 337, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2013.10.011>

363 Barba, S., Villaseñor, J., Rodrigo, M. A., Cañizares, P., 2020. Biostimulation versus
364 bioaugmentation for the electro-bioremediation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid polluted

- 365 soils. Journal of Environmental Management. 277, 111424.
366 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111424>
- 367 Bula Aminol 806.
368 http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/aminol_806.pdf
369 acessado em maio de 2020.
- 370 *ASCOM/SEAPDR*. Secretaria da Agricultura apresenta propostas para utilização do herbicida
371 2,4-D. Governo do estado do Rio Grande do Sul. 2019. Disponível em:<
372 [https://www.estado.rs.gov.br/agricultura-apresenta-propostas-para-uso-do-herbicida-2-4-d-no-](https://www.estado.rs.gov.br/agricultura-apresenta-propostas-para-uso-do-herbicida-2-4-d-no-rio-grande-do-sul)
373 [rio-grande-do-sul](https://www.estado.rs.gov.br/agricultura-apresenta-propostas-para-uso-do-herbicida-2-4-d-no-rio-grande-do-sul).> Último acesso em maio de 2019.
- 374 Bunzel, K., Liess, M., Kattwinkel, M., 2014. Landscape parameters driving aquatic pesticide
375 exposure and effects. Environmental Pollution. 186, 90–97.
376 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.021>
- 377 CHEN, H., Zhang, Z. Z., Yang, Z., Yang, Q., Li, B., Bai, Z., 2015. Heterogeneous fenton-like
378 catalytic degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in water with FeS. Chemical
379 Engineering Journal. 273, 481-489. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.079>
- 380 CAI, J., Zhou, M., Yang, W., Pan, Y., Lu, X., Serrano, K. G., 2018. Degradation and mechanism
381 of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) by thermally activated persulfate oxidation.
382 Chemosphere. 212, 784-793. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.127>
- 383 CAI, J., Zhou, M., Pan, Y., Lu, X., 2020. Degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid by
384 anodic oxidation and electro-Fenton using BDD anode: Influencing factors and mechanism.
385 Separation and Purification Technology. 230, 115867.
386 <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115867>

- 387 Caldas, S. S., Demoliner, A., Costa, F. P., D'Oca, M. G. M., Pimentel, E. G., 2010. Pesticide
388 residue determination in groundwater using solid-phase extraction and high-performance liquid
389 chromatography with diode array detector and liquid chromatography-tandem mass
390 spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 21, 642-650.
391 <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000400009>.
- 392 Coleman, J. O. D., Frova, C., Schroder, P., Tissut, M., 2002 Exploiting plant metabolism for
393 the phytoremediation of persistent herbicides. *Environmental Science and Pollution Research*.
394 9, 18. [10.1007/BF02987314](https://doi.org/10.1007/BF02987314)
- 395 Mariano, D. C., Okumura, R. S., 2012. < b> Aspectos Agronômicos, Uso pelo Homem e
396 Mecanismos da Fitorremediação: uma revisão. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*. 5,
397 2. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2012v5n2%20Especialp%25p>.
- 398 Deore, B. V., Patil, C. S., Saindane Y. S., Landge, S. A., 2018. Dissipation and persistence of
399 acephate, triazophos and profenophos in/on brinjal. *Journal of Pharmacognosy and*
400 *Phytochemistry*. 7, 1528-1531.
401 <https://www.phytojournal.com/archives/?year=2018&vol=7&issue=2&ArticleId=3596>
- 402 Coleman, J. O. D., Frova, C., Schröder, P., Tissut, M., 2002. Exploiting plant metabolism for
403 the phytoremediation of persistent herbicides. *Environ. Sci. Pollut.* 18-28,
404 [10.1007/BF02987314](https://doi.org/10.1007/BF02987314)
- 405 Dehghani, M., Nasser, S., Karamimanesh, M., 2014. Removal of 2,4-Dichlorophenoxyacetic
406 acid (2,4-D) herbicide in the aqueous phase using modified granular activated carbon. *J Environ*
407 *Health Sci Eng.* [10.1186/2052-336X-12-28](https://doi.org/10.1186/2052-336X-12-28)

- 408 Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P. P., 2009. Potential of aquatic macrophytes for removing
409 contaminants from the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and*
410 *Technology*. 39, 754-781. <https://doi.org/10.1080/10643380801977776>
- 411 Dosnon-Olette, R., Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Eullaffroy, P., 2010. Fungicides and
412 herbicide removal in *Scenedesmus* cell suspensions. *Chemosphere*, 79, 117-
413 123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.005>
- 414 Ebrahimbabaie, P., Meeinkuirt, W., Pichtel, J., 2020. Phytoremediation of engineered
415 nanoparticles using aquatic plants: Mechanisms and practical feasibility. *Journal of*
416 *Environmental Sciences*. 93, 151-163. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.03.034>
- 417 Eevers, N., White, J. C., Vangronsveld, J., Weyens, N., 2017. *Bio- and Phytoremediation of*
418 *Pesticide-Contaminated Environments. Advances in Botanical Research*. 83, 277–318.
419 <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.01.001>
- 420 Egan, J. F., Barlow, K. M., Mortensen, D. A., 2014. A meta-analysis on the effects of 2,4-D
421 and dicamba drift on soybean and cotton. *Weed Science*. 62, 193-206.
422 <https://doi.org/10.1614/WS-D-13-00025.1>
- 423 Escoto, D. F., Gayer, M. C., Bianchini, M. C., Pereira, G. C., Roehrs, R., Denardin, E. L. G.,
424 2019. Use of *Pistia stratiotes* for phytoremediation of water resources contaminated by
425 clomazone. *Chemosphere*. 227, 299-304. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.013>
- 426 Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N., Ali, S. S., Akbar, F., Kanwal, F., 2016. Correlation of
427 different spectral lights with biomass accumulation and production of antioxidant secondary
428 metabolites in callus cultures of medicinally important *Prunella vulgaris* L. *Journal of*
429 *Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 159, 1-7.
430 <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.008>

- 431 Forti, J. C., Loretto, G. H., Tadayozzi, Y. S., De Andrade, A. R., 2020. A phytotoxicity
432 assessment of the efficiency 2, 4-D degradation by different oxidative processes. Journal of
433 Environmental Management. 266, 110588. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110588>
- 434 Gao, J., Zhao, G., Liu, M., Li, D., 2009. Mechanism of Enhanced Electrochemical Oxidation of
435 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid with in situ Microwave Activated Boron-doped Diamond and
436 Platinum Anodes. The Journal of Physical Chemistry A. 113, 10466-10473.
437 <https://doi.org/10.1021/jp9057675>
- 438 Colussi, J., 2019. Após adoção de normas no RS, aplicações do herbicida 2,4-D tem 22 casos
439 suspeitos de deriva. **Gauchazh**. Porto alegre. Disponível em:
440 <[https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2019/11/apos-adocao-de-](https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2019/11/apos-adocao-de-normas-no-rs-aplicacao-do-herbicida-24-d-tem-22-casos-de-suspeita-de-deriva-ck2f6r7200bma01r2ij12ozl5.html)
441 [normas-no-rs-aplicacao-do-herbicida-24-d-tem-22-casos-de-suspeita-de-deriva-](https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2019/11/apos-adocao-de-normas-no-rs-aplicacao-do-herbicida-24-d-tem-22-casos-de-suspeita-de-deriva-ck2f6r7200bma01r2ij12ozl5.html)
442 [ck2f6r7200bma01r2ij12ozl5.html](https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2019/11/apos-adocao-de-normas-no-rs-aplicacao-do-herbicida-24-d-tem-22-casos-de-suspeita-de-deriva-ck2f6r7200bma01r2ij12ozl5.html)>. Acesso em maio/2020.
- 443 Gervais, J., Luukinen, B., Buhl, K., Stone, D., 2008. 2,4-D Technical Fact Sheet; National
444 Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. Último acesso em
445 maio de 2020. Disponível em; <<http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html>>.
- 446 Gent, M. P. N., White, J. C., Parrish, Z. D., Isleyen, M., Eitzer, B. D., Mattina, M. I., 2007.
447 Uptake and translocation of p,p0 -dichlorodiphenyldichloroethylene supplied in hydroponics
448 solution to Cucurbita. Environmental Toxicology and Chemistry. 26, 2467 e
449 2475. <https://doi.org/10.1897/06-257.1>
- 450 Girardi, C., Nowak, K. M., Carranza-Diaz, O., Lewkow, B., Miltner, A., Gehre, M., Schäffer,
451 A., Kästner, M., 2018. Microbial degradation of the pharmaceutical ibuprofen and the herbicide
452 2, 4-D in water and soil—use and limits of data obtained from aqueous systems for predicting
453 their fate in soil. Science of the total environment. 444, 32-42. 10.1016/j.scitotenv.2012.11.051

- 454 González, G. C., Julcour, C., Chaumat, H., Jáuregui-Haza, U., Delmas, H., 2018. Degradation
455 of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid by photolysis and photo-Fenton oxidation. Journal of
456 environmental chemical engineering. 6, 874-882. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.049>
- 457 Góngora-Echeverría, V. R., Martin-Laurent, F., Quintal-Franco, C., Lorenzo-Flores, A.,
458 Giacomán-Vallejos, G., Ponce-Caballero, C., 2019. Dissipation and Adsorption of 2, 4-D,
459 Atrazine, Diazinon, and Glyphosate in an Agricultural Soil from Yucatan State, Mexico. Water,
460 Air, & Soil Pollution. 230, 131. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4177-y>
- 461 Glozier, N. E., Struges, J., Cessna, A. J., Gledhill, M., Rondeau, M., Ernst, W. R., Sekela, M.
462 A., Cagampan, S. J., Sverko, E., Murphy, C., Murray, J. L., Donald, D. B., 2012. Occurrence
463 of glyphosate and acidic herbicides in select urban rivers and streams in Canada, 2007.
464 Environmental Science and Pollution Research. 19, 821-834. [https://doi.org/10.1007/s11356-](https://doi.org/10.1007/s11356-011-0600-7)
465 [011-0600-7](https://doi.org/10.1007/s11356-011-0600-7)
- 466 Grossmann, K., 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. Pest
467 Management Science. 66, 113-120. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.1860>
- 468 Han, D., Jia, W., Liang, H., 2010. Selective removal of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid from
469 water by molecularly-imprinted amino-functionalized silica gel sorbent. Journal of
470 Environmental Sciences. 22, 237-241. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60099-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60099-1).
- 471 Hatzios, K. K., 1991. Biotransformations of herbicides in higher plants. Pages 141-185 in R.
472 Grover and M. Fich, eds. Environmental Chemistry of Herbicides, Vol. II. Boca Raton, FL:
473 CRC
- 474 Imoberdorf, G., Mohseni, M., 2012. Kinetic study and modeling of the vacuum-UV
475 photoinduced degradation of 2, 4-D. Chemical engineering journal. 187, 114-122.
476 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.107>.

- 477 KUŚMIEREK, K., Szala, M., Światkowski, A., 2016. Adsorption of 2, 4-dichlorophenol and
478 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid from aqueous solutions on carbonaceous materials obtained by
479 combustion synthesis. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* 63, 371-378.
480 <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.03.036>
- 481 INMETRO, INDEMNEQ. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **DOQ-CGCRE-**
482 **008**, 2016. Disponível em: <[https://www4.inmetro.gov.br/busca-](https://www4.inmetro.gov.br/busca-google/?q=valida%C3%A7%C3%A3o%20de%20m%C3%A9todos%20anal%C3%ADticos)
483 [google/?q=valida%C3%A7%C3%A3o%20de%20m%C3%A9todos%20anal%C3%ADticos](https://www4.inmetro.gov.br/busca-google/?q=valida%C3%A7%C3%A3o%20de%20m%C3%A9todos%20anal%C3%ADticos)>.
484 Último acesso em: abril de 2020.
- 485 Ly, T-K., Ho, T-D., Behra, P., Nhu-Trang, T-T., 2020. Determination of 400 pesticide residues
486 in green tea leaves by UPLC-MS/MS and GC-MS/MS combined with QuEChERS extraction
487 and mixed-mode SPE clean-up method. *Food chemistry.* 326, 126928.
488 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126928>
- 489 Li, S., Feng, F., Chen, S., Zhang, X., Liang, Y., Shan, S., 2020. Preparation of UiO-66-NH₂
490 and UiO-66-NH₂/sponge for adsorption of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in water.
491 *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 194, 110440.
492 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110440>
- 493 Lam, S-M., Sin, J-C., Abdullah, A. Z., Mohamed, A. R., 2015. Sunlight responsive WO₃/ZnO
494 nanorods for photocatalytic degradation and mineralization of chlorinated phenoxyacetic acid
495 herbicides in water. *Journal of colloid and interface science.* 450, 34-44.
496 <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.02.075>
- 497 Luo, J., Cao, M., Zhang, C., Wu, J., Gu, X. S., 2020. The influence of light combination on the
498 physicochemical characteristics and enzymatic activity of soil with multi-metal pollution in
499 phytoremediation. *Journal of Hazardous Materials.* 393, 122406.
500 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122406>

- 501 Anirudhan, T. S., Anju, S. M., 2019. Synthesis and evaluation of TiO₂ nanotubes/silylated
502 graphene oxide-based molecularly imprinted polymer for the selective adsorption and
503 subsequent photocatalytic degradation of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid. Journal of
504 Environmental Chemical Engineering. 7, 103355. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103355>
- 505 Mandelbaum, R. T., Allan, D. L., Wackett, L. P. (1995). Isolation and characterization of a
506 *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. Applied and Environmental
507 Microbiology, 61(4), 1451-1457. [10.1128 / aem.61.4.1451-1457.1995](https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1451-1457.1995)
- 508 Mariano, D. C., Okumura, R. S., 2012. Aspectos Agronômicos, Uso pelo Homem e
509 Mecanismos da Fitorremediação: uma revisão. RAMA. 5, 85-101.
510 <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2012v5n2%20Especialp%25p>
- 511 Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science.
512 7, 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- 513 Mitton, F. M., Gonzalez, M., Monserrat, J. M., Miglioranza, K. S., 2018. DDTs-induced
514 antioxidant responses in plants and their influence on phytoremediation process. Ecotoxicology
515 and environmental safety. 147, 151-156. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.037>
- 516 Morau, D., Libelle, T., Garde, F., 2012. Performance evaluation of green roof for thermal
517 protection of buildings in Reunion Island. Energy Procedia. 14, 1008 – 1016.
518 <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.12.1047>
- 519 Nadeem, M., Abbasi, B. H., Younas, M., Ahmad, W., Zahir, A., Hano, C., 2019. LED-enhanced
520 biosynthesis of biologically active ingredients in callus cultures of *Ocimum basilicum*. Journal
521 of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 190, 172-178.
522 <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.09.011>

- 523 Pooley, E. A., 1998. A field guide to wild flowers of KwaZulu-Natal and the eastern region.
524 Natal Flora Publications Trust, Durban.
- 525 Popp, J., Pető, K., Nagy, J., 2013. Impact of Pesticide Productivity on Food Security.
526 Sustainable Agriculture Reviews. 13, 19–33. doi:10.1007/978-3-319-00915-5_2
- 527 Rai, P. K., 2009. Heavy Metal Phytoremediation from Aquatic Ecosystems with Special
528 Reference to Macrophytes. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 39,
529 697-753. <https://doi.org/10.1080/10643380801910058>
- 530 Ramborger, B. P., Gularte, C. A. O., Rodrigues, D. T., Gayer, M. C., Carriço, M. R. S.,
531 Bianchini, M. C., Puntel, R. L., Denardin, E. L. G., Roehrs, R., 2017. The phytoremediation
532 potential of *Plectranthus neochilus* on 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and the role of
533 antioxidant capacity in herbicide tolerance. Chemosphere. 188, 231-240.
534 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.164>
- 535 Ramborger, B. P., Paz, M. E. G., Denardin, E. L. G., Soares, J. J., Roehrs, R., 2020 a. A review
536 of anatomical, physiological, biological characteristics and uses of *Plectranthus neochilus*.
537 Ciência e natura. 42. <https://doi.org/10.5902/2179460X40157>.
- 538 Ramborger, B. P., Paz, M. E. G., Kieling, K. M. C., Carriço, M. R. S., Gollino, G. P., Costa,
539 M. T., Ribeiro, V. B., Folmer, V., Denardin, E. L. G., Soares, J. J., Roehrs, R., 2020 b.
540 Toxicological parameters of aqueous residue after using *Plectranthus neochilus* for 2,4-D
541 phytoremediation. Chemosphere. 128638.
542 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128638>.
- 543 Rosa, A. S., 2013. Fitorremediação de pesticidas utilizados em lavouras de arroz através do
544 cultivo hidropônico de alface (*Lactuca sativa* L.). <http://dspace.unipampa.edu.br/handle/rii/285>

- 545 Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., Melo, L. F. C., 2004. Validação
546 em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química nova*. 27, 771-780.
547 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- 548 Rostami, S., Azhdarpoor, A., 2019. The application of plant growth regulators to improve
549 phytoremediation of contaminated soils: A review. *Chemosphere*. 220, 818-827.
550 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.203>
- 551 Roberts, M. C., Croucher, L., 2007. Metabolic pathways of agrochemicals: part 1: herbicides
552 and plant growth regulators. Royal Society of Chemistry.
553 <https://pubs.rsc.org/en/content/ebook/978-0-85404-494-8>
- 554 Sandeep, S., Nagashree, K. L., Maiyalagan, T., Keerthiga, G., 2018. Photocatalytic degradation
555 of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-A comparative study in hydrothermal TiO₂ and commercial
556 TiO₂. *Applied Surface Science*. 449, 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.02.051>
- 557 Shohael, A. M., Ali, M. B., Yu, K. W., Hahn, E. J., Islam, R., Paek, K. Y., 2006. Effect of light
558 on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in
559 *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. *Process Biochemistry*. 41, 1179-
560 1185. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.015>
- 561 Suchahyo, D., van Straalen, N. M., Krave, A., van Gestel, C. A. M., 2008. Acute toxicity of
562 pesticides to the tropical freshwater shrimp *Caridina laevis*. *Ecotoxicology and Environmental*
563 *Safety*. 69, 421-427. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.06.003>
- 564 Susarla, S., Medina, V. F., McCutcheon, S. C., 2002. Phytoremediation: an ecological solution
565 to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*. 18, 647-658.
566 [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(02\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(02)00026-5)

- 567 Xu, X., Cai, J., Zhou, M., Du, X., Zhang, Y., 2020. Photoelectrochemical degradation of 2, 4-
568 dichlorophenoxyacetic acid using electrochemically self-doped Blue TiO₂ nanotube arrays
569 with formic acid as electrolyte. *Journal of hazardous materials*. 382, 121096.
570 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121096>
- 571 Wang, J., Wang, J., Liu, J., Li, J., Zhou, L., Zhang, H., Sun, J., Zhuang, S., 2018. The evaluation
572 of endocrine disrupting effects of tert -butylphenols towards estrogenic receptor α , androgen
573 receptor and thyroid hormone receptor β and aquatic toxicities towards freshwater organisms.
574 *Environmental Pollution*. 240, 396–402. 10.1016/j.envpol.2018.04.117
- 575 Van Jaarsveld, E., Thomas, V., 2006. South African *Plectranthus* and the art of turning shade
576 to glade. Simon's Town: Fernwood Press, South Africa. [https://www.nhbs.com/the-southern-](https://www.nhbs.com/the-southern-african-plectranthus-book)
577 [african-plectranthus-book](https://www.nhbs.com/the-southern-african-plectranthus-book)
- 578 Rostami, S., Azhdarpoor, A., 2019. The application of plant growth regulators to improve
579 phytoremediation of contaminated soils: A review. *Chemosphere*. 220, 818-827.
580 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.203>
- 581 Panjai, L., Noga, G., Hunsche, M., Fiebig, A., 2019. Optimal red light irradiation time to
582 increase health-promoting compounds in tomato fruit postharvest. *Scientia Horticulturae*. 251,
583 189-196. 10.1016/j.scienta.2019.03.019
- 584 Mitton, F. M., Gonzalez, M., Monserrat, J. M., Miglioranza, K. S., 2018. DDTs-induced
585 antioxidant responses in plants and their influence on phytoremediation process. *Ecotoxicology*
586 and environmental safety. 147, 151-156. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.037>
- 587 Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M., 2013. Functional
588 roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology*
589 and Biochemistry. 72, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.014>

- 590 Trigiano, R. N., Whindham, T. T., Whindham, A. S., 2011. Interrupção da função da planta. In:
- 591 In, Fitopatologia- conceitos e exercícios de laboratório. Artmed, São Paulo, 379-389.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS

Para realizar a investigação da constituição dos compostos bioativos, desenvolvemos e validamos um método cromatográfico por HPLC-DAD para a quantificação de 9 compostos fenólicos (ácido gálico, 3,4- dihidroxibenzóico, clorogênico, cafeico, siríngico, cumárico, ferúlico e rutina e quercetina). A curva analítica foi construída na faixa de 0,5 a 10,0 mg.L⁻¹ para todos os compostos, exceto rutina que foi de 1,0 a 10,0 mg.L⁻¹. O método cromatográfico foi linear com R² entre 0,9972 e 0,9995 com LOD abaixo de 94 µg.L⁻¹ e LOQ abaixo de 284 µg.L⁻¹. O método obteve sucesso com a precisão dos valores médios testados em todos os compostos (RSD <6,8%). Esses valores são muito bons em termos de repetibilidade de acordo com o INMETRO (2016), que considera valores de RSD de até 20%. A validação dos dados analíticos foi importante, pois os valores representam com veracidade a quantidade dos analitos na amostra.

Os resultados mostram que o detector utilizado (DAD) é eficiente na resolução da separação dos compostos fenólicos. Representada também pelos baixos valores de LOD e LOQ obtidos quando comparados a outros estudos que também utilizaram compostos fenólicos (PUTNIK et al., 2016; GONÇALVES et al., 2019), assim como na recuperação dos analitos. O método cromatográfico apresentou boa recuperação para cada composto fenólico, pois os valores obtidos variaram de 81,39 a 107,28%, com % RSD (dados não mostrados) de 0,38% a 9,94%. Esses resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos de validação de métodos para compostos fenólicos (NATIVIDADE et al. 2013; PADILHA et al. 2017) e os valores de RSD foram inferiores ao limite máximo de 20% (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017).

Após o desenvolvimento do método analítico e sua aplicação nas diferentes preparações para infusão (grupos), este estudo verificou a quantidade de sólidos solúveis, a composição fenólica total e a atividade antioxidante dos mesmos grupos. Observou que a infusão DML+A de apresentou maior quantidade de sólidos solúveis (850,00 µg.mL⁻¹ ± 0,01) quando comparado ao DML-A (812,50 µg.mL⁻¹ ± 265,00), assim como os compostos fenólicos totais (12,40 µgEAG.mg⁻¹ em DML+A e 10,53 µg GAE.mg⁻¹ em DML-A). Os FL+A e FL-A apresentaram peso e detecção abaixo do mínimo de confiabilidade, ou seja, continham menos sólidos solúveis. Não há pesquisas com *P. neochilus* ou gênero *Plectranthus* que mencionem as concentrações dos compostos fenólicos totais nessas condições de infusão e preparo. Existe apenas o estudo de Pires et al. (2016) com extratos etanólicos das diferentes partes de *P. neochilus* que apresentaram concentrações menores que as obtidas no presente estudo (3,26

mgGAE.g⁻¹ a 5,40 mgGAE.g⁻¹). O potencial antioxidante das diferentes infusões está de acordo com os níveis de compostos fenólicos e sólidos solúveis. O potencial antioxidante para as diferentes infusões mostrou que nas preparações com folhas frescas, apenas o método DPPH detectou atividade de 38,41% ± 1,13 e 37,88% ± 0,61 com e sem agitação respectivamente. Além disso, os resultados com o método DPPH mostraram maior capacidade antioxidante quando se utiliza a folha seca com agitação, de 54,85% ± 0,99 (DML+A) e 52,66% ± 2,65 (DML-A). No teste com o fosfomolibidênio, a capacidade antioxidante total de 19,54 µgEAA.mg⁻¹ ± 2,55 em DML+A e 15,72 µgEAA.mg⁻¹ ± 0,80 em DML-A.

A porcentagem de inibição do DPPH é um parâmetro que demonstra se as amostras apresentam capacidade antioxidante significativa ou não (> 50%) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; BONDET et al., 1997; SCHAICH et al., 2015). Sobre o estudo de Freitas et al. (2014) realizado com *Plectranthus amboinicus*, eles obtiveram apenas 40% de inibição de radicais livres com DPPH no extrato etanólico. As demais infusões ficaram abaixo de 40%, apresentando baixa capacidade antioxidante.

Os maus resultados para infusões de folhas frescas (FL+A e FL-A) podem ser devido à quantidade de folhas necessária para atingir as mesmas concentrações (visto em sólidos solúveis). De acordo com Bandeira et al. (2011) e Bocardi (2007), as folhas frescas de *P. neochilus* apresentam alto teor de água (93,12% e 93,70%), o que implica em utilizar mais folhas para atingir a mesma concentração das folhas secas (que está ausente da água, somente matéria seca). Além disso, os baixos resultados encontrados para essas duas infusões talvez porque não tenham sido maceradas (apenas as folhas secas) o que implica em uma maior área superficial nas infusões com a folha seca. Por meio desses resultados, juntamente com os encontrados para a quantificação de compostos fenólicos, sólidos solúveis e fenólicos totais, fica evidente a importância da forma como as infusões são preparadas.

Os resultados da quantificação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD reforçam esta hipótese. O principal composto identificado foi a rutina com 4,36 ± 0,24 mg.L⁻¹ na infusão de DML+A e 6,13 ± 0,31 mg.L⁻¹ na infusão de DML-A, seguida de ácido cafeico com 3,99 ± 0,02 mg.L⁻¹ na infusão de DML+A e 1,83 ± 0,02 mg.L⁻¹ em infusão de DML-A. Os resultados foram diferentes dos encontrados por Ramborger et al. (2017a), que quantificou ácido cafeico, ácido cumárico e ácido ferúlico com *P. neochilus* a 10,0 mg.L⁻¹ de infusão de folhas secas. No entanto, Matias et al. (2019) encontraram rutina, ácido cafeico, clorogênico e rosmarínico em vários extratos aquosos (10 g de material vegetal foi fervido em 100 mL de água destilada) de

diferentes espécies, incluindo infusões de *P. neochilus*. Embora o ácido clorogênico tenha sido incluído em nosso método, sabe-se que a composição fenólica varia de acordo com vários fatores nas plantas, como disponibilidade de água, temperatura, sazonalidade e tempo de coleta (RIBEIRO et al., 2019; KO et al., 2018) Esses aspectos possivelmente influenciaram essa variação na composição encontrada por nós sobre os demais estudos. Além disso observamos que o preparo da infusão de folhas secas proporcionou maior extração de rutina em relação ao ácido cafeico. Notou-se também que a agitação aumentou a extração de ácido cafeico, possivelmente devido à maior extração de compostos pela agitação. No entanto, a agitação diminuiu a quantificação da rutina. Neste caso, acreditamos que seja devido à degradação da rutina ou, sua complexação com outras e mais compostos extraídos por agitação, o que pode ser visto pela maior extração dos outros compostos através da quantidade de sólidos solúveis em DML-A. Portanto, a quantidade de sólidos solúveis pode ter levado a uma maior saturação da solução, não extraindo a mesma quantidade de rutina ou promovendo sua complexação com outros compostos.

O Boldo gambá (*P. neochilus*) é utilizado para diversas finalidades, além do seu uso na medicina tradicional como já abordado, o *P. neochilus* é utilizado para fins ornamentais, tecnologia *green roof* e para fitorremediação (POOLEY, 1998; VAN JAARSVELD AND THOMAS, 2006; MORAU, LIBELLE & GARDE, 2012; RAMBORGER et al., 2017a; RAMBORGER et al. 2020a; RAMBORGER et al. 2020b). O *P. neochilus* possui um significativo potencial fitorremediador de 2,4-D, entretanto voltamos a abordar este tema, visto que o primeiro trabalho que usou o Boldo para fitorremediar o 2,4-D com ainda encontrou 40% do herbicida adicionado inicialmente.

Grande maioria dos trabalhos que investigam o uso da fitorremediação, procuram encontrar a planta ideal para retirar/degradar determinado composto tóxico para o meio, sem se importar com as condições da planta. Indo contra esta tendencia, nosso estudo buscou estimular o desempenho fitorremediador de 2,4-D pela planta, através de estímulos luminosos com diodos emissores de luz, ao mesmo tempo que criamos e validamos um método cromatográfico e otimizamos um método de extração já aplicado anteriormente para quantificação e extração do 2,4-D em água (RAMBORGER et al. 2017a).

Antes das análises cromatográficas para a quantificação de 2,4-D nas amostras de fitorremediação, foi necessário certificar que o método cromatográfico gerava informações confiáveis, evitando a interpretações errôneas dos resultados. Nesta perspectiva, o método

analítico passou pelo processo de validação analítica, para ser capaz de quantificar o 2,4-D presente na formulação comercial (Aminol 806, Adama), diluído em água.

Todos os parâmetros de validação do método cromatográfico por HPLC-DAD para a quantificação do herbicida (seletividade, precisão, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e especificidade e repetibilidade *intra-day*), estavam do recomendado pela ANVISA (2017).

De forma geral, as luzes de LED nas diferentes cores (tratamentos) foram efetivas no decaimento percentual da concentração de 2,4-D, diferente do tratamento com luz natural, visto que a degradação de 2,4-D no tratamento com luz natural proporcionou a menor taxa de diminuição do 2,4-D, quando comparado aos tratamentos com LED. Este dado não está de acordo com o esperado, pois, Ramborger et al. (2017a) obteve redução significativa da concentração de 2,4-D na água no tratamento de fitorremediação em 30 dias com *P. neochilus*, com aproximadamente 63% do herbicida adicionado inicialmente no tratamento de fitorremediação, enquanto o controle se manteve com mais de 80%. Essa diferença com os dados obtidos no presente estudo pode ser devido às condições em que os experimentos foram conduzidos, Ramborger et al (2017a) conduziu seu experimento em casa de vegetação, com incidência da luz do sol e temperatura não controlada e no presente estudo estas condições foram controladas.

Observamos que o 2,4-D apresentou uma degradação semelhante e linear em todos os grupos até a 14 dias, a partir disso, ao comparar os resultados dos demais grupos (LED branco, azul e vermelho) se torna evidente a importância da utilização dos LEDs para o tratamento da fitorremediação, pois os tratamentos com as diferentes luzes apresentaram diferença significativa em determinado período, além de uma redução drástica da concentração do herbicida, principalmente com os LEDs vermelho e azul no dia 28, enquanto os demais grupos (de todos os tratamentos) apresentaram a estabilização da concentração de 2,4-D dos 14 até 28 dias. Embora o tratamento com LED branco proporcionou uma concentração de 2,4-D significativamente menor no seu grupo de fitorremediação, obtivemos uma maior concentração final (em 28 dias). Entretanto, o uso do fotoestímulo com luz de LED branco se mostrou melhor quando comparado com a fitorremediação com luz ambiente, pois no 14º dia a redução na concentração do herbicida foi significativamente menor que de seu controle de degradação natural (sem planta).

Os tratamentos com maior destaque na redução dos níveis de 2,4-D foram os estimulados com Luz de LED azul e vermelho. O tratamento com a fotoestimulação com o LED azul após 28 dias foi capaz de auxiliar na redução da porcentagem do 2,4-D para $26.77\% \pm 9.47\%$, enquanto controle se manteve em $55.85\% \pm 0.76\%$. O mais interessante foi com o uso do LED vermelho, pois a diferença muito acentuada nos 28 dias, onde as plantas que receberam o fotoestímulo reduziram a quantidade 2,4-D a menos de 4%. O 2,4-D possui um tempo de meia vida maior na água do que no solo, contudo, existe uma maior quantidade de estudos com interesse na degradação deste herbicida no solo (BARBA et al. 2020; GÓNGORA-ECHEVERRÍA et al., 2019; GIRARDI et al., 2013). Roberts et al. (1998), encontraram variações no tempo de meia vida do 2,4-D entre 6.4 e 8.3 dias no solo. Isso se deve, provavelmente, a microrganismos presentes no solo que degradam facilmente a forma ácida do 2,4-D, bem como os grupamentos amina e éster (COLEMAN et al., 2002). Em relação aos estudos com o 2,4-D na água, Ramborger et al (2017a) detectaram o herbicida em 60 dias após o início do tratamento de fitorremediação na água, tornando mais importante encontrar e/ou aprimorar técnicas visando a sua degradação em água. Rosa et al. (2013) obteve aproximadamente 41% de remoção do herbicida como o uso da alface d'água (*Lactuca sativa*) em 14 dias, no entanto, nenhum estudo realizou fotoestímulo para melhorar a fitorremediação de 2,4-D. Nesta perspectiva, o que se encontra na literatura são técnicas mais complexas, com o uso de reagentes, ou até com uso da radiação para a degradação do 2,4-D. Imoberdorf e Mohseni (2010) utilizaram a radiação UV à vácuo (VUV) para promover a degradação de diferentes concentrações de 2,4-D de forma eficiente em tempo aproximado de 20 minutos. Entretanto, obtiveram redução no rendimento devido a complexidade da matriz (carbonos orgânicos, alcalinidade e H_2O_2). Forti et al. (2020) observaram que a oxidação anódica com a adição do reagente de Fenton e irradiação usando luz UV alcançou 100% de degradação do herbicida, enquanto os processos separados atingiram menos de 50%. Adak et al. (2019) utilizaram UV em 253 nm com e sem H_2O_2 , testando diferentes variáveis durante o processo de oxidação avançado como: fluência, dose de H_2O_2 , pH, alcalinidade, concentração de nitrato e força iônica obtendo mais de 97% de degradação do herbicida em um curto período de tempo. Sandeep et al. (2018) obteve 96% e 83% de fotodegradação de 2,4-D usando luz UV (~265 nm) e luz solar, respectivamente, além de nanomateriais fotocatalisadores de TiO_2 sintetizadas por um método hidrotérmico. Outros estudos ainda trazem técnicas de degradação do 2,4-D utilizando degradação microbiana (Girardi et al. 2013), reação tipo Fenton ou foto-Fenton (CHEN. et al. 2015; FORTI et al., 2020; GONZÁLEZ et al. 2018), adsorção (HAN et al. 2010; ANIRUDHAN e MANADAN-ANJU. 2019; KUŚMIEREK et al. 2016), oxidação (CAI et al.

2018), oxidação eletroquímica (GAO et al. 2009) e degradação fotoeletroquímica (XU et al. 2020). Estes trabalhos possuem em comum uma alta quantidade de reagentes e/ou materiais de alto custo para a sua execução e alta complexidade de estruturas. Nesse sentido, nosso trabalho procurou utilizar uma técnica barata, de fácil execução, possível adaptação *in locu*, sem adição de reagentes, e principalmente, caracterizada como uma técnica verde para a degradação do 2,4-D.

Em relação à concentração de 2,4-D utilizada neste estudo, se observa que é o dobro da recomendada para aplicação nas principais culturas, além de termos utilizado a formulação comercial (Aminol 806). Supomos que altas concentrações como essa, provavelmente, não seriam encontradas em águas superficiais ou subterrâneas decorrentes de escoamento superficial, lixiviação, ou deriva, a não ser por algum acidente ambiental. Tendo isso em vista, a concentração usada neste trabalho é relativamente alta e os resultados obtidos com o *P. neochilus* mostraram que esta planta é capaz de remediar o herbicida e, seu potencial de fitorremediação aumentou com o fotoestímulo nas cores vermelho e azul, podendo minimizar o impacto ambiental causado pelo herbicida em curto prazo.

Nossos resultados ganham ainda mais destaque, quando observamos os tempos de meia vida do 2,4-D ($t_{1/2}$). O $t_{1/2}$ do 2,4-D em ambientes aquático aeróbios é de aproximadamente 15 dias (GERVAIS et al. 2008). Entretanto, no presente estudo, os controles de degradação (s/ planta) mostraram que o 2,4-D teve uma meia vida entre 31 a 21 dias (Tabela 2). Os tratamentos da fitorremediação (c/ planta), para a luz natural e luz de LED branco, não tornaram a fitorremediação de 2,4-D por *P. neochilus* mais eficiente porque os seus valores de $t_{1/2}$ foram de 25.3 dias e 18.43 dias, respectivamente, enquanto seus controles (s/ planta) foram de 31.08 e 21.80, respectivamente.

A diferença na dissipação do herbicida foi mais acentuada nos tratamentos com o fotoestímulo da luz de LED vermelho, onde se obteve uma redução do $t_{1/2}$ para 6.74 em dias, enquanto seu controle ficou com $t_{1/2}$ de 27.4 dias (Tabela 2 e Figura 3 C). O tratamento de fitorremediação com luz de LED azul também apresentou redução do $t_{1/2}$ (15.56 dias), enquanto o seu controle se manteve próximo aos demais ($t_{1/2}$ de 29 dias) (Tabela 2, Figuras 3 C e 3 D). Desta forma, os dados dos tratamentos com os LEDs vermelho e azul apresentaram uma redução no $t_{1/2}$ de aproximadamente 70% (tratamento LED vermelho) e 50% (tratamento LED azul) quando comparado com o $t_{1/2}$ de seus respectivos controles. Desta forma a dissipação dos

tratamentos com luz de LED apresentou a seguinte ordem de dissipação: LED vermelho > azul > branco > natural.

Grande maioria dos trabalhos que investigam o uso da fitorremediação, procuram encontrar a planta ideal para retirar/degradar determinado composto tóxico para o meio, sem se importar com as condições da planta. Indo contra esta tendência, nosso estudo buscou estimular o desempenho fitorremediador de 2,4-D da planta, através de estímulos luminosos com diodos emissores de luz (LED). O uso de estímulos luminosos é uma tecnologia promissora para aumentar os níveis de compostos bioativos em diversas espécies de plantas e não há registros de trabalhos que o tenham utilizado para estimular a fitorremediação de pesticidas ou compostos orgânicos em plantas.

A explicação para tal fato decorre do papel da luz no metabolismo das plantas. Dentre os parâmetros que alteram o metabolismo dos vegetais (temperatura, pH, variação de matéria orgânica, salinidade, umidade) (RAI, 2009; DHIR et al., 2009; SUSARLA et al., 2002), a luz é um fator essencial para saúde das plantas, pois ela pode influenciar no metabolismo primário e, conseqüentemente no metabolismo secundário. As alterações podem ocorrer a nível enzimático, acarretando a variação da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (G-POD) e as enzimas ascorbato peroxidase (APX), desidroascorbato redutase (DHAR), monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e glutathione redutase (GR) (SHOHAEL et al. 2006) que são os mecanismos de defesa mais eficiente das plantas (MITTLER. 2002). A luz ainda desempenha um papel importante na produção de metabólitos secundários, responsáveis pela defesa antioxidante em diversas espécies de plantas. A consequência da incidência de diferentes cores de luz na produção de metabólitos secundários influencia diretamente na biossíntese ou degradação destes metabólitos e conseqüentemente na atividade antioxidante do seu metabolismo (AHMAD et. al 2014; FAZAL et al. 2016; NADEEM et al. 2019).

Pelo fato de que foi verificado que o 2,4-D diminui a atividade antioxidante em *P. neochilus* (Ramborger et al., 2017a), pelo aumento de espécies reativas que ele causa (Grossman, 2010), acreditamos que os tratamentos com os LEDs, tenham contribuído para o aumento das proteções contra este estresse oxidativo. Portanto, o uso dos LEDs foi capaz de influenciar no metabolismo vegetal o que permitiu uma alta eficiência na fitorremediação por *P. neochilus*. Isso pode ser visto através da figura 10, onde apresentamos os níveis dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais, do potencial antioxidante dos tratamentos

descritos na metodologia do manuscrito 2. Onde conseguimos notar o aumento dos níveis de flavonoides totais em todos os tratamentos de fitorremediação em comparação a seus controles (gráfico B). Isso confere aos tratamentos, maior potencial antioxidante (gráfico C). Essa variação é fortemente acentuada em todos os tratamentos com luz de LED, enquanto o tratamento com luz natural tem diminuição no potencial antioxidante, como pode ser visto no gráfico D. As funções dos flavonóides “relacionadas aos antioxidantes” referem-se a funções que dependem da estrutura química conferindo capacidade redutora, mas que vão além da capacidade dos flavonóides de doar elétrons ou átomos de hidrogênio (AGATI e TATTINI, 2010; AGATI et al 2012). Nesta perspectiva a ação antioxidante se deve por conta dos Flavonóides dihidroxílicos que são responsivos a luz, que tem uma capacidade elevada para inibir e em seguida, extinguir ROS uma vez que são formados (POURCEL et al. 2006; AGATI et al. 2013).

Isso é visto nos níveis de ERO dos tratamentos, que estão apresentados na figura 11. Nas raízes, embora os níveis de espécies reativas de oxigênio tenham aumentado em todos os tratamentos com pesticida (C-1), quando comparamos esse aumento entre as cores na forma de diferença percentual (entre controles e tratamentos de fitorremediação) entre os tratamentos, notamos que todos os tratamentos de luz, diminuíram significativamente os níveis de ERO (C-2). O mesmo aconteceu nos caules, com exceção do tratamento com luz de LED azul (B-2). Já nas folhas notamos aumento dos níveis de ERO nos tratamentos com LED branco e azul comparados ao tratamento de luz natural. Provavelmente a característica mais energética dos espectros (azul e branco), configuraram estresse luminoso. Esses aumentos se devem ao fato que a principal fonte de formação de espécies reativas de oxigênio ocorre através da fotossíntese, que ocorre nas folhas.

Figura 10 - Níveis de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e potencial antioxidante do extrato de *P. neochilus*. Onde fenólicos totais são expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por litro de extrato (mgEAG.L^{-1}) (A), Níveis de flavonoides totais expressos em miligramas de equivalentes de rutina por L de extrato (mgER.L^{-1}) (B), potencial antioxidante expressos por microgramas de equivalente de ácido ascórbico por mL de extrato ($\mu\text{gEAA.L}^{-1}$) (C) e a variação do potencial antioxidante dos tratamentos de fitorremediação para seus respectivos controles (D). Metodologia descrita no apêndice 1.

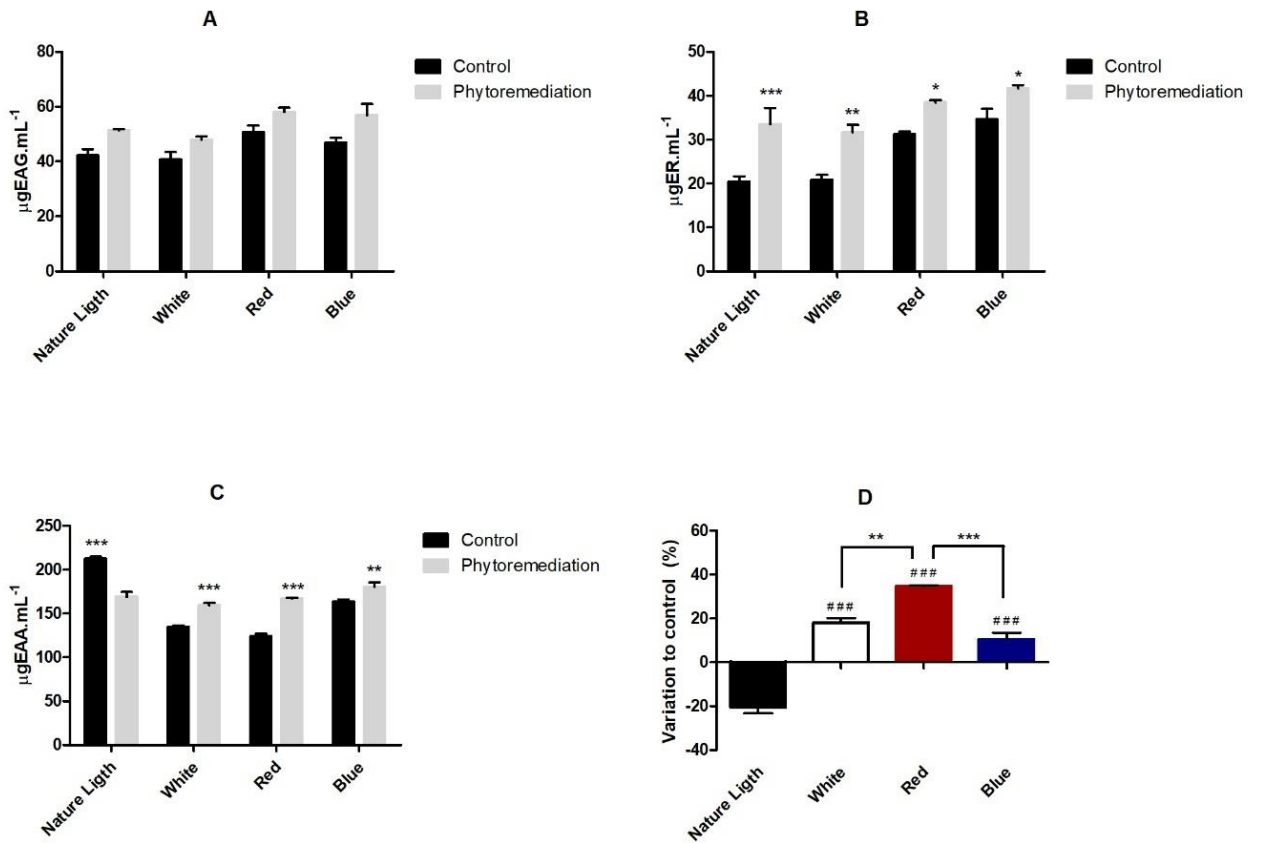
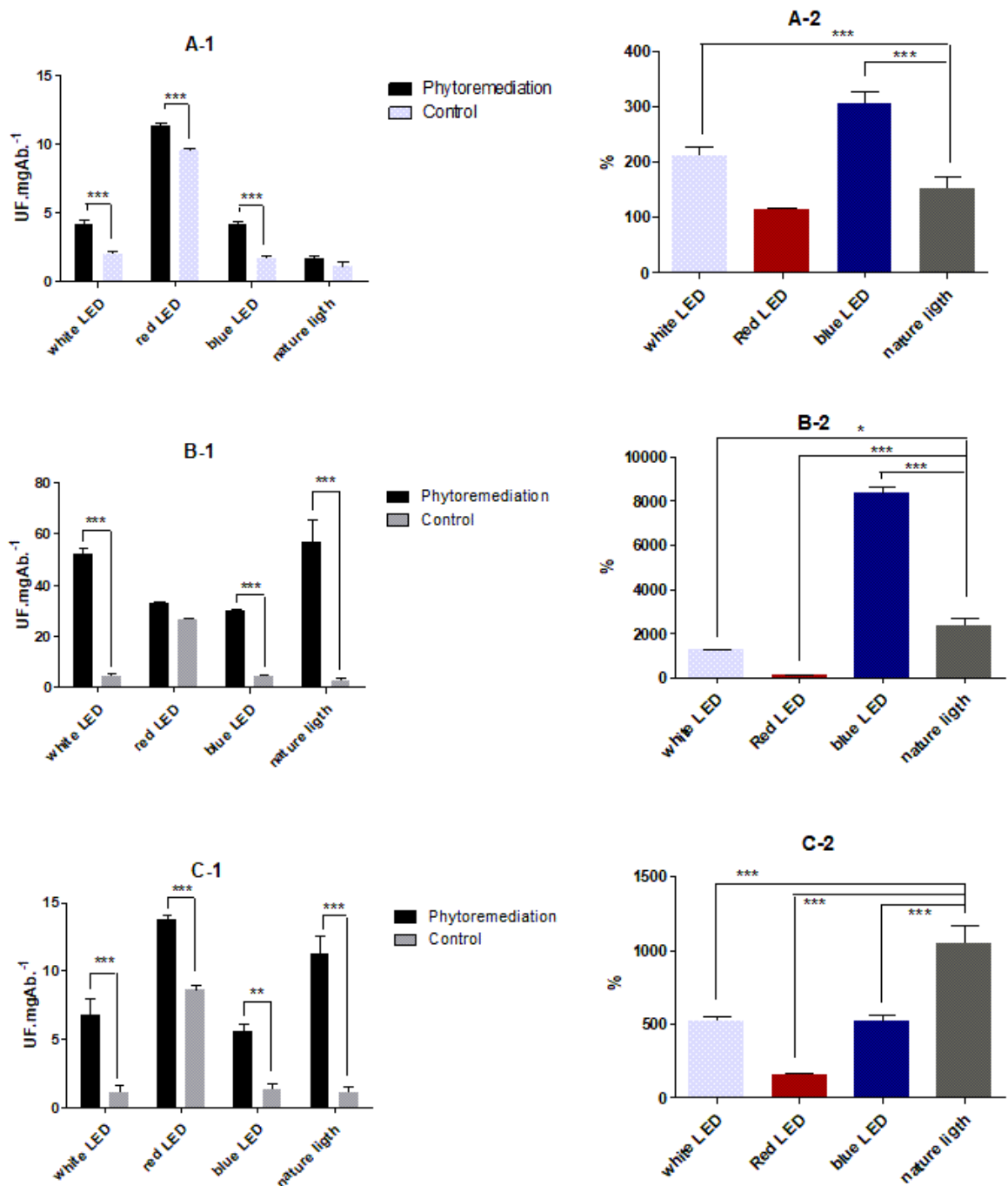


Figura 11 - Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas folhas (A-1), raízes (B-1) e caules (C-1) de *P. neochilus* condicionadas a fitorremediação e fotoestimulação nas cores branco, azul e vermelho e luz ambiente e seus respectivos controles, condicionadas as mesmas condições de luz, sem a adição de pesticida na água. A-2, B-2 e C-2 apresentam a variação nos níveis de ERO dos tratamentos com seus respectivos controles do ambiente. As linhas indicam as comparações com $P < (0,05)$ (*), $P < 0,01$ (**) e $P < 0,001$ (***). Metodologia descrita no apêndice 1.



7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido e validado dois métodos método cromatográfico por HPLC-DAD, um para a quantificação de compostos fenólicos e outro para a quantificação do herbicida 2,4-D em água, ambos os métodos se mantiveram dentro dos parâmetros preconizados. O método cromatográfico para a quantificação dos compostos fenólicos, em conjunto com os ensaios de compostos fenólicos totais e do potencial antioxidante mostrou que preparar infusões de folha seca macerada propicia uma melhor extração dos compostos bioativos das folhas, aumentando o potencial antioxidante do chá, sendo a agitação durante o preparo da infusão uma condição importante para a melhor extração destes compostos. Através deste método analítico para a quantificação do 2,4-D foi possível avaliar a eficiência da técnica de fitorremediação em associação ao uso dos LEDs em 28 dias, onde a eficiência da fitorremediação em associação com os LEDs para degradar o 2,4-D aumentou na seguinte sequência: branco (62,99 % de degradação) < azul (73,22 % de degradação) < vermelho (96,67 % de degradação). Portanto, o uso da tecnologia dos LEDs, principalmente do LED vermelho, em associação ao *P. neochilus*, promoveu a melhor taxa de diminuição do 2,4-D na água.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora a presente dissertação tenha trazido uma nova perspectiva para o uso da fitorremediação, conseguindo aumentar a eficiência da fitorremediação através de estímulos luminosos com o uso de LED, novas questões surgiram com nossos resultados.

Embora se tenha noção dos parâmetros bioquímicos que o estímulo luminoso influencia, não sabemos os mecanismos de desintoxicação utilizado pela planta para a degradação do 2,4-D e quais são estimulados para potencializar essa degradação. Até hoje, não existem estudos que avaliem os possíveis metabólitos formados durante o processo de fitorremediação do herbicida. Alguns desses metabólitos são conhecidos através da sua degradação por outros processos de degradação. É o caso dos processos de degradação avançada, na formação de 2,4-DCP, 2,6-DCP, 2,4,6-triclorofenol, 2-clorohidroquinona, 2-cloro-1,4- benzoquinona e 3,5-diclorocatecol (WU et al., 2017; CAI et al., 2018). A investigação desses produtos e de sua toxicidade se faz importante, uma vez que alguns metabólitos como o 2,4-DCP (principal metabólito), são ainda mais tóxicos que o próprio 2,4-D (JU, et al., 2019). Para isso, testes de toxicidade, aliados a avaliação dos níveis desses metabólitos, apresentariam uma resposta mais verídica da real desintoxicação do ambiente (com 2,4-D) por *P. neochilus*.

Somado a isso, notamos a influência dos LEDs na produção de flavonoides e no potencial antioxidante, que foram uteis na proteção contra o estresse oxidativo da planta. Por outro lado, muitos destes compostos possuem também importantes ações farmacológicas, o estímulo dessa produção através da luz, pode possivelmente potencializar tais efeitos. Para isso, o método cromatográfico para a quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD produzido em nosso primeiro manuscrito, será nossa ferramenta para estas futuras investigações.

Com base nisso, temos como perspectivas futuras:

- Avaliar a alteração das enzimas desintoxicantes (estresse oxidativo e xenobióticos) de *P. neochilus*, frente a toxicidade do 2,4-D e a influência do estímulo luminoso nesse processo.
- Investigar a produção, degradação e toxicidade do 2,4-D e metabólitos na água resultante da fitorremediação, em conjunto com a influência do fotoestímulo com LED azul e vermelho no processo de formação e degradação neste processo.

- Avaliar a influência de tratamentos com luz de LED na variação nos metabólitos secundários de *P. neochilus*, bem como a possível variação da sua ação farmacológica, frente a um modelo de estresse oxidativo.

9. REFERÊNCIAS

- ADAMA. Bula Aminol® 806. **ADAMA Brasil S/A. 2016.** Disponível em: <<https://www.adama.com/documents/407112/415700/Aminol%C2%AE+806+-+Bula>>. Último acesso em abril de 2020.
- AGATI, G., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S., & TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant science**, v. 196, p. 67-76, 2012.
- AGATI, G., BRUNETTI, C., DI FERDINANDO, M., FERRINI, F., POLLASTRI, S., TATTINI, M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 35-45, 2013.
- AGATI, G., TATTINI, M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. **The New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 786-793, 2010.
- AHMAD, N.; ABBASI, B. H.; FAZAL, H.; KHAN, M. A.; AFRIDI, M. S. Effect of reverse photoperiod on in vitro regeneration and piperine production in *Piper nigrum* L. **Comptes rendus biologies**, v. 337, n. 1, p. 19-28, 2014.
- ALMEIDA, W. D., FIÚZA, J., MAGALHÃES, C. M., JUNGER, C. M. **Agrotóxicos. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 1, n. 2, p. 220-249. 1985. <https://www.scielosp.org/article/csp/1985.v1n2/220-249/pt/>
- ANSARI, A. A., NAEEM, M., GILL, S. S., & ALZUAIBR, F. M. Phytoremediation of contaminated waters: An eco-friendly technology based on aquatic macrophytes application. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, 2020.
- Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. **Ministério da Saúde**. Brasil. 2017.
- APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ASCOM/SEAPDR. Secretaria da Agricultura apresenta propostas para utilização do herbicida 2,4-D. Governo do estado do Rio Grande do Sul. 2019. Disponível em:<<https://www.estado.rs.gov.br/agricultura-apresenta-propostas-para-uso-do-herbicida-2-4-d-no-rio-grande-do-sul>> Último acesso em maio de 2019.

BABILI, F. E., BOUAJILA, J., SOUCHARD, J. P., BERTRAND, C., BELLVERT, F., FOURASTE, I., MOULINS, CLAUDE., VALENTIN, A. Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. **Journal of food science**, v. 76, n. 3, p. C512-C518, 2011.

BRITO, N. M., JUNIOR, O. P. D. A., POLESE, L., RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.

BROINIZI, P. R. B., ANDRADE-WARTHA, E. R. S. D., SILVA, A. M. D. O., NOVOA, A. J. V., TORRES, R. P., AZEREDO, H. M. C., ALVEZ, R. A., MANCINI-FILHO, J. Evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds naturally contained in by-products of the Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Science and Technology**. 27(4), 902-908. 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400035>.

BROWN, C. D., VAN BEINUM, W. Pesticide transport via sub-surface drains in Europe. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 12, p. 3314-3324, 2009.

CAI, J., ZHOU, M., YANG, W., PAN, Y., LU, X., SERRANO, K. G. Degradation and mechanism of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) by thermally activated persulfate oxidation. **Chemosphere**, v. 212, p. 784-793, 2018.

CAIRNS, T., SHERMA J. **Emerging Strategies for Pesticide Analysis**, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1992.

CARVALHO, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48-60, 2017.

CHAOUKI, W., LEGER, D. Y., ELJASTIMI, J., BENEYTOUT, J. L., HMAMOUCHE, M. Efeito antiproliferativo de extratos de *Aristolochia baetica* e *Origanum compactum* na linha celular de câncer de mama humano MCF-7. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 3, 269-274, 2010.

COLEMAN, J. BLAKE-KALFF, M. DAVIES, E. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. **Trends in plant science**, v. 2, n. 4, p. 144-151, 1997.

COLLINS, Chris; FRYER, Mike; GROSSO, Albania. Plant uptake of non-ionic organic chemicals. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 1, p. 45-52, 2006.

COLUSSI, J. Após adoção de normas no RS, aplicação do herbicida 2,4-D tem 22 casos de suspeita de deriva. **Gauchazh: campo e lavoura**. 2019. Disponível em: <<https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2019/11/apos-adocao-de-normas-no-rs-aplicacao-do-herbicida-24-d-tem-22-casos-de-suspeita-de-deriva-ck2f6r7200bma01r2ij12ozl5.html>> Acesso em 05/2020.

COLUSSI, J. e ROLLSING, C. Perdas de quase R\$ 100 milhões reacendem debate sobre agroquímico 2,4-D. **Gauchazh: campo e lavoura**. 2019. Disponível em: <<https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2019/04/perdas-de-quase-r-100-milhoes-reacendem-debate-sobre-agroquimico-24-d-cju1voomd00no01mwyclb6al3.html>>. Acesso em 05/2020.

COLUSSI, J. e ROLLSING, C. SOARES, F. Maior produtor de oliveiras no país tem pomares afetados por resíduos de agroquímicos. **Gauchazh: campo e lavoura**. 2018a. Disponível em: <<https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2018/12/maior-produtor-de-oliveiras-no-pais-tem-pomares-afetados-por-residuos-de-agroquimicos-cjpnxyz4n0lbu01rxprcag6t1.html>>. Acesso em 05/2020.

COLUSSI, J. e ROLLSING, C. SOARES, F. Quebra da safra de uva na Campanha por resíduo de 2,4-D pode chegar a 40%. **Gauchazh: campo e lavoura**. 2018b. Disponível em: <<https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2018/12/quebra-da-safra-de-uva-na-campanha-por-residuos-de-24-d-pode-chegar-a-40-cjpnyorlh0la701piirqkqrf.html>>. Acesso em 05/2020.

CREVELIN, E. J., CAIXETA, S. C., DIAS, H. J., GROppo, M., CUNHA, W. R., MARTINS, C. H. G., & CROTTI, A. E. M. Antimicrobial activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* against cariogenic bacteria. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

DA SILVA PROCÓPIO, A. M., CAIS, T.A., DA SILVA, W.F., KONDO, M. M., SILVA, F.S., DE ANDRADE, S. J. Remotion of the 17 α -Ethinylestradiol Hormone (EE2) by Biosorbent (*Arachis hypogaea*) in Aqueous Solutions: Validation of Analytical Methodology and Adsorption Study. **Ciência e Natura**, v. 42, p. 11, 2020.

DE BARROS, M. P., LEMOS, M., MAISTRO, E. L., LEITE, M. F., SOUSA, J. P. B, BASTOS, J. K., DE ANDRADE, S. F. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 372-377, 2008.

DE CINQUE MARIANO, Daiane; OKUMURA, Ricardo Shigueru. < b> Aspectos Agronômicos, Uso pelo Homem e Mecanismos da Fitorremediação: uma revisão. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 5, n. 2 Especial, 2012.

DIETZ, A. C., SCHNOOR, J. L. Advances in phytoremediation. **Environmental health perspectives**, v. 109, n. suppl 1, p. 163-168, 2001.

Directorate-General for Health and Food Safety (SANTE). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed: SANTE/11813 de novembro de 2017. **European Union**. 2018.

DONG, C., FU, Y., LIU, G., LIU, H. Growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity and biomass yield and quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) exposed to LED light sources with different spectra combinations. **Journal of agronomy and crop science**, v. 200, n. 3, p. 219-230, 2014.

DORDIO, A. V., PALACE CARVALHO, A. J. Phytoremediation: an option for removal of organic xenobiotics from water. *In* GALUBEV, I. A. Handbook of phytoremediation. **Nova Science Publishers**. 2011.

DOS SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários *in*: SIMÕES, C. M. O.; *et al*. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6.ed. **Editora da UFRGS - Editora da UFSC**. Porto Alegre – Florianópolis. 403-434. 2007.

DROGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUSHENKOV, V., KUMAR, P. N., MOTTO, H., & RASKIN, I. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. **Environmental science & technology**, v. 29, n. 5, p. 1239-1245, 1995.

EAPEN, Susan; SINGH, Sudhir; D'SOUZA, SF Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 442-451, 2007.

ESCOTO, D. F., GAYER, M. C., BIANCHINI, M. C., PEREIRA, G. C., ROEHR, R., DENARDIN, E. L. G. Use of *Pistia stratiotes* for phytoremediation of water resources contaminated by clomazone. **Chemosphere**. 227, 299-304, 2019.

FAZAL, H., ABBASI, B. H., AHMAD, N., ALI, S. S., AKBAR, F., & KANWAL, F. Correlation of different spectral lights with biomass accumulation and production of antioxidant secondary metabolites in callus cultures of medicinally important *Prunella vulgaris* L. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 159, p. 1-7, 2016.

FELSOT, A. S., UNSWORTH, J. B., LINDERS, J. B., ROBERTS, G., RAUTMAN, D., HARRIS, C., & CARAZO, E. Agrochemical spray drift; assessment and mitigation—A review. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 46, n. 1, p. 1-23, 2010.

FELSOT, A.S., UNSWORTH, J.B., LINDERS, J. B. H. J., ROBERTS, G., RAUTMAN, D., HARRIS, C., CARAZO, E. Agrochemical spray drift; assessment and mitigation - a review

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, v. 143, n. 1, p. 81-96, 2009.

GERVAIS, J.; LUUKINEN, B.; BUHL, K.; STONE, D. 2,4-D Technical Fact Sheet. **National Pesticide Information Center**, Oregon State University Extension Services. 2018. Último acesso em maio de 2020. Disponível em; <<http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html>>.

GILL, S. S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GLOZIER, N. E., STRUGER, J., CESSNA, A. J., GLEDHILL, M., RONDEAU, M., ERNST, W. R., SEKELA, M. A., STEVE, J. C., CAGAMPAN, E. S., MURPHY, C., MURRAY, J. L., DONALD, D. B. Occurrence of glyphosate and acidic herbicides in select urban rivers and streams in Canada, 2007. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 3, p. 821-834, 2012.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P., PICOS-SALAS, M. A., LEYVA-LÓPEZ, N., CRIOLLO-MENDOZA, M. S., VAZQUEZ-OLIVO, G., & HEREDIA, J. B. Flavonoids and phenolic acids from oregano: occurrence, biological activity and health benefits. **Plants**, v. 7, n. 1, p. 2, 2018.

HAHN, E.J., KOZAI, T., PAEK, K. Y. Blue and red light-emitting diodes with or without sucrose and ventilation affect in vitro growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets. **J. Plant Biol.** 43, 247–250. 2000.

HAIŠLOVÁ, J., ZROSTLIKOVA, J.. Efeitos de matriz na análise de (ultra) traços de resíduos de pesticidas em alimentos e matrizes bióticas. **Journal of Chromatography A** , v. 1000, n. 1-2, pág. 181-197, 2003.

HAN, D., JIA, W., LIANG, H. Selective removal of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid from water by molecularly-imprinted amino-functionalized silica gel sorbent. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 2, p. 237-241, 2010.

HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa: **LTC**. Rio de Janeiro, 2012.

HEO, J., LEE, C., CHAKRABARTY, D., PAEK, K.Y. Growth responses of marigold and salvia bedding plants as affected by monochromic or mixture radiation provided by a light-emitting diode (LED). **Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 3, p. 225-230, 2002.

HIRATA, L. L., SATO, M. E. O., & SANTOS, C. A. D. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo [Free radicals and skin aging]. **Acta Farm. Bonaerense**, 23(3), 418-424. 2004.

HORWITZ, W. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. **Gaithersburg, MD, USA: AOAC International**, p. 12-9, 2002.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). *DOQ-CGCRE-008. Revisão 05*, August **2016**.

JEEVANANTHAM, S., SARAVANAN, A., HEMAVATHY, R. V., KUMAR, P. V., YAASHIKAA, P. R., YUVARAJ, D. Removal of toxic pollutants from water environment by phytoremediation: A survey on application and future prospects. **Environmental technology & innovation**, v. 13, p. 264-276, 2019.

JOHKAN, M., SHOJI, K., GOTO, F., HAHIDA, S. N., YOSHIHARA, T. Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 75, p. 128-133, 2012.

JU, Z., LIU, S. S., XU, Y. Q., LI, K. Combined toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and its metabolites 2, 4-dichlorophenol (2, 4-DCP) on two nontarget organisms. **ACS omega**, v. 4, n. 1, p. 1669-1677, 2019.

KIM, S. J., HAHN, E. J., HEO, J. W., PAEK, K. Y. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets in vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 101, n. 1-2, p. 143-151, 2004.

KLADIVKO, E. J., BROWN, L. C., BAKER, J. L. Pesticide transport to subsurface tile drains in humid regions of North America. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 1-62, 2001.

KORTE, F., KVESITADZE, G., UGREKHELIDZE, D., GORDEZIANI, M., KHATISASHVILI, G., BUADZE, O., ZAALISHVILI, G., COULSTON, F. Organic toxicants and plants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 47, n. 1, p. 1-26, 2000.

KVESITADZE, G.; KHATISASHVILI, G.; SADUNISHVILI, T.; RAMSDEN, J. J. **Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants: basis of phytoremediation**. Springer Science & Business Media, 2006.

LAM, S. M., SIN, J. C., ABDULLAH, A. Z., MOHAMED, A.R. Sunlight responsive WO₃/ZnO nanorods for photocatalytic degradation and mineralization of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in water. **Journal of colloid and interface science**, v. 450, p. 34-44, 2015.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos**.: RiMa. São Carlos, 2004.

LARNEY, F. J., CESSNA, A. J., BULLOCK, M, S. Herbicide transport on wind-eroded sediment. **Journal of Environmental Quality**, v. 28, n. 5, p. 1412-1421, 1999.

LI, H., XU, Z., TANG, C. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 103, n. 2, p. 155-163, 2010.

LI, R., HUANG, W., WANG, X., LIU, X., & XU, Z. Effects of yellow, green, and different blue spectra on growth of potato plantlets in vitro. **HortScience**, v. 53, n. 4, p. 541-546, 2018.

LI, S., FENG, F., CHEN, S., ZHANG, X., LIANG, Y., & SHAN, S. Preparation of UiO-66-NH₂ and UiO-66-NH₂/sponge for adsorption of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 194, p. 110440, 2020.

LIN, K. H., HUANG, M. Y., HUANG, W. D., HSU, M. H., YANG, Z. W., & YANG, C. M. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 86-91, 2013.

LUO, J., CAO, M., ZHANG, C., WU, J., GU, X. S. The influence of light combination on the physicochemical characteristics and enzymatic activity of soil with multi-metal pollution in phytoremediation. **Journal of Hazardous Materials**, p. 122406, 2020.

MA, X., WANG, J., WU, Q., WANG, C., & WANG, Z. Extraction of carbamate pesticides in fruit samples by graphene reinforced hollow fibre liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic detection. **Food chemistry**, v. 157, p. 119-124, 2014.

MANDELBAUM, R. T., ALLAN, D. L., WACKETT, L. P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1451-1457, 1995.

MARCHESAN, E., SARTORI, G. M. S., AVILA, L. A. D., MACHADO, S. L. D. O., ZANELLA, R., PRIMEL, E. G., MACEDO, V. R. M., MARCHEZAN, M. G. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1053-1059, 2010.

MEYER, J. M., REZENDE, F. M., SOARES, S. A., & TOMBA, A. Metabolismo Secundário. **Botânica no Inverno**, p. 34, 2013.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MITTON, F. M., GONZALEZ, M., MONSERRAT, J. M., MIGLIORANZA, K. S. DDTs-induced antioxidant responses in plants and their influence on phytoremediation process. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 151-156, 2018.

MORAIS, S. M. D., CAVALCANTI, E. S., COSTA, S. M. O., & AGUIAR, L. A. Antioxidant action of teas and seasonings more consumed in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19(1B), 315-320, 2009.

MORENO, J. F., LIÉBANAS, F. A., FRENICH, A. G., VIDAL, J. M. Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1111, n. 1, p. 97-105, 2006.

NADEEM, M., ABBASI, B. H., YOUNAS, M., AHMAD, W., ZAHIR, A., HANO, C. LED-enhanced biosynthesis of biologically active ingredients in callus cultures of *Ocimum basilicum*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 190, p. 172-178, 2019.

NAHLER, G. International Conference on Harmonisation (ICH). In: **Dictionary of Pharmaceutical Medicine**. Springer, Vienna, p. 96-96. 2009.

NISHIYAMA, M. F., COSTA, M. A. F., COSTA, A. M. D., SOUZA, C. G. M. D., BÔER, C. G., BRACHT, C. K., PERALTA, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30(1), 191-96, 2010.

NOCTOR, G., MHAMDI, A., FOYER, C. H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant physiology**, v. 164, n. 4, p. 1636-1648, 2014.

PATRA, D. K., PRADHAN, C., PATRA, H. K. Chromium bioaccumulation, oxidative stress metabolism and oil content in lemon grass *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) W. Watson grown in chromium rich over burden soil of Sukinda chromite mine, India. **Chemosphere**, v. 218, p. 1082-1088, 2019.

PATRA, D. K., PRADHAN, C., PATRA, H. K. Toxic metal decontamination by phytoremediation approach: Concept, challenges, opportunities and future perspectives. **Environmental Technology & Innovation**, p. 100672, 2020.

PEREIRA G. C. **Estudo de Viabilidade de Fitorremediação de Sulfentrazone (Boral 500) por “Boldo-Gambá” (*Plectranthus neochilus*) em Meio Aquoso**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana. 2018.

PEREIRA, R. J., DAS GRAÇAS CARDOSO, M. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PESSARAKLI, Mohammad (Ed.). **Handbook of plant and crop stress**. CRC press, 2019.

PORT'S, P. S. **Compostos fenólicos e potencial antioxidante de ervas consumidas na região amazônica brasileira**. Tese de Doutorado, University of Campinas. 2011.

POURCEL, L., ROUTABOUL, J.-M., CHEYNIER, V., LEPINIEC, L., DEBEAUJON, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions, **Trends Plant Sci.** 12 (2006) 29 e 36.

PROESTOS, C., BOZIARIS, I. S., NYCHAS, G. J., KOMAITIS, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food chemistry**, v. 95, n. 4, pág. 664-671, 2006.

RAMBORGER, B. P., PAZ, M. E. G., DENARDIN, E. L. G., DE JESUS SOARES, J., ROEHRS, R. A review of anatomical, physiological, biological characteristics and uses of *Plectranthus neochilus*. **Ciência e Natura**, v. 42, p. 12, 2020a.

RAMBORGER, B. P., PAZ, M. E. G., KIELING, K. M. C., CARRIÇO, M. R. S., DE PAULA GOLLINO, G., COSTA, M. T., RIBEIRO, V. T., FOLMER, V., GENARDIN, E L. G., SOARES, J. J., ROEHRS, R. Parâmetros toxicológicos do resíduo aquoso após o uso de *Plectranthus neochilus* para fitorremediação 2, 4-D. **Chemosphere**. p. 128638, 2020b.

RAMBORGER, B. P.. FITORREMEDIAÇÃO DO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) PELO *Plectranthus neochilus*. Dissertação (Mestrado) – **Universidade Federal do Pampa**, Mestrado em Bioquímica, 2017b.

RAMBORGER, B. P.; GULARTE, C. A. O.; RODRIGUES, D. T.; GAYER, M. C.; CARRIÇO, M. R. S.; BIANCHINI, M. C; PUNTEL R. L.; DENARDIN, E. L. G.; ROEHRS, R. The phytoremediation potential of *Plectranthus neochilus* on 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and the role of antioxidant capacity in herbicide tolerance. **Chemosphere**, v. 188, p. 231-240, 2017a.

RANI, M., SHANKER, U., JASSAL, V. Recent strategies for removal and degradation of persistent & toxic organochlorine pesticides using nanoparticles: a review. **Journal of environmental management**, v. 190, p. 208-222, 2017.

RAPOSO, F., IBELLI-BIANCO, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 115913, 2020.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., & MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. D. L., FERREIRA, M. M. C., MORANO, S. C., SILVA, L. R. D., & SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

ROCHA, W. S., LOPES, R. M., SILVA, D. B. D., VIEIRA, R. F., SILVA, J. P. D., & AGOSTINI-COSTA, T. D. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33(4), 1215-1221, 2011.

RODRIGUES, V. D. C. **Compostos bioativos de chás: comparação das infusões a quente e a frio**. Dissertação (Universidade Tecnológica Federal do Paraná), 2015.

ROSA, A. S. **Fitorremediação de pesticidas utilizados em lavouras de arroz através do cultivo hidropônico de alface** (*Lactuca sativa* L.). Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana 2013.

ROSTAMI, S., AZHDARPOOR, A. The application of plant growth regulators to improve phytoremediation of contaminated soils: A review. **Chemosphere**, v. 220, p. 818-827, 2019.

S. REICHENBERGER, M. BACH, A. SKITSCHAK, H.G. FREDE. Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness: a review. **Science of the Total Environment**, v. 384, n. 1-3, p. 1-35, 2007.

SANDERMANN JR, Heinrich. Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. **Pharmacogenetics**, v. 4, n. 5, p. 225-241, 1994.

SANGCHAN, W., HUGENSCHMIDT, C., INGWERSEN, J., SCHWADORF, P. THAVORNYUTIKARN, K. PANSOMBAT, T. Streck Short-term dynamics of pesticide concentrations and loads in a river of an agricultural watershed in the outer tropics. **Agric. Ecosyst. Environ.** 158. p. 1-14. 2012.

SILVA, M. L. C., COSTA, R. S., DOS SANTOS SANTANA, A., KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-681, 2010.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants. **Revista de nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

STANGARLIN, J. R., KUHN, O. J., TOLEDO, M. V., PORTZ, R. L., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., PASCHOLATI, S. F. A. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*, Cascavel, 10(1), 18-46, 2011.

Stephenson, G. R., Ferris, I. G., Holland, P. T., & Nordberg, M. Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006). **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 11, p. 2075-2154, 2006.

STEPHENSON, G. R., FERRIS, I. G., HOLLAND, P. T., NORDBERG, M. GLOSSARY of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006). **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 11, p. 2075-2154, 2006.

TANG, X., ZHU, B., KATOU, H. A review of rapid transport of pesticides from sloping farmland to surface waters: Processes and mitigation strategies. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 3, p. 351-361, 2012.

TANG, X., ZHU, B., KATOU, H. A review of rapid transport of pesticides from sloping farmland to surface waters: Processes and mitigation strategies. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 3, p. 351-361, 2012.

TANGAHU B. V., ABDULLAH S.R.S., BASRI H., IDRIS M., ANUAR N., MUKHLISIN M. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2011, 2011.

TANGAHU, B. V., SHEIKH ABDULLAH, S. R., BASRI, H., IDRIS, M., ANUAR, N., & MUKHLISIN, M. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2011, 2011.

TENNESSEN, D. J., SINGSAAS, E. L., SHARKEY, T. D. Light-emitting diodes as a light source for photosynthesis research. **Photosynthesis research**, v. 39, n. 1, p. 85-92, 1994.

TERPINC, P., ABRAMOVIČ, H. A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 366-371, 2010.

TIKTAK, A., DE NIE, D. S., GARCET, J. P., JONES, A. O., VANCLOOSTER, M. Assessment of the pesticide leaching risk at the Pan-European level. The EuroPEARL approach. **Journal of Hydrology**, v. 289, n. 1-4, p. 222-238, 2004.

TIKTAK, A., DE NIE, D. S., PIÑEROSGARCET, J., JONES, A., VANCLOOSTER, M. Assessment of the pesticide leaching risk at the pan-European level: the Euro Pearl approach

WU, Q., RIISE, G., LUNDEKVAM, H., MULDER, J., & HAUGEN, L. E. Influences of suspended particles on the runoff of pesticides from an agricultural field at Askim, SE-Norway. **Environmental geochemistry and health**, v. 26, n. 2, p. 295-302, 2004.

WU, X., WANG, W., LIU, J., PAN, D., TU, X., LV, P., WANG, Y., CAO, H., WANG, Y., HUA, R. Rapid biodegradation of the herbicide 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid by *Cupriavidus gilardii* T-1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 18, p. 3711-3720, 2017.

XU, X., CAI, J., ZHOU, M., DU, X., ZHANG, Y. Photoelectrochemical degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid using electrochemically self-doped Blue TiO₂ nanotube arrays with formic acid as electrolyte. **Journal of hazardous materials**, v. 382, p. 121096, 2020.

YANG, X., FENG, Y., HE, Z., STOFFELLA, P. J. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v.18, p.339-353, 2005.

YOU, J., CHAN, Z. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 1092, 2015.

10. APÊNDICES

Apêndice 1 – Metodologia da quantificação do potencial antioxidante, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e ERO.

Preparo dos extratos de P. neochilus

Para o preparo dos extratos 0,5 gramas de folha previamente triturada foi adicionado a 50 mL de uma solução etanol/água (1:1) em um Erlenmeyer, e ficou aproximadamente 12 horas em agitação em 50 °C. As amostras foram filtradas e congeladas em -65 °C para análises posteriores. Este procedimento foi realizado com as folhas de todos os grupos de tratamento.

Quantificação do Potencial antioxidante

A medição do potencial antioxidante pelo poder da redução do íon ferro (FRAP) foi realizado pelo método adaptado para microplaca descrito por Urrea-Victória et al. (2016) seguido de nossas adaptações. Inicialmente 20 µL de extrato foi misturado com 180 µL da solução reagente contendo tampão acetato de sódio, TPTZ 0,83 mmol.L⁻¹ diluído HCl 40 mmol.L⁻¹, FeCl₃ 1,7 mmol.L⁻¹ em uma proporção 10:1:1. A mistura foi incubada a 37 ° C por 15 minutos e em seguida a leitura foi realizada a 593 nm. Uma curva de calibração com ácido ascórbico foi construída com 5 pontos entre 20 e 400 µg.mL⁻¹. Os resultados foram expressos em µgEAA.mL⁻¹ (micrograma de equivalentes de ácido ascórbico por mL de extrato).

Quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides totais

A quantificação dos fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu de Karou et al. (2005) de acordo com as alterações feitas por Faller e Fialho (2009) e o presente estudo. A solução de Folin foi preparada com o reagente Folin-Ciocalteu e água destilada 1: 1 (v / v). 15 µL da infusão foram adicionados à microplaca, mais 37,5 µL da solução de Folin. Após cinco minutos de reação, 37,5 µL de solução de carbonato de sódio (20%) foram adicionados e o volume foi extinto com água destilada até 300 µL. A solução foi incubada por 30 minutos em um ambiente privado de luz e depois lida a 750 nm. Os resultados foram expressos em microgramas de ácido gálico equivalente por mg de infusão (µgEAG/mg).

Os flavonoides totais foram medidos através do método descrito por Soares J. J. et al. (2017) com nossas modificações para leitura direta em placas de 96 poços. Inicialmente 50 mL de extrato (item 2.2) foi misturado com 50 µL de etanol, 10 µL de cloreto de alumínio 10%, 10 µL de Acetato de sódio 1 mol/L e 80 mL de H₂O destilada. Para propiciar a reação um período de 30 minutos foi esperado até a leitura em 415 nm. Um branco com 50 µL de extrato, 50 µL

de etanol e 100 μL de H_2O foi subtraído da absorbância da reação. Os resultados foram expressos em $\mu\text{gER/mL}$ de extrato (microgramas de equivalentes de rutina por mililitro de extrato) através da curva de calibração constituída de 6 pontos entre 2 e 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de rutina.

Níveis de Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Para a realização dos ensaios bioquímicos 0,5 gramas de raiz, caule ou folha dos diferentes tratamentos (individualmente) foram homogeneizados com 1 mL de Tris-HCl 50 mmol/L, o homogenato foi centrifugado a 11000 RPM a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e congelado a -60 °C para análises futuras.

Os níveis de espécies reativas de oxigênio foram avaliados também através do protocolo descrito por SHOHAEI et al. (2006) com nossas adaptações. Inicialmente 20 μL de amostra foram misturados com 160 μL de água e 20 μL de 2,7-diclorofluoreceína (DCF) 1mmol/L preparada momentos antes do uso em dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura foi realizada durante 30 minutos a cada 15 segundos por fluorescência com comprimento de onda de emissão de 525 nm e excitação de 485 nm, após esse período foi adicionado 20 μL de H_2O_2 e novamente foi realizada a leitura.