

**GEOVANA DA CRUZ PEREIRA**

**ESTUDO DE VIABILIDADE DE FITORREMEDIAÇÃO DE SULFENTRAZONE  
(BORAL 500) POR *Plectranthus neochilus* (BOLDO GAMBÁ) EM MEIO AQUOSO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA-RS), como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

**Orientador: Prof. Dr. Rafael Roehrs**

**Uruguaiana**

**2018**

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) .

P436e Pereira, Geovana da Cruz  
ESTUDO DE VIABILIDADE DE FITORREMEDIAÇÃO DE SULFENTRAZONE  
(BORAL 500) POR *Plectranthus neochilus* (BOLDO GAMBÁ) EM MEIO  
AQUOSO / Geovana da Cruz Pereira.  
77 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2018.

"Orientação: Rafael Roehrs".

1. Fitorremediação. 2. Sulfentrazone. 3. *Plectranthus*  
*neochilus*. 4. Herbicida. 5. Boral 500. I. Título.

**GEOVANA DA CRUZ PEREIRA**

**ESTUDO DE VIABILIDADE DE FITORREMEDIAÇÃO DE SULFENTRAZONE  
(BORAL 500) POR *Plectranthus neochilus* (BOLDO GAMBÁ) EM MEIO AQUOSO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA-RS), como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

**Orientador: Prof. Dr. Rafael Roehrs**

Dissertação Aprovada em: 17 de maio de 2018.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Rafael Roehrs  
(Orientador)  
(UNIPAMPA)

---

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim  
(UNIPAMPA)

---

Dr. Jefferson de Jesus Soares  
(UNIPAMPA)

**Uruguaiana  
2018**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que sempre me apoiou e acreditou em mim, muitas vezes mais do que eu mesma. Em especial dedico aos meus pais, por estarem ao meu lado em todos os momentos e serem sempre o ponto de referência para onde posso voltar sempre que me perco. Se tive algumas conquistas na vida, foi devido a esta fonte de amor e compreensão que nunca me deixou desistir.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar devo agradecer às forças que me mantêm em pé, minha grande mãe Nanã e meu pai Oxalá que junto a todos os guias espirituais me ajudaram nos momentos de desespero e iluminaram nos momentos de sabedoria.

À minha família, minha fonte de amor e firmeza. Sem eles e sua fé em mim tudo seria mais difícil. Ao meu irmão Júnior, que mesmo com nossa distância, sempre foi uma certeza de apoio. Aos meus pais em especial, Ana e Luiz, por toda compreensão, carinho profunda crença de que sempre posso ir mais longe. Sempre farei tudo para orgulhá-los e ser digna do esforço que fazem e já fizeram por nós.

Obrigada ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Roehrs, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e aceitar me orientar no mestrado. Seu apoio, incentivo e paciência foram muito importantes durante a construção desse trabalho. Agradeço, ainda, ao amigo Rafael. Sou grata pela amizade, acolhimento, companhia e o grande incentivo dentro e fora da universidade.

Agradeço aos meus colegas do Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Práticas de Ensino (GIPPE) e colegas de laboratório pela companhia nos dias de trabalho e momentos de diversão e companheirismo entre um experimento e outro, um cafezinho ou chimarrão. Vocês são demais!

Agradeço especialmente a Maria, que com sua cara séria e tom de ordem (que as vezes me intimidavam), e entre um doce de suborno e outro (para desfazer a carranca), foi essencial no decorrer do último ano. Obrigada 'Mary', você foi uma grande companheira de trabalho e se alguém muito querida por mim.

Agradeço às amigas de caminhada Tatiana, Flávia, Ethielle, Matheus. À quem se ausentou mas sempre terá seu lugar, Cacau. À Ritinha por toda sua boa vontade e preocupação, à Dandara pela paciência em me receber em sua casa (mesmo sem opção) e incentivo para 'desencanar'.

Agradeço ao Recí, por sempre garantir aquela cerveja bem gelada que aliviaram os momentos de estresse.

Agradeço aos membros da banca, Jefferson de Jesus Soares e Clésio Soldateli Paim, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica pela oportunidade. Ao professor Vanderlei Folmer por me apresentar esse universo de possibilidades e me dar uma perspectiva mais ampla da academia.

Agradeço especialmente a Universidade Federal do Pampa, pelo privilégio de ingressar nessa Universidade e transformar minha forma de ver o mundo. Sou grata pelas professoras que conheci, as quais admiro e tenho como referência, por todas as oportunidades e ensinamentos que mudaram minha história.

E por fim, talvez parecendo arrogante, sou grata a mim, por ter entendido que não posso me acomodar no que é fácil e não posso fugir do que é difícil. Sou grata pela compreensão de que não posso ficar parada assistindo o mundo passar, mesmo que o enfrentamento seja dolorido e a mudança exija tempo.

## EPÍGRAFE

*Não tenha medo do caminho, tenha medo de não  
caminhar*

*O Vendedor de Sonhos*

## **RESUMO**

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

### **Estudo de viabilidade de fitorremediação de Sulfentrazone (Boral 500) por *Plectranthus neochilus* (Boldo Gambá) em meio aquoso**

AUTOR: Geovana da Cruz Pereira

ORIENTADOR: Rafael Roehrs

Data e Local de Defesa: Uruguaiana, 17 de maio de 2018.

A agricultura moderna é estritamente dependente do uso de pesticidas para manutenção do seu nível de produtividade. Contudo, sabe-se que a maioria destes produtos pode apresentar efeitos adversos no ambiente, como afetar organismos não alvo e promover a contaminação tanto do solo quanto do meio aquático. A dinâmica dos pesticidas no ambiente é dependente de diferentes mecanismos que influenciam seu destino após aplicação e seu período de meia vida. Sulfentrazone é um pesticida amplamente utilizado em uma variedade de culturas e age inibindo a enzima protoporfirinogênio oxidase e, conseqüentemente, inibindo a síntese da clorofila. A dissipação desse herbicida no ambiente, bem como, sua toxicidade em culturas rotacionais são problemas que afetam organismos não alvo de sua ação, o que traz a necessidade de encontrar alternativas para reverter essa situação. A fitorremediação é uma alternativa para limpeza de locais contaminados que utiliza os processos fisiológicos naturais das plantas como forma de captação de poluentes. Esse recurso se tornou popular por ser amigável ao meio ambiente, de fácil aplicação in situ, de baixo custo, podendo ser utilizado em uma variedade e contaminantes. Sendo assim, estudos para identificação de plantas que sejam

aptas a realizar a fitorremediação de pesticidas são essenciais para que essa tecnologia possa ser aplicada de forma eficiente. O *plectranthus neochilus* (boldo gambá) é uma espécie que apresenta conhecido potencial para fitorremediar herbicida em meio aquoso e devido a isso, foi selecionada para o estudo. Considerando o acima exposto, o objetivo deste trabalho foi: 1) avaliar o potencial fitorremediador do *plectranthus neochilus* para o herbicida sulfentrazone; e para isto 2) desenvolver e validar um método de análise para este herbicida por HPLC-DAD e 3) um método de extração utilizando a técnica de extração em fase sólida, do inglês SPE, com sorvente C18. Os métodos desenvolvidos se mostraram eficientes, confiáveis, com boa repetibilidade para a determinação do composto de interesse na matriz utilizada. No ensaio de fitorremediação, o *p. neochilus* foi colocado em solução aquosa contendo sulfentrazone (10.30 mg/L) durante 32 dias em temperatura ambiente. Foram coletadas amostras para análise a cada oito dias de cultivo. Houve redução na concentração de herbicida e notável tolerância da planta a dose elevada do composto. Os resultados evidenciam o potencial do *p. neochilus* como planta remediadora de água contaminada por sulfentrazone em matriz aquosa.

**Palavras chave:** sulfentrazone, *plectranthus neochilus*, fitorremediação, água

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Program of Post-Graduation in Biochemistry  
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA-RS)

### **Phytoremediation feasibility study of Sulfentrazone (Boral 500) by *Plectranthus neochilus* (Boldo Gambá) in aqueous medium**

AUTHOR: Geovana da Cruz Pereira

ADVISOR: Rafael Roehrs

Date and Place of Defense: Uruguaiiana, May 17<sup>th</sup>, 2018.

Modern agriculture is strictly dependent on the use of pesticides to maintain its level of productivity. However, it is known that most of these products may have adverse effects on the environment, such as affecting non-target organisms and promoting contamination of both soil and aquatic environment. The dynamics of pesticides in the environment are dependent on different mechanisms that influence their fate after application and their half-life. Sulfentrazone is a pesticide widely used in a variety of crops and acts by inhibiting the protoporphyrinogen oxidase enzyme and, consequently, inhibiting the synthesis of chlorophyll. The dissipation of this herbicide in the environment, as well as its toxicity in rotational crops are problems that affect non-target organisms, which brings the need to find alternatives to reverse this situation. Phytoremediation is an alternative for cleaning contaminated sites that uses the natural physiological processes of plants as a way of collecting pollutants. This feature has become popular because it is environmentally friendly, easy to apply in situ, low cost and can be used in a variety of contaminants. Thus, studies to identify plants that are capable of performing phytoremediation of pesticides are essential for this technology to be applied efficiently. The *plectranthus neochilus* (boldo gambá) is a species that presents a known potential to phytoremediate herbicide in aqueous medium and because of this, was selected

for the study. Considering the above, the objective of this work was: 1) to evaluate the potential phytoremediator of the opossum boldo for the sulfentrazone herbicide; 1) to evaluate the phytoremediation potential of the *plectranthus neochilus* for the sulfentrazone herbicide; and for this purpose 2) to develop and validate a method of analysis for this herbicide by HPLC-DAD and 3) an extraction method using the SPE English solid phase extraction technique with C18 sorbent. The methods developed proved to be efficient, reliable, with good repeatability for the determination of the compound of interest in the matrix used. In the phytoremediation assay, *p. neochilus* was placed in aqueous solution containing sulfentrazone (10.30 mg/L) for 32 days at room temperature. Samples were collected for analysis every eight days of culture. There was a reduction in concentration and marked tolerance at high doses of the compound. The results evidenced the potential of *plectranthus neochilus* as water remediation plant contaminated by sulfentrazone in aqueous matrix.

**Key words:** sulfentrazone, *plectranthus neochilus*, phytoremediation, water

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Figura 1:</b> Rotas de degradação dos pesticidas no ambiente.....	21
<b>Figura 2:</b> Fórmula estrutural do sulfentrazone.....	23
<b>Figura 3:</b> Etapas de extração por SPE.....	27
<b>Figura 4:</b> Mecanismos de fitorremediação.....	38
<b>Figura 5:</b> Imagem ilustrativa da floração.....	43

### ARTIGO CIENTÍFICO

<b>Figure 1-</b> Effect of the sulfentrazone herbicide toxicity on the roots of the boldo at the concentrations of 80 kg/ha and 8 kg/ha with one week of experiment and 0.8 kg/ha with two weeks of experiment.....	54
<b>Figure 2-</b> Remediation of sulfentrazone pesticide by <i>Plectranthus neochilus</i> .....	57

## LISTA DE TABELAS/QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Estratégias de Fitorremediação.....	37
<b>Tabela 1:</b> Informação sobre a toxicidade de pesticidas presente nos rótulos.....	20
<b>Tabela 2:</b> Valores obtidos para o número de pratos teóricos e altura equivalente de um prato teórico.....	63

## LISTA DE SIGLAS

**ACN**- Acetonitrila

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**C18** – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C-18, octadecilsilano

**DAD** – Detector por arranjo de diodos, do inglês *Diode Array Detection*

**GC-MS** – Cromatografia a gás com detector por espectrometria de massas, do inglês *Gas Chromatography with mass spectrometry detector*

**GSTs** – Glutathione S transferases

**CLAE**- Cromatografia a líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

**CLAE-DAD** – Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector por arranjo de diodos

**HPLC**- High Performance Liquid Chromatography

**HPLC-DAD**- High Performance Liquid Chromatography with diode array detector

**INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

**IUPAC** – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *Union International of Pure and Applied Chemistry*

**Kg/ha** – Quilograma por hectare

**Kg/L**- Quilograma por litro

**KOW log P** – Coeficiente de partição octanol-água

**LC**- Cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*

**LC-MS** – Cromatógrafo a líquido com detector por espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography with mass spectrometry detector*

**LLE**- Extração líquido-líquido

**LOD** – Limite de detecção, do inglês *Limit of Detection*

**LOQ** – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

**mg/L**- Miligrama por Litro

**µg/L**- Micrograma por litro

**µL**- Microlitro

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**pKa** – Potencial de constante de ionização ácida

**PROTOX-** Protoporfirogênio oxidase

**PROTO IX-** Protoporfirina IX

**r<sup>2</sup>** – Coeficiente de determinação

**rec** - Recuperação

**RSD** – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

**SD-** Desvio Padrão, do inglês *Standard Deviation*

**SPE** – Extração por fase sólida, do inglês *solid phase extraction*

**UV-** Ultravioleta

**UV- Vis** - Ultravioleta-visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
2.1 USO DE PESTICIDAS E O IMPACTO AMBIENTAL.....	19
2.2 PESTICIDA DO ESTUDO: SULFENTRAZONE.....	23
<b>2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE SULFENTRAZONE</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS</b> .....	<b>28</b>
2.4.1 LOD e LOQ.....	28
2.4.2 CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE.....	29
2.4.3 SELETIVIDADE.....	30
2.4.4 EXATIDÃO.....	31
2.4.5 RECUPERAÇÃO.....	31
2.4.6 PRECISÃO.....	32
2.4.7 REPETITIVIDADE.....	32
2.4.8 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	33
2.4.9 REPRODUTIBILIDADE.....	33
2.4.10 EFEITO MATRIZ.....	34
<b>2.5. PROCESSOS DE REMEDIAÇÃO</b> .....	<b>34</b>
2.5.1 FITORREMEDIAÇÃO.....	36
2.5.2 VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA FITORREMEDIAÇÃO.....	40
<b>2.6 A PLANTA SELECIONADA PARA O ESTUDO</b> .....	<b>42</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>45</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>63</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>66</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade agrícola é estritamente vinculada ao uso de pesticidas e, segundo Estévez et al. (2008), nos últimos 50 anos o uso desses produtos químicos aumentou consideravelmente a produtividade e a qualidade dos alimentos para a crescente população mundial. Contudo, sabe-se que a maioria destes produtos pode apresentar efeitos adversos no ambiente, como afetar organismos não alvo e promover a contaminação tanto do solo quanto do meio aquático. Somado a isso, o entendimento que o uso inadequado de agrotóxicos afeta os seres humanos através do consumo de alimentos que podem conter resíduos desses produtos apenas aumenta a preocupação sobre o risco generalizado que sua utilização desmedida pode representar (MARGNI et al., 2002; ESTÉVEZ et al., 2008). O comportamento dos pesticidas no ambiente é influenciado por vários fatores que abrangem desde a forma correta de aplicação a processos biológicos, físicos e químicos. Quando aplicados no ambiente, em torno de 55% dos pesticidas não atingem o alvo e se dispersam entre solo, água e atmosfera (MARTINI et al., 2012). A dinâmica dos pesticidas aplicados no ambiente é dependente de diferentes mecanismos como retenção (absorção e adsorção) e transporte (deriva, volatilização, lixiviação, escoamento superficial), tais processos definem o destino desta substância no solo, sua persistência e eficiência agrícola (SPADOTTO et al., 2004). Além disso, as condições do solo e climáticas também influenciam no comportamento destes composto.

Dos mecanismos acima, a lixiviação e o escoamento artificial destacam-se no que diz respeito a contaminação de águas subterrâneas e superficiais, respectivamente, sendo o uso de herbicidas uma importante fonte de poluição (NIR et al., 2012). Nesse contexto, o herbicida sulfentrazone, que apresenta tempo de meia vida relativamente longa no ambiente (até 302 dias, conforme as condições) e uma elevada mobilidade no solo, dependente do pH (SZMIGIELSKI et al., 2009), pode ser considerado um poluente em potencial.

Sulfentrazone [N-[2,4-dicloro-5-[4-(difluorometil)-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il] fenil] metanosulfonamida], princípio ativo do herbicida comercial Boral 500 SC, é um dos mais utilizados em pré e pós-emergência nas plantações de soja, abacaxi, fumo, algodão, cana-de-açúcar, entre outros. É membro da família química aril triazolinona e inibe a protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) na biossíntese de clorofila. Devido a esta

inibição, a protoporfirina IX (Proto IX) se acumula, permitindo a formação de oxigênio singlete, responsável pela peroxidação do plasmalema e do tonoplasto. Além do acúmulo de Proto IX e produção de oxigênio singlete, a produção de heme e clorofila é inibida devido ao bloqueio desta via (THOMAS et al., 2005).

Na literatura, encontra-se trabalhos que discutem a dissipação deste herbicida em solo e o seu potencial de lixiviação (PASSOS et al., 2015; SHANER, 2012; FAUSTINO et al., 2015), bem como, a fitotoxicidade para plantas em sistemas de cultivos rotacional (SZMIGIELSKI et al., 2009; THORNGREN et al., 2017). Uma alternativa para reverter contaminação por este produto, sem causar grande impacto no meio ambiente, é a utilização de plantas como uma tecnologia para descontaminação ambiental.

Fitorremediação é o nome do processo que utiliza as plantas como um recurso para remoção, degradação ou estabilização de contaminantes ambientais, sejam orgânicos ou inorgânicos, através dos processos fisiológicos naturais da planta e sua interação com a microbiota presente na rizosfera (MEDEIROS, 2015; LAMEGO e VIDAL, 2007). Tendo em vista a grande diversidade de espécies vegetais é importante identificar os mecanismos que as plantas utilizam para tratar de compostos estranhos a seu metabolismo. A presença do pesticida é um estresse ambiental que pode afetar a homeostase celular e aumentar a produção de agentes oxidantes, que são produzidos naturalmente pelo metabolismo vegetal (FOYER e NOCTOR, 2005). Além da resistência metabólica, para escolha da espécie fitorremediadora, é preciso considerar características como um rápido crescimento, elevada produção de biomassa e tolerância à poluição (LAMEGO e VIDAL, 2007; MEDEIROS, 2015). Sendo assim, estudos para identificação e seleção de plantas que sejam aptas a realizar a fitorremediação de pesticidas são essenciais para que essa tecnologia possa ser aplicada de forma eficiente.

O boldo gambá (*Plectranthus neochilus*) é uma espécie que apresenta conhecido potencial para fitorremediar herbicida em meio aquoso, como mostra o trabalho de Ramborger et al. (2017), e se mostra bastante resistente e adaptada às condições climáticas da região. Devido a isso, foi selecionada para o ensaio de fitorremediação do sulfentrazone.

Considerando o acima exposto, o objetivo deste trabalho foi: 1) avaliar o potencial fitorremediador do boldo gambá para o herbicida sulfentrazone; e para isto 2) desenvolver e validar um método de análise para este herbicida por HPLC-DAD e 3) desenvolver e validar

um método de extração utilizando a técnica de extração em fase sólida, do inglês SPE, com sorvente C18.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Uso de pesticidas e o impacto ambiental**

Segundo Spadotto et al. (2004), o desenvolvimento da síntese orgânica durante a Segunda Guerra Mundial e a consolidação do padrão tecnológico na agricultura tiveram papel fundamental no avanço da indústria de agrotóxicos (ou pesticidas). A partir desses acontecimentos e, somado ao crescimento populacional, houve a necessidade de tornar a produção agrícola adequada à demanda da população, o que conduziu a busca de produtos mais eficientes (VEIGA, 2006). O marco da transição das técnicas de controle agrícola foram as descobertas das propriedades inseticidas do organoclorado DDT em 1939.

No modelo da agricultura moderna, os pesticidas são componentes que desempenham um papel vital para manutenção da alta produtividade agrícola. Em consequência, o uso generalizado de pesticidas para controle de pragas em um sistema de produção intensiva se tornou dominante (JALLOW et al., 2017). Entretanto, não é um fato recente que a preocupação com a contaminação ambiental decorrente do uso destes produtos químicos assumiu grande importância (CHOWDHURY et al., 2008). A maioria dos pesticidas aplicados em terras agrícolas podem afetar organismos não-alvo e contaminar os meios de solo e água. Devido a isso, a carga residual gerada pelo uso intensivo destes compostos têm se tornado uma crescente preocupação de que os pesticidas constituam um risco para a população em geral e meio ambiente (MARGNI et al., 2002).

Os pesticidas são moléculas sintetizadas com objetivo de afetar determinadas reações bioquímicas de organismos indesejados (sejam insetos, micro-organismos, animais e plantas) que se quer controlar ou eliminar. No entanto, alguns destes processos são comuns a todos os seres vivos, e assim, o efeito pode atingir não somente o organismo que se espera controlar, como também outros seres vivos (ROSA, 2013). O termo pesticida inclui: acaricidas (combate ácaros), algicida (combate algas), avicidas (combate aves), bactericidas (combate bacterias), cupicidas (combate cupins), desinfetante (combate microrganismos),

fungicidas (controle de fungos), herbicidas (combate plantas invasoras), inseticidas (controle de insetos), larvicidas (combate larvas de insetos), moluscicidas (combate moluscos), nematocidas (combate nematoides), piscicidas (combate peixes), raticidas (combate roedores) (RAMBORGer, 2017).

Os pesticidas são classificados de acordo com sua toxicidade que é expressa em valores referentes à Dose Letal ( $DL_{50}$ ). A  $DL_{50}$ , por sua vez, é representada por miligramas do ingrediente ativo do produto por quilograma de peso vivo, necessários para matar 50% da população de ratos ou de outro animal teste. Esse valor é usado para definir as medidas de segurança a serem seguidas para reduzir os riscos que o produto pode causar à saúde humana.

A legislação brasileira alerta quanto ao risco que os pesticidas podem causar ao obrigar que as formulações comerciais apresentem no rótulo a cor correspondente à classe e sua toxicidade, como mostra na tabela abaixo.

Tabela 1: Informação sobre a toxicidade de pesticidas presente nos rótulos.

Classe	Classificação	Cor da faixa no rótulo
I	Extremamente tóxico ( $DL_{50}$ menor que 50 mg/Kg de peso vivo)	Vermelho vivo
II	Altamente tóxico ( $DL_{50}$ 50 mg a 500 mg/Kg de peso vivo)	Amarelo intenso
III	Medianamente tóxico ( $DL_{50}$ de 500 mg a 5000 mg/Kg de peso vivo)	Azul intenso
IV	Pouco tóxico ( $DL_{50}$ maior que 5000 mg/Kg de peso vivo)	Verde intenso

Fonte: Adaptado de Agência Embrapa de Informação Tecnológica (online)

De forma geral, os primeiros pesticidas sintetizados continham as seguintes características: eram estáticos, possuíam baixa solubilidade e tinham um forte poder de adesão ao solo. Isso mudou com a evolução tecnológica onde eles passaram a ser mais solúveis em água, com baixa capacidade de adesão e maior volatilidade. Tais inovações tecnológicas baseadas em manipulação de compostos orgânicos trouxeram compostos com maior toxicidade, persistência e eficientes em combater as pragas. Como consequência, as alterações tecnológicas nas características químicas destas moléculas aumentaram e prolongaram seu potencial nocivo para causar danos à saúde humana e ao meio ambiente (VEIGA, 2006). Após serem aplicados, os pesticidas estão sujeitos a vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos que influenciam seu comportamento. No ambiente, seu destino é governado por processos de retenção (sorção, absorção e adsorção), de transformação

(degradação química e biológica), de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e escoamento superficial) e por interações desses processos. A persistência e eficiência agronômica são determinadas de acordo com as diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas e condições ambientais (SPADOTTO et al., 2004) (Figura 1).



Figura 1: Rotas de degradação dos pesticidas no ambiente

Fonte: Retirado de GEBLER, 2004.

Além dessa variedade de processos que influenciam o destino ambiental dos pesticidas, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, podem afetar esses processos. As condições meteorológicas locais, as características microbiológicas e físico-químicas do solo, presença ou ausência de vegetação, a área topográfica e o manejo de solo também podem afetar o destino do pesticida no ambiente. Além disso, a taxa e a quantidade de água que se move na superfície do solo também interfere na mobilidade do pesticida (VEIGA, 2006).

É importante considerar que alguns aspectos da contaminação do ambiente estão relacionados com forma de aplicação dessas substâncias. Diversos produtos com elevada toxicidade e eficácia no controle de determinadas pragas são registrados para algumas culturas e muitas vezes, devido a sua eficiência, são utilizados em culturas para as quais não

são recomendados. Além disso, ocorre também a aplicação de produtos em quantidades maiores do que as recomendadas pelo fabricante, as quais são recomendadas baseadas em estudos ecotoxicológicos (DELLAMATRICE e MOTEIRO, 2014). Como resultados os alimentos e o ambiente poderão apresentar teores de resíduos acima dos níveis recomendados pela legislação (MELO et al., 2010). Acima dos valores recomendados pelo fabricante, os pesticidas podem causar efeitos sérios que não foram previstos na liberação para uso. Dessa forma, o uso frequente ou incorreto desses compostos gera contaminações não apenas no solo, onde é aplicado, mas também na atmosfera, alimentos, águas superficiais e subterrâneas. Ainda, a disseminação dos pesticidas pelo ambiente afeta ecossistemas terrestres e aquáticos, culminando em uma degradação ambiental. O impacto do aumento da produção agrícola no ambiente é notado pela perda da biodiversidade e da qualidade dos recursos hídricos (DELLAMATRICE e MOTEIRO, 2014).

Outro fator a ser considerado na contaminação ambiental é a biomagnificação. Devido a sua natureza persistente e não biodegradável, alguns pesticidas são acumulados e tem sua concentração aumentada nos tecidos dos organismos a cada nível sucessivo da cadeia alimentar. Em consequência, os organismos nos níveis mais altos da cadeia alimentar apresentam maiores danos quando comparados com os de níveis mais baixos (GILL e GARG, 2014). Esse aspecto deve ser considerado na aplicação agrícola desses compostos. Nesse sentido, os danos podem chegar aos seres humanos, que se tornam alvos da bioacumulação uma vez que, ao se alimentar de vegetais e animais contaminados, são capazes de acumulá-los nos tecidos lipídicos, fígado, rins, cérebro e coração (MELO et al., 2010; ABRASCO, 2012).

Os pesticidas podem entrar no corpo humano por contato direto com produtos químicos (por exemplo, atividade laboral), através de alimentos, especialmente frutas e vegetais, água contaminada ou ar poluído (GILL e GARG, 2014). Segundo relatório da Vigilância Sanitária, a população brasileira em geral está exposta a pesticidas, seja nos alimentos vendidos no varejo ou na água para consumo humano (BRASIL, 2016). Os pesticidas constituem hoje um importante problema de saúde pública, tendo em vista a amplitude da população exposta na indústria e em seu entorno, no meio rural, no combate às endemias e outros setores, nas proximidades de áreas agrícolas, além de todos nós, consumidores dos alimentos contaminados (RIGOTTO et al., 2014).

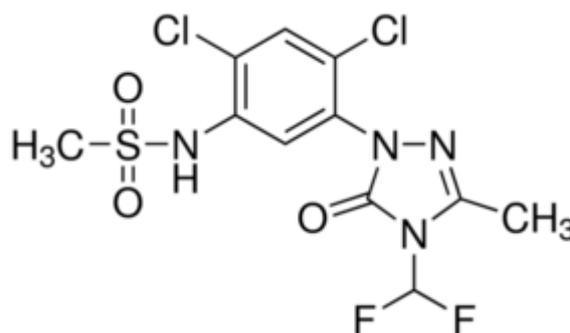
Mesmo reconhecendo a potencial toxicidade dos pesticidas para os humanos, seu uso permanece bastante difundido devido a sua importância para o agronegócio (MELO et al., 2010). A exposição humana aos pesticidas pode ocorrer, também, em atividades laborais,

como no caso de trabalhadores agrícolas, da indústria de pesticidas e exterminadores de pragas domésticas. Independente da atividade envolver uso de pesticida, basta que estes produtos químicos estejam no ambiente de trabalho para configurar uma potencial exposição ocupacional (DAMALAS e ELEFTHEROHORINOS, 2011).

## 2.2. PESTICIDA DO ESTUDO: SULFENTRAZONE

O herbicida sulfentrazone [N-[2,4-dicloro-5-[4-(difluorometil)-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1 H-1,2,4-triazol-1-il] fenil] metanosulfonamida] (Figura 2) é um dos mais amplamente utilizados em pré e pós- emergência nas plantações de soja, cana-de-açúcar e reflorestamento no Brasil. Pertencente ao grupo químico das triazolonas e apresenta atividade inibidores da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), a qual é responsável pela oxidação do protoporfirinogênio à protoporfirina IX, na biossíntese da clorofila (PASSOS et al., 2015).

Figura 2: Fórmula estrutural do sulfentrazone



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/34554?lang=pt&region=BR>.

No ambiente, o sulfentrazone tem meia-vida estimada no solo entre 110 e 280 dias, variando de acordo com as condições edafoclimáticas locais (US-EPA, 1997). Em solo arenoso sua meia vida pode chegar a 121 dias, já em solo argiloso sua meia vida pode ser de 302 dias. Sua elevada atividade residual, podendo persistir por anos no solo, pode causar lesões de culturas sensíveis em sucessão, bem como, aumentar o risco de contaminação ambiental (MELO et al., 2017). O sulfentrazone se comporta como um ácido fraco, com pKa 6,56 e  $K_{ow} = 1,48$ , com alta solubilidade em água que depende do pH (110 e 1.600 mg L<sup>-1</sup> para

pH 6 e 7,5, respectivamente) e pressão de vapor de  $1 \times 10^{-9}$  mm Hg a 25 °C (SHANER, 2012; US-EPA, 1997). A molécula de sulfentrazone é estável em meio ácido, porém, suscetível a hidrólise em meio alcalino (OLIVEIRA et al., 2014); extremamente suscetível a fotólise direta em água, muito estável para fotólise no solo; apresenta baixa volatilidade em solo e água (US-EPA, 1997); e sua mobilidade está diretamente relacionada com o pH do solo, tendo um grande potencial de lixiviação dependente do pH e textura. Por exemplo, em pH elevado sua capacidade de adsorção é reduzida (SHANER, 2012). Outro fator que interfere na lixiviação deste pesticida é composição do solo e teor de matéria orgânica (PASSOS et al., 2015). A degradação do sulfentrazone no ambiente ocorre primeiramente pela atividade de microrganismos. Esse processo pode ser influenciado pela umidade e temperatura, uma vez que esses fatores afetam a proliferação desses organismos (MARTINEZ et al., 2008).

Com base em uma bateria de estudos de toxicidade aguda, este herbicida é classificável como categoria de Toxicidade III e não cancerígeno. Segundo informado pela US-EPA (1997), em estudos sobre a toxicidade aguda, o sulfentrazone causou toxicidade no desenvolvimento e reprodução. Os resultados desses estudos provocaram um alto nível de preocupação, uma vez que os estudos de toxicidade do desenvolvimento demonstraram toxicidade embrionária/fetal em níveis de tratamento que não eram tóxicos para a mãe, e os efeitos tóxicos significativos foram observados principalmente nos animais de segunda geração do estudo de reprodução. Como esses animais foram expostos ao sulfentrazone no útero, sugeriu-se a possibilidade de a toxicidade reprodutiva observada resultar de um mecanismo de desenvolvimento e/ou genotóxico. Considerando estudos como o anteriormente citado e o pouco conhecimento que se tem sobre a toxicidade embrionária /fetal do sulfentrazone, em 2007, Castro et al. investigaram os efeitos da exposição materna ao herbicida sobre os parâmetros físicos e neuro comportamentais no desenvolvimento de filhotes de ratos. Os resultados demonstraram alterações significativas na idade pós-natal, na qual foram observados retardo no desenvolvimento na abertura de orelhas e do olho e na descida dos testículos. A dose mais alta testada (50 mg/L) apresentou redução no ganho de peso do filhote e da mãe quando tratada em período gestacional, além disso, o estado funcional do sistema nervoso das crias de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento pós-natal mostrou alguns atrasos no desenvolvimento do reflexo de endireitamento, geotaxia negativa, resposta de aderência e coordenação motora - locomoção e criação (21-90 dias de vida) nos grupos tratados. Tais resultados enfatizam que a exposição materna ao sulfentrazone pode levar a alguns déficits neuromusculares e comportamentais em filhotes. Já no trabalho

de Bianchi et al. (2016), foram avaliados os efeitos citotóxicos e genotóxicos em organismos não-alvo expondo sementes de *Allium cepa* à concentração de campo, a qual causou efeitos citotóxicos ao induzir fragmentação nuclear e inibição da divisão celular enquanto concentrações menores indicaram efeitos genotóxicos para este herbicida.

### 2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE SULFENTRAZONE

Técnicas cromatográficas são tradicionalmente utilizadas para a determinação de pesticidas. Nas análises químicas essas técnicas ganham importância devido a sua facilidade para efetuar as separações, identificar e quantificar as espécies químicas de interesse por meio de detectores específicos, que variam de detectores que atuam na faixa do ultravioleta-vísivel, por fluorescência, captura de elétrons, arranjo de diodos. Tais técnicas também podem ser utilizadas em conjunto com outras, como as espectroscópicas e eletroanalíticas (GALLI et al., 2006). A cromatografia líquida de alta eficiência (no inglês High Performance Liquid Chromatography, HPLC) é a abordagem preferida para pesticidas polares e termicamente lábeis, com detecção convencional de detecção UV ou de arranjo de diodos (DAD) (CALDAS et al., 2009).

A aplicação de (HPLC-DAD) pode ser útil para a identificação correta de pesticidas em matrizes complexas e a uma melhor separação entre os analitos e os componentes da matriz. Por exemplo, no caso de compostos da matriz co-eluídos terem o mesmo tempo de retenção que o analito, se esse interferente demonstrar diferente absorção do espectro UV-Vis, então a identificação e quantificação poderá ser feita. Assim, HPLC-DAD fornece uma oportunidade para explorar todos os comprimentos de onda no UV, melhorando a seletividade e permitindo a identificação dos compostos não apenas pelo seu comportamento de retenção, mas também por suas propriedades espectrais no UV (PARRILLA et al., 1994; TUZIMSKI e REJCZAK, 2016).

Muitas vezes é necessário utilizar outras técnicas como a espectrometria de massa (mass spectrometry, MS) para identificar os analitos separados pela técnica cromatográfica (BRONDI et al., 2011). A LC-MS ou LC-MS/MS permitem identificar compostos de interesse com um nível maior de confiança, o que nem sempre ocorre com DAD quando aparecem substâncias interferentes. No entanto, HPLC-DAD é uma técnica menos dispendiosa e

suficientemente sensível para análise de amostras que foram submetidas a algum tipo de preparo de amostra sendo extraídas, concentradas e purificadas (TUZIMSKI e REJCZAK, 2016).

Usualmente, pesticidas em água são extraídos e concentrados pelos métodos de extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). Na extração líquido-líquido ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (QUEIROZ et al., 2001).

A extração em fase sólida (no inglês solid phase extraction, SPE) é uma técnica de separação líquido-sólido extensamente empregada para extrair analitos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas, mas também pode ser usada para amostras sólidas pré-extraídas com solventes (JARDIM, 2010). Enquanto a SPE consome quantidades bastante reduzidas de solvente orgânico e uma é um processo simples e rápido, a LLE frequentemente necessita de uma grande quantidade de solvente, exige bastante tempo em sua execução e é de difícil automação (CALDAS et al., 2009).

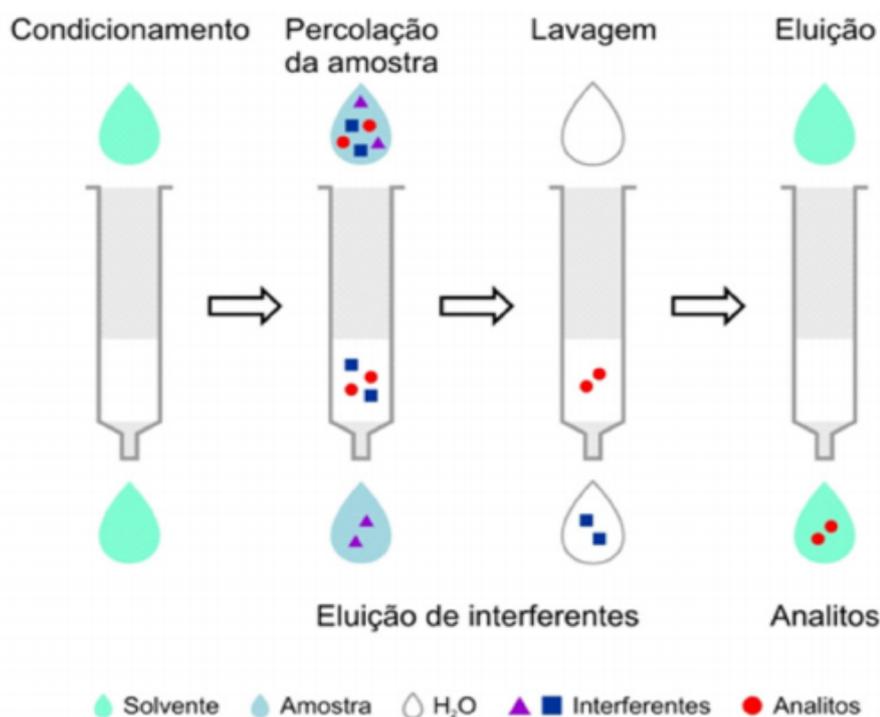
Atualmente a SPE é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas (QUEIROZ *et al.*, 2001). Basicamente, SPE emprega fases sólidas, também denominadas de sorventes, recheadas em cartuchos nas formas de barril ou seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60 µm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros (JARDIM, 2010).

Em geral, nos procedimentos de SPE são realizadas as seguintes etapas:

- 1- Ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis e condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra;
- 2- Introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes;
- 3- Limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito;
- 4- Eluição e coleta do analito.

A figura 3 mostra as etapas envolvidas no processo de extração por fase sólida (SPE).

Figura 3: Etapas de extração por SPE



Fonte: Caldas et al., 2011.

Vários tipos de sorventes estão disponíveis comercialmente, entre os mais utilizados são C8, C18, carbono grafitizado, resina trocadora iônica e materiais poliméricos. Segundo Caldas et al. (2011), para análises ambientais e extração de pesticidas em matriz aquosa sorventes hidrofóbicos e não seletivos, como C18, tem sido usado. Para esse tipo de sorvente o principal mecanismo de ação é são as interações apolares entre as ligações C-H do grupo C18 e C-H do analito (QUEIROZ et al., 2006; CALDAS et al., 2011).

Inúmeros trabalhos vêm sendo feitos utilizando SPE para determinação de pesticidas em águas e fluídos biológicos (RAMBORGGER et al., 2017; REYES et al., 2011; MARTÍNEZ et al., 2000; XU et al., 2014). Entretanto, para o herbicida sulfentrazone ainda é mais comum encontrar métodos mais tradicionais de preparo de amostra. Podemos verificar isso no trabalho de Martínez et al. (2008), onde foi utilizado a extração por refluxo e para limpeza e concentração da amostra sorvente C8 e sílica gel (MARTINEZ et al., 2008). Passos et al. (2015) utilizou extração sólido-líquido com baixa temperatura de partição para obter o herbicida em diferentes tipos de solo; Thorngren et al. (2017) extraiu sulfentrazone de uma amostra de solo por agitação rotatória (16 h) e para extração em uma amostra d'água utilizou SPE com cartucho C8. Na literatura consultada, não foram encontrados artigos onde

utilizaram SPE com cartucho C18 para extração/limpeza/concentração de sulfentrazone a partir de matriz aquosa.

## 2.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Nem sempre temos um método analítico nos permite analisar determinado composto, por temos os materiais necessários ou pelo uso de grandes quantidades de solvente. Nesse caso precisamos desenvolver um novo método, alterando a técnica de extração, os solventes utilizados e ainda a técnica de separação e detecção. Entretanto, posteriormente ao desenvolvido de um método, este deve ser validado para que possa ser aplicado a rotina de um laboratório.

Segundo a ANVISA (2017) a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, sendo assim, a validação é personalizada, escolhendo os testes necessários e os critérios de aceitação para um determinado método.

A abrangência deste tipo de validação é baseada no tipo de método e seus requisitos (SHABIR, 2003), alguns critérios normalmente utilizados nos processos de validação estão abaixo relacionados.

### 2.4.1. LOD E LOQ

Uma das definições mais comuns de limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) assumiu que este corresponde a menor concentração de um analito que pode ser diferenciada de forma confiável do ruído de fundo, mas não necessariamente quantificada como valor exato. LOD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (MANSILHA et al., 2010). Baseado nos parâmetros da curva analítica segue a equação:

$$LOD = \frac{(SD \times 3)}{S} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde,

$SD$  é a estimativa do desvio padrão da interceptação de Y das últimas três curvas obtidas com concentrações próximas ao limite presumido de quantificação e  $S$  é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (Oliveira et al., 2014).

Na prática o LOD é determinado pela menor concentração do analito que gera um sinal três vezes maior que o sinal do ruído.

O limite de quantificação (LOQ do inglês *Limit of Quantification*) é definido, por sua vez, como a menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis e também pode ser calculada com base nos parâmetros da curva de calibração (MANSILHA et al., 2010). Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LOQ, a medição torna-se menos precisa. Para determinação de LOQ pode-se adotar os mesmos critérios de LOD, utilizando a relação 10:1, ou seja, os métodos: relação sinal-ruído e baseado em parâmetros da curva analítica seguindo a equação:

$$LOQ = \frac{(SD \times 10)}{S} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde,

$SD$  é a estimativa do desvio padrão da interceptação de Y das últimas três curvas obtidas com concentrações próximas ao limite presumido de quantificação e  $S$  é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (OLIVEIRA et al., 2014).

Nas técnicas analíticas, em geral é utilizado a relação sinal-ruído.

#### 2.4.2. CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE

Linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de um determinado intervalo de aplicação (SHABIR, 2003), que confere a faixa entre os limites de quantificação

superior e inferior de um método analítico para o qual foi demonstrado precisão e exatidão no método descrito (CALDAS et al., 2009). Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica, que consiste na relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse (ANVISA, 2003). A curva analítica pode ser construída preparando-se soluções analíticas padrões dos pesticidas em solvente e no extrato da matriz. A curva analítica construída a partir das soluções padrão preparadas em solvente relaciona a resposta do instrumento com a concentração do analito, sem considerar as interferências da matriz em estudo (Rosa, 2013).

A linearidade do método pode ser observada a partir do gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear. Essa relação linear simples é descrita pela equação da reta:

$$y = ax + b \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração do analito;

a = inclinação da curva, coeficiente angular;

b = intersecção com o eixo y, coeficiente linear.

Além de calcular os coeficientes de relação **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação, denominado r. A qualidade da curva obtida pode ser avaliada através do coeficiente de determinação ( $r^2$ ). Um  $r^2$  maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um  $r^2$  igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI et al., 2004).

### 2.4.3. SELETIVIDADE

A seletividade é o grau em que um método pode quantificar o analito com precisão na presença de interferentes (impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz).

Idealmente, a seletividade deve ser avaliada para qualquer interferente importante que esteja presente. É particularmente importante verificar interferentes que, provavelmente, em princípios químicos, possam responder ao teste. Como princípio geral, a seletividade deve ser suficientemente boa para que qualquer interferência seja ignorada (THOMPSON et al., 2002).

#### 2.4.4. EXATIDÃO

O ICH (International Conference on Harmonisation) define a exatidão como o grau de concordância entre o valor obtido em um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão reflete a combinação de erros sistemáticos (viés) e erros aleatórios (precisão) (MANSILHA et al., 2010).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (ANVISA, 2003). A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{valor real} - \text{valor obtido}}{\text{valor real}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

#### 2.4.5. RECUPERAÇÃO

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos, estando relacionado com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO et al., 2003).

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser fortificadas com o analito em, pelo menos, três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do

método. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra e se a forma for mais facilmente detectável pode gerar avaliações excessivamente otimistas sobre a recuperação (ANVISA, 2003). É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações, por isso a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração para o interesse (RIBANI et al., 2004). A recuperação pode ser calculada de acordo com a equação:

$$R(\%) = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração real}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Os intervalos aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos geralmente são entre 70 e 120%, com precisão de até 20%. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até 15% (GARP, 1999).

#### **2.4.6. PRECISÃO**

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado, sendo expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação. Seus resultados devem ser determinados através do desvio padrão relativo (DPR) (ANVISA, 2017).

#### **2.4.7. REPETITIVIDADE**

A repetitividade (“repeatability”) representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo

instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo (RINABI et al., 2004).

O indicado é que seja verificada através de um mínimo de nove determinações considerando o limite especificado do método (ex: três níveis de fortificação, nas concentrações baixa, média e alta, e três repetições de cada um dos níveis), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (SHABIR, 2003).

A repetitividade é expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), reforçando que este teste deve ser realizado pelo mesmo analista, no mesmo laboratório e utilizando o mesmo instrumento.

#### **2.4.8. PRECISÃO INTERMEDIÁRIA**

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, é avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões. Resulta de variações laboratoriais devido a eventos aleatórios, tais como, diferença de dias, analista, equipamento, etc, ou a combinação de todos esses fatores (SHABIR, 2003; RODRIGUES, 2010).

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. Esta medida de precisão pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (RIBANI et al., 2004).

#### **2.4.9. REPRODUTIBILIDADE**

É o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de análise (mudança de operador, local, equipamentos, etc). Geralmente é obtida através de estudo de colaboração entre laboratórios (RIBANI et al., 2004). Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de

método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2007).

#### **2.4.10. EFEITO MATRIZ**

Efeito da matriz é o resultado de componentes da matriz interferindo no momento da medição, e para determinados sistemas de medição (p.e.: GC-MS, LC-MS/MS) podem ser afetados pela presença de co-extrativos da amostra (matriz) (BESILEt al, 2017) que podem aumentar ou diminuir o sinal do analito quando comparado ao sinal dos analitos em solvente orgânico (FRENICH et al., 2009).

O efeito da matriz é dependente das propriedades físico-químicas dos analitos e das características dos componentes endógenos da matriz que dificultam sua completa separação (KITTLAUS et al., 2012).

Para a avaliação da existência dos efeitos da matriz pode-se realizar a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas na matriz.

## **2.5. PROCESSOS DE REMEDIAÇÃO**

Segundo a Resolução do CONAMA N° 420, de 28 de dezembro de 2009, a remediação ambiental é um conjunto de ações de intervenção que consiste em aplicação de técnicas visando retirar ou diminuir a concentração do contaminante nos solos ou nas águas subterrâneas a limites aceitáveis de risco ao meio ambiente e à saúde humana.

Os processos de remediação utilizados para remover os contaminantes podem ser classificados como químicos (quelatos, reagentes), físicos (retirada da camada contaminada; injeção de ar) ou biológicos (microrganismos e plantas). O termo remediação tem sido associado normalmente a técnicas não biológicas que promovem a remoção ou atenuação do contaminante (PROCÓPIO et al., 2009; RAMBORGGER et al., 2017). Ainda, as abordagens

podem ser realizadas no local de contaminação, *in situ*, ou a matriz pode ser removida do sítio contaminado, *ex situ*. As remediações *in situ* trazem como vantagem os baixos custos e não provocarem contaminações secundárias, fato observado na remediação *ex situ*, já que ocorre o transporte do material contaminado até o local de tratamento. Como desvantagem, o tratamento *in situ* acarreta em limitada manipulação da matéria contaminada, enquanto o tratamento *ex situ* permite uma maior controle e manuseio das técnicas empregadas (MORAES et al., 2014; PROCÓPIO et al., 2009; US-EPA, 2000).

Vale salientar que cada local contaminado precisa ser avaliado para determinar a estratégia, ou conjunto de estratégias, que será empregada, considerando a relação custo-benefício, a natureza do contaminante, e os possíveis riscos associados (RAMBORGER et al, 2017; PILON-SMITH e FREEMAN, 2006).

As técnicas acima mencionadas, apresentam alta eficiência, entretanto, são de custo elevado e, algumas, de difícil execução, sendo, praticamente inviável aplicá-las em grandes extensões. Nesse sentido, alternativas biológicas, revelam-se menos dispendiosas, eficientes e ambientalmente amigáveis (PROCÓPIO et al., 2009; SAIER JR. e TREVORS, 2010).

Duas alternativas biológicas que ganharam bastante destaque foram a biorremediação e fitorremediação. Por definição, a biorremediação é o uso de microrganismos, para degradar os contaminantes ambientais em formas menos tóxicas, atacando enzimaticamente os poluentes e convertendo-os em produtos inofensivos (VIDALI, 2001). Este, frequentemente, é um processo *ex situ*, em ambiente controlado por biorreator. Também pode ser utilizado remediação *in situ*, porém já foi descoberto que as bactérias remediadoras podem competir com micróbios locais e seu controle requer adição de muitos nutrientes (CLUIS, 2004). Já a fitorremediação é o uso direto de plantas naturais para limpeza de áreas contaminadas (*in situ*), frequentemente associadas com microrganismos da rizosfera, os quais estimulam o crescimento da planta e atuam em conjunto com esta no processo de descontaminação de poluentes orgânicos e inorgânicos (USEPA, 1999; NIE et al., 2011).

O uso de plantas para descontaminação de solo e água torna-se vantajoso pela fácil adaptação das plantas a variação das condições ambientais (temperatura, salinidade, pH), elevada produção de biomassa, ser uma abordagem *in situ* que causa danos mínimos ao ambiente. Além disso, as plantas exigem pouco (SURSALA et al., 2002; JAGTAP et al. 2014).

## 2. 5. 1. FITORREMEDIAÇÃO

A fitorremediação tem aplicação tecnológica uma vez que a vegetação (local ou inserida em áreas contaminadas), por meio de mecanismos bioquímicos, apresenta a capacidade de modificar a estrutura físico-química dos substratos reduzindo a disponibilidade de contaminantes por retenção e/ou degradação, pelos quais são reduzidos às formas moleculares inorgânicas atóxicas (degradação completa) ou intermediários menos tóxicos (degradação parcial) (US-EPA, 2001; LIMA et al., 2014).

As substâncias que podem ser substratos para este recurso incluem metais (Pb, Zn, Cd, Cu, Ni, Hg), metaloides (As, Sb), compostos inorgânicos ( $\text{NO}^3$ ,  $\text{NH}^4$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), elementos radioativos (U, Cs, Sr), hidrocarbonetos de petróleo, pesticidas (atrazine, bentazone, compostos clorados e nitroaromáticos), explosivos (TNT, DNT), solventes e resíduos industriais (PCPs, HAPs) entre outros (FAVAS et al., 2014). Ambas as classes de contaminantes pode ser acumuladas em tecidos vegetais ou, degradados pela atividade enzimática. Ainda, os contaminantes podem ser convertidos em espécies químicas menos tóxicas ou biodisponíveis (CAMESELLE et al., 2013).

A absorção dos contaminantes na planta ocorre primeiramente através do sistema radicular que, com sua extensa área de superfície, absorve e acumula água e nutrientes essenciais durante o crescimento da planta e, junto com estes, os contaminantes não essenciais (ETIM, 2012). No entanto, a capacidade de fitorremediar não depende exclusivamente da planta, a absorção e distribuição dos contaminantes na planta são influenciadas por características, tais como: I) a natureza do contaminante (inerte, volátil ou sujeito a degradação na planta ou no solo), II) suas propriedades físico-químicas (a solubilidade em água, a pressão de vapor, o peso molecular, o coeficiente de partição octanol/água), características da planta (tipo de sistema radicular, forma e características químicas das folhas e conteúdo lipídico) III) e características ambientais (temperatura, matéria orgânica e mineral e teor de água do solo) (PATERSON et al., 1990; MEDEIROS, 2015). Uma vez que o xenobiótico foi incorporado pela planta o destino dele segue os mecanismos biológicos de acordo com as características morfofisiológicas de cada espécie vegetal. Tais mecanismos não são exclusivos e podem ocorrer simultaneamente ou sequencialmente (PROCÓPIO et al., 2009).

De acordo com autores como Yang et al. (2005), Procópio et al. (2009) e Escoto (2017) os mecanismos da fitorremediação podem ser classificados conforme o Quadro abaixo:

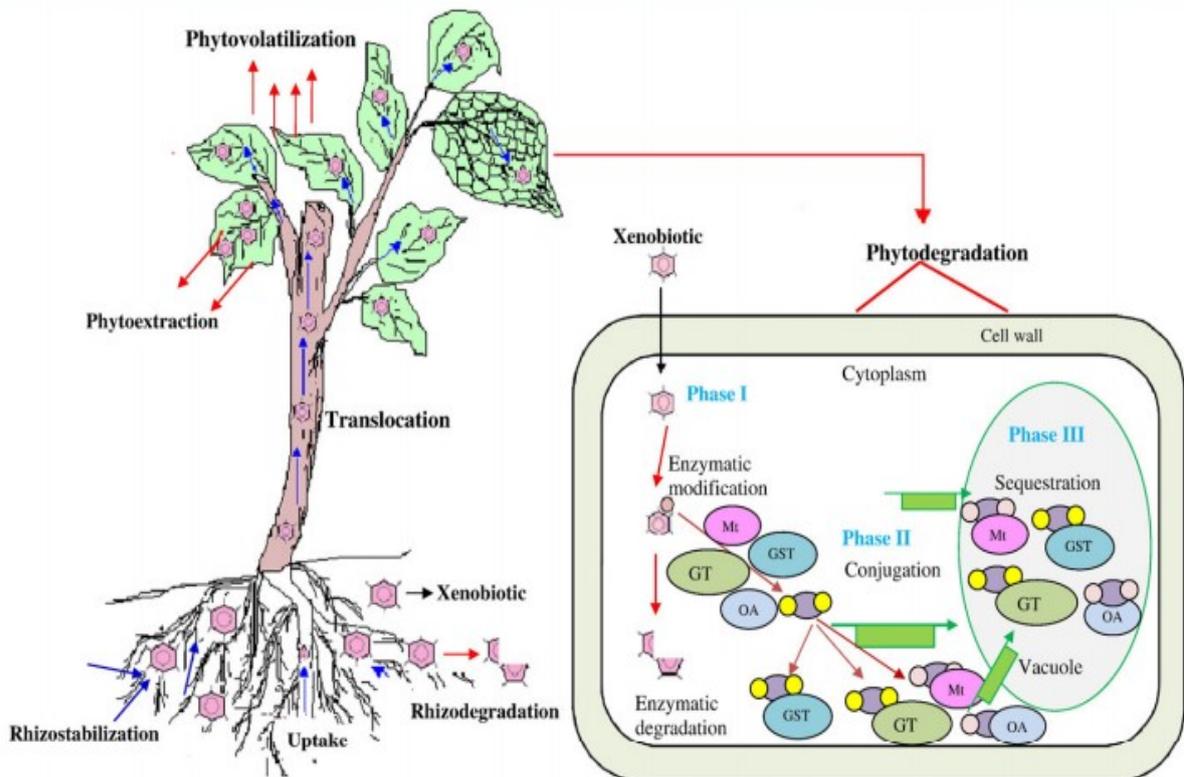
Quadro 1: Estratégias de Fitorremediação

<b>Técnica de Fitorremediação</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
Fitoextração	Acúmulo direto de contaminantes nas mudas com subsequente remoção. Solo.
Fitoestabilização	Exsudatos radiculares causam a precipitação de metais e a biomassa torna-se menos biodisponível. Águas subterrâneas, solo, rejeitos de minas.
Fitovolatilização	Volatilização de um contaminante fitotransformado a uma forma volátil, a qual é liberada na atmosfera. Ocorre após a fitoextração, ou mesmo após a fitoacumulação. Solo e águas subterrâneas.
Fitodegradação/ Rizodegradação (biorremediação assistida por plantas)	Degradação microbiana ou enzimática na região da rizosfera ou na Região aérea.
Fitoestimulação	Estimulação à concentração/ativação de comunidade microbiana apta a biodegradar o contaminante, resultado da produção e liberação de exsudatos radiculares pela espécie vegetal. Ocorre no solo/rizosfera.
Fitotransformação	Absorção e degradação de contaminantes através da planta. Água. subterrâneas e superficiais
Fitoacumulação	Armazenamento do contaminante nas raízes ou em outros órgãos, sem modificação nas moléculas do xenobiótico (aprisionamento). Ocorre após a fitoextração. Ocorre no solo.
Rizofiltração	Absorção e adsorção de contaminantes nas raízes da planta. Ocorre em águas superficiais e bombeadas através das raízes.
Remoção dos contaminantes do ar	Absorção de diversos contaminantes pelas folhas. Ar

Fonte: Adaptado de Yang et al. (2005), Procópio et al. (2009) e Escoto (2017).

Os mecanismos da fitorremediação não são exclusivos e em muitos casos podem ocorrer simultaneamente ou sequencialmente (PROCÓPIO et al., 2009). Uma vez no interior da planta, os contaminantes podem ser convertidos em compostos menos tóxicos via fitotransformação, que são processos realizados pelas enzimas da planta ou co-fatores enzimáticos (SUSARLA et al., 2002; IJAZ et al., 2016).

Figura 4: Mecanismos de fitorremediação



Fonte: Ramborger, 2017.

Segundo Lamego e Vidal (2007) na fitodegradação, os poluentes orgânicos podem ser degradados diretamente pelas atividades enzimáticas da própria planta. Poluentes orgânicos configuram como o substrato ideal para esse tipo de processo (como herbicidas, trinitrotolueno e TCE) devido a sua lipofilicidade que favorece a mobilidade nos tecidos vegetais e envolve a ação de complexos enzimáticos presentes nas plantas, como glutatona e citocromo P-450 monooxigenases. As enzimas agem sobre o poluente mineralizando-o completamente a compostos inorgânicos como, dióxido de carbono, água e  $\text{Cl}_2$  ou, ainda,

degradando-o a intermediários estáveis que são armazenados na própria planta (LAMEGO E VIDAL, 2007).

As plantas possuem um arranjo complexo de enzimas que são capazes de detoxificar xenobióticos, incluindo esterases, citocromo P-450 dependente de oxigenases (enzimas de metabolismo de fase I), glutathione S-transferases (GSTs) glucosil transferases (GTs) e malonil transferases (enzimas de metabolismo de fase II) e transportadores vacuolares dirigidos por ATP (enzimas de fase III) (KARAVANGELI et al., 2005).

A maioria das reações catalisadas por P450 são reações de hidroxilação, mas a desalquilação oxidativa e a epoxidação também ocorrem. Esse complexo enzimático compreende várias isoformas de citocromo P450 e uma NADPH-citocromo P450 oxidorreductase não específica. Mesmo produzindo metabólitos menos tóxicos, essa conversão também pode ativar alguns pró-herbicidas. Na fase II, os pesticidas ou seus metabólitos de fase I são diretamente conjugados com glutathione, açúcares ou aminoácidos para produzir compostos solúveis em água. Nesta etapa, UDP-glicuronil transferase e GST atuam sobre compostos hidrofóbicos, eletrofílicos e citotóxicos, bem como sobre os metabólitos produzidos na fase I. Na fase III, os transportadores de membrana dependentes de ATP reconhecem os conjugados e os transferem através das membranas. Os metabólitos conjugados são depositados no vacúolo, transferidos para o apoplasto ou incorporados na parede celular nas frações de pectina, lignina, hemicelulose ou celulose (KAWAHIGASHI, 2009; SANDERMANN Jr., 1992; ABHILASH et al., 2009).

A oxigenação é um processo comum no metabolismo de pesticidas e herbicidas e é um importante modo de ataque inicial quando os organismos encontram o que são frequentemente compostos altamente lipofílicos. Este passo serve para aumentar a solubilidade em água e proporciona uma oportunidade para a conjugação através da formação de ligações glicosídicas. Os xenobióticos podem ser oxidados pelo citocromo P450 e as peroxidases também podem ser importantes (MACEK, MACKOVÁ e KÁS, 2000).

As GSTs das plantas ganharam atenção especial em relação à desintoxicação de herbicidas que pertencem principalmente a duas classes, cloroacetanilida e triazinas. As enzimas desse grupo catalisam a adição nucleofílica do tiol de glutathione reduzida ( $\gamma$ -glutamyl-cisteinyl-glicina) ao centro eletrofílico de uma variedade de substratos hidrofóbicos como herbicidas, inseticidas e carcinógenos (KARAVANGELI et al., 2005; ABHILASH et al., 2009; COLEMAN et al., 1997). Após conjugação para efetiva detoxificação, o conjugado glutathione-xenobiótico é compartimentalizado e imobilizado no vacúolo ou no apoplasto

(COLEMANN, 1997). Os principais processos de detoxificação pelos complexos enzimáticos das plantas estão descritos na figura.

## **2.5.2. VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA FITORREMEDIAÇÃO**

Saier Jr. & Trevors (2010) relatam que a fitorremediação oferece uma série de vantagens que incluem um baixo custo para sua aplicação, principalmente quando envolve espécies adaptadas a região e requerem menos cuidados; além disso, é uma abordagem mais ecológica, aplicável a uma ampla gama de metais tóxicos e mais esteticamente agradável (LAGHLIMI et al.,2015). O estabelecimento de vegetação em solos poluídos também ajuda a prevenir a erosão e a lixiviação dos contaminantes (ALI et al., 2013). Por outro lado, apresenta limitações que devem ser consideradas quanto a aplicação dessa tecnologia. Favas et al. (2014) observa que se o baixo custo é vantajoso, o tempo de espera para obtenção de resultados pode ser longo. Além disso, a concentração de poluentes e a presença de outras toxinas devem estar dentro dos limites de tolerância da planta. PROCÓPIO et al. (2009) relata que dentre as principais potencialidades da fitorremediação podemos considerar:

1. Menor custo em relação a outras técnicas de remediação, principalmente em relação a ex situ;
2. O emprego de plantas pode ser implantado com mínimo distúrbio ambiental, evitando escavações e tráfego pesado de maquinário e é mais favorável esteticamente do que qualquer outra técnica de remediação;
3. Dependendo do composto e a forma que a planta o metaboliza, a mesma não precisa ser removida da área contaminada. Esse é o caso dos contaminantes que podem ser degradados a compostos não tóxicos internamente nas plantas ou no ambiente rizosférico, podendo ser mineralizados a compostos primários;
4. Geralmente há uma melhora nas propriedades biológicas, físicas e químicas do solo;
5. Propicia a incorporação de matéria orgânica ao solo, principalmente, quando não há necessidade de retirada das plantas remediadoras da área contaminada;
6. Promove a fixação de nitrogênio atmosférico, principalmente, quando se é utilizado leguminosas como espécies remediadoras;

7. Auxilia no controle do processo erosivo, eólico e hídrico. Diminuem o carreamento de contaminantes com a água e com o solo e, evita a contaminação dos cursos hídricos;

8. Promove a redução da lixiviação de contaminantes no solo, reduzindo a contaminação do lençol freático;

9. Utiliza energia solar para realizar os processos de descontaminação;

10. Apresenta alto índice de aceitação pública, perante a sociedade.

Mesmo com muitos pontos positivos a fitorremediação apresenta limitações que precisam ser consideradas na aplicação da técnica, bem como, na escolha da planta. Dentre as principais limitações encontram-se:

1. Dificuldade na seleção de plantas para fitorremediação, como nos casos de descontaminação de solos com resíduos de herbicidas de amplo espectro de ação;

2. Pode ser requerido mais de um ciclo de cultivo, quando o tempo necessário seja muito extenso para uma despoluição satisfatória;

3. O contaminante deve estar dentro da zona de alcance do sistema radicular das plantas fitorremediadoras;

4. Clima e condições do solo podem restringir o crescimento de plantas, o que pode prejudicar descontaminação;

5. Necessidade de retirada das plantas da área contaminada, quando o composto tóxico é apenas fitoacumulado ou fitodegradado a um composto ainda ou mais tóxico que o inicial;

6. A presença do contaminante ou de algum metabólito tóxico nas plantas pode levar a contaminação da cadeia alimentar;

7. Dificuldade de controle (destino) posterior da planta fitorremediadora.

Nesse sentido, as limitações ou dificuldades devem ser previstas antes de se optar pelo seu uso.

A seleção da(s) espécie(s) fitorremediadora(s) é uma das primeiras etapas para se iniciar a fitorremediação. Para isso é necessário conhecer as características químicas do contaminante, bem como as características físico-químicas e ambientais do local ser remediado (PROCÓPIO et al., 2009).

Diferentes propriedades das plantas são importantes para a fitorremediação. Segundo Lamego & Vidal (2007), características como crescimento rápido, elevada produção

de biomassa, competitividade, vigor e tolerância à poluição e ao contaminante alvo. Além disso, resistência a pragas, fácil colheita quando necessário remoção da planta da área contaminada, capacidade transpiratória elevada, entre outros (MARIANO e OKUMURA, 2012).

## 2.6. A PLANTA SELECIONADA PARA O ESTUDO

*Plectranthus* é um gênero horticulturalmente importante, predominantemente de plantas herbáceas que está se tornando cada vez mais popular em paisagismo. A maioria das espécies é facilmente cultivado a partir de estacas ou sementes e requerem pouca manutenção (RICE et al., 2011). Este gênero possui 300 espécies, constituído por arbustos e ervas, principalmente aromáticos, as quais são distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do hemisfério sul (MOTA et al., 2014).

A planta herbácea e aromática *Plectranthus neochilus* Schltr. (*Lamiaceae*) é popularmente conhecida como "boldo rasteiro" ou "boldo gambá" no Brasil (RAMBORGER et al., 2017). É usado na medicina popular para o tratamento de distúrbios digestivos, infecção cutânea, insuficiência hepática e dispepsia. Na África do Sul, essa espécie é considerada medicinalmente relevante para tratar infecções respiratórias (MOTA et al., 2014). Suas folhas frescas têm um odor distinto e são tomadas como infusão ou extrato aquoso para fins de cura. (Caixeta et al., 2011) e já foi demonstrado que o óleo essencial obtido de suas folhas apresentam atividade inibidora de microorganismos patógenos (CREVELIN et al., 2015). Além do uso medicinal, a capacidade fitorremediadora no boldo gambá jpa foi testada, obtendo resultados satisfatórios ao remediar o herbicida 2,4-D (Ramborger et al., 2017). Com base nesse trabalho utilizamos os procedimentos para avaliar se a planta era apta ou não para desenvolver a fitorremediação nas condições do estudo.

Figura 5: Imagem ilustrativa do boldo em floração



Fonte: [https://jb.utad.pt/especie/Plectranthus\\_neochilus](https://jb.utad.pt/especie/Plectranthus_neochilus)

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

A proposta desse trabalho é avaliar o potencial de *Plectranthus neochilus* para fitorremediar água contaminada por sulfentrazone.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a tolerância das plantas de boldo ao herbicida sulfentrazone;
- Avaliar a cinética de degradação do sulfentrazone na presença das plantas de boldo;
- Desenvolver um método para análise cromatográfica do sulfentrazone;
- Desenvolver um método de extração em fase sólida para cartucho C18 para sulfentrazone em matriz aquosa;

#### **4. ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados e Discussão* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está apresentado da mesma forma que será submetido à Revista *Biotechnology Advances*.

**EVALUATION OF *Plectranthus neochilus* IN PHYTOREMEDIATION OF  
COMMERCIAL SULFENTRAZONE IN AQUEOUS MEDIUM**

**Pereira, Geovana C.<sup>1</sup>; Paz, Maria E. G.<sup>1</sup>; Denardin, Elton L. G.<sup>2</sup>; Roehrs, Rafael<sup>1</sup>**

**<sup>1</sup>Interdisciplinary Group on Research in Teaching Practice (GIPPE), Uruguaiiana  
Campus, Federal University of Pampa (UNIPAMPA), RS, Brazil**

**<sup>2</sup>Laboratory of Physical-Chemical and Natural Product Studies (LEFQPN), Uruguaiiana  
Campus, Federal University of Pampa (UNIPAMPA), RS, Brazil**

**Abstract**

The potential of *Plectranthus neochilus* (boldo gambá) to phytoremediate sulfentrazone herbicide (Boral 500 SC) in water was evaluated in this work. The plants were exposed to pesticide in a concentration of 10.30 mg/L and the samples were collected every 8 days for 32 days. The analytical method for HPLC and the SPE method were developed for analysis of the samples. Both methods presented satisfactory results, considering the objective for which they were developed. The plants persisted until the end of the experiment. The results demonstrate that in addition to herbicide tolerance, boldo is able to remove 25% sulfentrazone in water of the study conditions, which proves that boldo is a good candidate for phytoremediation of sulfentrazone in water sources.

Key words: Sulfentrazone, *plectranthus neochilus*, phytoremediation, water

**1. Introduction**

Environmental contamination, whether from industrial waste or from domestic waste has increased alarmingly. Water resources are the most harmed because almost all industrial and domestic waste ends up in rivers or lakes. Pollution affecting these areas is now a major problem because many pollutants have non-dispensable utilities, such as pesticides (Lusitana, 2007).

Herbicides are widely used as pre and post-emergence selective control of broadleaf and grass weeds in agricultural crops. In consequence, their prolonged use may lead to the pollution of surface and ground water by the herbicides themselves and their metabolites (Martínez et al., 2002). Sulfentrazone [*N*-{2,4-dichloro-5-{4-(difluoromethyl)-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1*H*-1,2,4-triazol-1-yl} phenyl} methanesulfonamide] is a herbicide registered for use on several agricultural crops (e. g., soybeans and tobacco) (Ohmes and Mueller, 1999). It has been reported that in the environment its half life ranges from 110 to 280 days, according to soil and environmental conditions. Due to the relatively long environmental half-life in soil and relatively high water solubility sulfentrazone is likely to be transported into the aquatic environment (THORNGREN et al., 2017).

Phytoremediation can be classified depending on the technique to be employed, the chemical nature or the property of the pollutant. There are five types of phytoremediation based on plant physiological processes: phytostabilization, phytovolatilization, phytodegradation, phytostimulation and phytoextraction (Ibbini, 2009; Vieira, 2011). Phytostabilization plants with the ability to stabilize the pollutant in the soil, not allowing it to spread; phytovolatilization is the process that comes after the absorption of the pollutant by the plant, which makes them volatile, eliminating in the form of gas, not requiring the removal of the plant; the phytodegradation is the depollution through plants with capacity to break down the pollutants through its metabolism; phytostimulation are plants that when in contact with the contaminant it ends up stimulating the growth and the formation of roots increasing the remediation of the soil or the water resource; and finally we have the phytoextraction that is the use of the plants as extractors of the compounds so that later the plant withdraws and extracts the contaminant from the plant through solvents or thermal processes (Vieira, 2007, Ibbini, 2009).

The aim of this study was to evaluate the potential of *Plectranthus neochilus* to phytoremediate water contaminated by sulfentrazone in its commercial form Boral 500 SC. Therefore, the aims of our study include the development of methods for determination and extraction of sulfentrazone from the matrix.

## **2. Materials and method**

### *2.1 Reagents*

The sulfentrazone standard used in the determination of analytical curves, chromatographic and matrix extraction methods was obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Commercial sulfentrazone (Boral 500 SC) was obtained from FMC Agricultural Solutions (Brazil).

The solvent used in the chromatographic analysis (acetonitrile) were chromatographic grade and obtained from J.T. Baker, (Netherlands). Ultrapure water was used for the conditioning of the extraction cartridges and also as a solvent for the mobile phase from Milli-Q Millipore system (Milford, MA, USA).

## *2.2 Analytical method*

High Performance Liquid Chromatography (HPLC-PAD) was performed with a Young Lin (YL 9100) model, equipped with quaternary pump, auto sampler, and diode-array detector. Initially, the chromatographic method was based on the work of Ohmes and Mueller (1999) and Thorngren et al (2017). To determine the optimum conditions of analysis for the analytical column Inertsil ODS-3 (C18, RP, 250 mm X 4,3 mm) to sulfentrazone, different mobile phases comprising isocratic combinations of acetonitrile and ultrapure water in solution acidified at pH3 were evaluated in the ratios 50:50, 65:35, 60:40 and 90:10 (v/v); as well flow rates of 0,8, 0,9 and 1 mL/min were also evaluated at this stage. The water was acidified at pH3 with phosphoric acid (1:1, v/v). The LC defined conditions were mobile phase acetonitrile/water (pH3) in the ratio 90:10. The flow rate was 1 mL/min in an isocratic system with a running time of 10 min, 20  $\mu$ L of sample were injected and the wavelength of detection was 210 nm and oven temperature at 35 °C.

## *2.3 Preparation of analytical solution*

Stock solution of the pesticide standard were prepared by accurately weighing 10.0 mg of sulfentrazone and dissolving it in 10.0 mL of ACN, to obtain a 1000 mg/L stock solution. From this solution, a working standard solution of 100.0 mg/L was prepared in ACN. This solution was diluted as needed to prepare different standard solutions: 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg/L in ACN. To evaluate matrix effect, standard solutions at these same concentrations were also diluted in the white matrix extract (extracted by the method proposed in this work).

Two calibration curves were prepared, one in organic solvent and the other in the aqueous matrix.

#### *2.4 Extraction method*

The extraction, cleaning and concentration of sulfentrazone from water samples was performed using a solid phase extraction (SPE) procedure. The SPE method was an adaption of Ramborger et al. (2017) with brief modifications in the conditioning solvent. First, three samples of 100 mL of tap water were placed in 250 mL erlenmeyers flask and fortified with 1 mL of the sulfentrazone standard each with concentrations of 2, 4 and 8 mg/L, respectively, resulting in a final concentration of 20 µg/L, 40 µg/L e 80 µg/L. The mixture was shaken in an orbital stirrer (Tecnal-São Paulo) at 100 rpm for 15 min. The analyte was extracted from matrix by SPE using cartridges Strata-X from Phenomenex (pore size of 55 mm in 500 mg). Cartridges were conditioned with 3 mL of acetonitrile, 3 mL of ultrapure water and 3 mL of ultrapure water pH 3. The water samples (100 mL) were acidified at pH3 and then percolated. The cartridges were washed with 3 mL of ultrapure water pH 3 and ultrapure water and dried per 10 min of vacuum. To elute the sulfentrazone, 10 mL, of acenonitrile (pH without the changing) and dried per 10 min of vacuum again. After, the sample was evaporated on a rotary evaporator (40°) and suspended in vial with 1 mL de acetonitrile. The samples were analyzed by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). This solid phase extraction process was performed in triplicate for all concentrations used.

#### *2.5 Real sample extraction*

The next step in the development of the extraction method was its application in a real sample not contaminated with sulfentrazone. The water was obtained at Felizardo Stream located at the Federal University of Pampa, BR 472- Km 592- Uruguaiana - RS. The fortification and extraction procedure follow what has been described previously.

#### *2.6 Phytoremediation experimental*

##### *2.6.1 Plant Material*

*Plectranthus neochilus* was taken from the Federal University of Pampa area, BR 472 e Km 592- Urugaiana - RS, identified and registered by n.108/2016. The seedlings of the plants were placed in packages with water to promote root growth during 24 days. The plants were growth in a greenhouse under natural light and variable ambient temperature (15-30 °C) to keep all plants in a situation closer to the real one. After that period, the plants are transferred to gardening pots, and separated into two seedlings per pot. No fertilizer or additive was used since the adaptation of the seedlings until the end of the experimental phase.

#### *2.6.2 Experimental set-up*

The phytoremediation experiments were conducted using tap water (1000 mL) fortified with Boral 500 SC (sulfentrazone) as a control group for comparison with the treatment group (water fortified with sulfentrazone + plant) and a non-fortified water with plant as blanc group. The concentration used in the treatment group was 10.30 mg/L.

#### *2.7 Sulfentrazone remediation experiment in water*

Treatment: Analysis of the sulfentrazone degradation rate was performed every 8 days for 32 days from day zero of the experiment. Due to the concentration of commercial sulfentrazone used in the experiment the SPE step was unnecessary, so to determine the rate of degradation of the pesticide in the aqueous matrix 1 mL of Boral 500 fortidicated water was collected and filtered with PTFE syringe filter (0.45 µm). The results were analyzed in HPLC-DAD.

#### *2.8 Statistical analysis*

In this study data are presented as means ± S.D. Significant differences between controls and treatment groups were determined by the One-way analysis of variance (ANOVA). P values < 0.05 were considered significant and were employed using Graph Pad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

### **3. Results**

### 3.1 Analytical method

Different compositions of mobile phase isocratic and gradient were evaluated. Initially an isocratic mobile phase containing acetonitrile and water in solution pH 3 at ratio of 50:50, 65:35, 60:40 and 90:10 (v/v) and flow rate of 0.8, 0.9 and 1 ml/min was evaluated, however, to Inertsil ODS C18 column the most satisfactory performance for our work was found with the proportions of 90:10 acetonitrile/water at pH3 and flow rate of 1 mL/min. Under these conditions we obtained the shorter retention time (5.8 min) and the analysis time was reduced to 10 min, which resulted in optimization of working time and solvent economy. The flow rate of 0.8 mL/min showed good resolution and peak area, however, the analysis time and the solvent expenditure were higher. In the flow of 0.9 mL/min, there was a 20% reduction in peak area and was discarded.

Taking into account the reliability of an analytical method is ensured by method validation, this step is extremely important to ensure an accurate, reproducible and robust methodology in the range in which the analyte will be analyzed (Shabir, 2003).

In this work, the validation of the method evaluated the linearity, accuracy, precision, LOD and LOQ which are described below for the method.

### 3.2 Linearity

Linearity can be observed from the linear regression equation ( $y = ax + b$ ). The results should not show a significant deviation from linearity, which is taken to mean that the correlation coefficient  $> 0,99$  (Caldas et al., 2009). The linearity of the instrument and method was evaluated by the analytical curves through external standardization in the solvent and by superposition of the matrix with analytical solutions (Rodrigues et al., 2011). The DAD response for sulfentrazone herbicide was linear in the concentration range assayed (1-8 mg/L) with determination coefficient of ( $r^2$ ) 0,9999 for curve in the solvent following linear equation  $y = 219x + 15,31$  and 0,9989 for curve in the matrix following linear equation  $y = 222,23x + 5,13$ .

### 3.3 Selectivity and matrix effect

The selectivity of a method can be compromised by the interaction of some matrix component with the analyte at the time of quantification. This combined effect is defined as matrix effect (IUPAC, 1997). To compensate it, the preparation of the calibration curve in the matrix is commonly used and the matrix effect can be quantified from the percentage of deviation of the response of the analyte in matrix vs. its signal intensity in the reference curve, with the equation (Besil et al., 2017; DG-SANTE, 2017):

$$ME = \frac{(\text{slope}(\text{matrix matched}))}{(\text{slope}(\text{reference curve}))} - 1 \times 100$$

The selectivity of the method was evaluated in relation to the matrix components. A calibration curve prepared in five concentrations (1-8 mg/L) in the extract obtained from the sulfentrazone free matrix was used. The separation of the analyte relative to the contaminants of the matrix was good, which demonstrates the selectivity of the system. It is noteworthy that the validation was carried out also using the curve in the matrix as reference and that the analysis time was exactly the same as the curve prepared in solvent. The evaluation of the matrix effect calculated from the curves presented a positive, but not significant, result. Its quantification was performed according to Besil et al. (2017), which describes the positive value as increase and the negative as suppression of the matrix-induced analyte signal. Thus, if we obtained less than 20% matrix effect, as was the case, we can assume that there is no effect.

### 3.4 Repeatability

Repeatability was verified by analyzing the pesticide solution (1 mg/L) prepared in solvent and matrix and injected seven times to evaluate the RSD of the signal intensities, which were 1,303 and 1.16 % to solvent and matrix curve, respectively. This RSDs are in agreement with European quality control guidelines which establishes a % RSD of  $\leq 20\%$  (DG-SANTE, 2017).

### 3.5 Recovery

In this study we developed a solid phase extraction method with the Strata X C18 cartridge for extraction of sulfentrazone into water. The recoverability of our method proved to be quite

satisfactory, being able to concentrate 100 times the sample. Tap water without any pretreatment and sulfentrazone free was fortified at three different concentrations (2, 4 and 8 mg/L) for the development of the extraction method. The recoveries obtained with this matrix were 99.66 to 105.44% and the mean RSD% <12%. To verify its applicability, we perform the same process with the real matrix obtained in the field. The recoveries for this sample ranged from 95.89 to 113.76% and the RSD% was <15% (Table 1). These results are in accordance with DG SANTE/ 20017/11813 of the European quality control guidelines which establishes as acceptable recoveries between 70 and 120% for pesticides with RSD  $\leq$  20% (DG-SANTE, 2017).

Table 1. Recovery (rec.) and RSD at 2.0, 4.0 and 8.0 mg/L fortification levels in tap water (n=3) and real matrix (n=5)

<b>Sulfentrazone</b>						
Matrix	<b>Fortification levels</b>					
	20 $\mu$ g/L		40 $\mu$ g/L		80 $\mu$ g/L	
	Rec. %	RSD %	Rec. %	RSD %	Rec. %	RSD %
Tap water	99.66	11.5	99.34	10.98	105.44	6.38
Real matrix	113.76	7.52	112.5	11.02	94.89	14.93

### 3.6 Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)

Limit of detection and quantification were obtained for sulfentrazone in the solvent curve and real sample based on the signal to noise ratio. The values were 0.2987 mg/L and 0.8961 mg/L to LOD and LOQ, respectively, in the solvent curve; for the real sample curve the results were 0.3333 mg/L and 1 mg/L to LOD and LOQ, respectively.

### 3.7 Analysis of plant sulfentrazone sensibility

To evaluate the tolerance of boldo to sulfentrazone a sensitivity curve was used to observe the phytotoxicity symptoms in the plant, since no biometric parameters were established for this evaluation. The tolerance of the plant sulfentrazone was observed with a sensitivity curve with six points (0.8 Kg/ha-80 Kg/ha).

The mode of action of sulfentrazone is to inhibit Protox, resulting in disruption of lipid cell membranes (Szmigielski et al., 2009). This enzyme is present in chloroplasts of plants that oxidize protoporphyrin to produce protoporphyrin IX, precursor of chlorophyll and heme groups.

The leaves of sensitive plants affected by Protox inhibitors become white or chlorotic, withered and necrotic within two days after application (Marchi et al., 2008). In the pre-emergence application the plant absorbs the pesticide through the root system. Tolerant plants rapidly metabolize sulfentrazone while sensitive plants can die soon after exposure to light (Szmigielski et al., 2009). However, knowing that the evaluated matrix is different the behavior of the pesticide will occur differently as will be seen below.



*Figure 1:* Effect of the sulfentrazone herbicide toxicity on the roots of the boldo at the concentrations of 80 kg/ha and 8 kg/ha with one week of experiment and 0.8 kg/ha with two weeks of experiment.

The effects of toxicity were more pronounced at the concentration of 80 Kg/ha, where the roots showed dimming from the second week and yellowing of the leaves (Fig. 1).

At 24 days of experiment, all the leaves of the plants of this pot were yellow and the browning root, however, the plant remained alive. Already at the concentration of 8 Kg/ha, the effect was not so acute, taking more time to cause damages at the same level. At the concentration of 0.8 Kg/L, leaf yellowing was observed first, and root damage appeared from the third week in a less aggressive manner and did not show great evolution during the experiment. Protox inhibitors normally cause bleaching and desiccation (Duke et al., 1991; Marchi et al., 2008),

however, the plants have resisted for more than 20 days at all concentrations, demonstrating tolerance to the action of the herbicide.

Literature on the effect of sulfentrazone on roots is scarce. We observed that during the experiment there was no apparent root growth of the plants with sulfentrazone solution, unlike plants with water. Such behavior resembles that described by Reilling et al. (2006) for soybean plants. However, we observed that the damage caused to the plants did not follow a uniform pattern as the concentrations increased.

It is probable that the difference in the availability of the herbicide in water influenced the absorption and more aggressive effect in the roots, as well as the greater exposure to light due to the container used in the experiment also potentiated the effect.

Sulfentrazone-sensitive plants rapidly undergo effects caused by the herbicide, (Oliveira Jr et al., 2011, Marchi et al., 2008; Dayan et al., 2001), exhibiting symptoms of leaf necrosis in a very short period of time (from one to three days). Even in species considered tolerant, plants may present moderate to severe injuries in post-emergence application (Oliveira Jr et al., 2011). In none of the experiments performed with boldo the plant showed the effects of toxicity in such a short time of exposure. Even the concentration 100 times higher than the recommended dose showed damage after one week of exposure. In contrast, concentrations of 0.8 and 8 Kg/ha damage were observed with weeks of experiment.

The information found regarding root damage refers to root growth, but nothing related to necrotic appearance. However, the damage developed by the boldo plants is similar to those caused by the phytotoxicity of heavy metals. For example, visual symptoms such as darkening and necrotic lesions in the roots are associated with the ability of heavy metals to interfere with photosynthesis and inhibit Calvin cycle enzymes (Amado and Chaves Filho, 2015; Gomes et al., 2011). In addition, metals toxicity such as lead causes symptoms such as reduced root growth, plant growth atrophy and leaf chlorosis due to inhibiting chlorophyll biosynthesis. The formation of oxygen-reactive species, such as  $^1\text{O}_2$  and lipid peroxidation are also results of heavy metal toxicity (Sharma and Dubey, 2005). What we can see is that these symptoms appear when inhibition of physiological processes such as photosynthesis occurs and consequently cell damage such as membranes rupture.

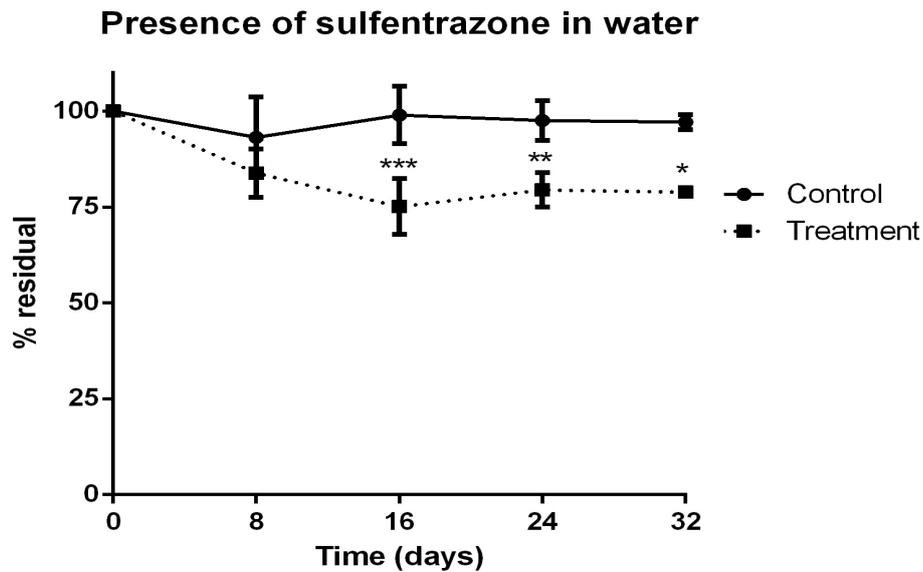
### *3.9 Sulfentrazone remediation experiment in water*

Although they have been exposed to dose so high of this herbicide, the boldo seedlings used in treatment were tolerant to sulfentrazone when they survived the 32 days of experiment. In the plants of the treated group, the symptoms of phytotoxicity began to appear in the third week of the phytoremediation test. The yellowish appearance of chlorosis and necrosis appeared on the leaves and stem, in the lower region of the plant near the roots. The roots of the plants used were long and branched and, at the end of the 32 days, in some seedlings the longer roots showed blackness and signs of necrosis, whereas the new roots had their growth reduced.

The treatment was done in a number of four pots with two seedlings each ( $n=4$ ) and this behavior was not homogeneous to all the seedlings used. In the control group (blanc) some leaves had a faded tone, but the roots had no change. The toxic effects of sulfentrazone in the third week of treatment may be attributed to the concentration used in the assay. In addition, the behavior of sulfentrazone is better known in soil where its phytotoxicity is influenced by factors such as the composition of this, mainly by the amount of organic carbon and amount of clay (Szmigielski et al., 2009; Ohmes and Mueller, 2007). In aqueous matrix does not offer so many interferers that can retain herbicide and interfere in the absorption of this by the root. With these results we can observe the toxicity of the compound to the plant is evident first in the regions of greater contact with the herbicide, roots and stem immersed in water and stem and leaves in the lower region, although it remained alive and in good condition (aerial part) throughout the experiment.

The dosage of the herbicide used in this work 20.6 kg a.i./ha (equivalent to 10.30 mg/L) extrapolates the maximum recommended value for use in commercial fields that is 0.8 kg a.i./ha (equivalent to 0.4 mg/L) according to the crop and type of soil. The data were obtained by comparing the area of the peaks of the known standard with those of the samples obtained. At the end of the first 32 days of the experiment.

The pesticide percentage reduction calculations were performed on each day of collection taking as a starting point the first day of experiment (initial concentration of the pesticide solution) for both control and treated group.



*Figure 2:* Remediation of sulfentrazone pesticide by *Plectranthus neochilus*. The concentration of herbicide used was 10.30 mg/L. The differences were statistically significant at  $p < 0.05$ .

The results showed a significant decrease for sulfentrazone concentration in water when compared with control group. At day 8 of treatment (second day of collection), it was observed that the control presented a small reduction in its concentration. In treatment, on day 16, there was reduction in approximately 25% of the herbicide while its control remained close to 100%. It is a fact that there was a statistically significant reduction in the pesticide content in water, showing that the boldo presented a relevant potential for phytoremediation of the herbicide sulfentrazone. In addition, it is possible to perceive the difference in the time of reduction in herbicide concentration in the presence of the plant when compared to its respective control (3% throughout the experiment period), as shown in figure 2.

If we compare with works like that of Mandalão et al. (2012), the authors evaluated the sensitivity of eight species to determine if they had potential for phytoremediation of sulfentrazone. Of these, only the species *Cajanus cajan*, *Leucaena leucocephala* and *D. lablab* were considered as an alternative for phytoremediation of the herbicide up to the concentration of 400 g a.i./ha. Thus, we can define the boldo as a suitable phytoremediation species, since in addition to being tolerant it was able to remedy the herbicide by 25% in a

concentration approximately 20 times greater than that used by the authors. It is possible that in lower concentrations its performance is even more efficient.

There is not much information about *Plectranthus neochilus* ("boldo gambá") as a phytoremediation plant in literature, being a more known plant its medicinal properties among the species of the genus *Plectranthus*. According to Duarte & Lopes (2007) this species is more investigated or its antioxidant, antimicrobial and pharmacological properties. Ramborger et al. (2017) showed that the boldo gambá presents capacity for phytoremediation the 2,4-D herbicide under the same laboratory conditions in which we carried out our experiment. In soil, the boldo was not a good candidate for phytoremediation 2,4-D not showing difference between the degradation by the plant and in the absence of the plant. The opposite was observed in water. Based on the results obtained by Ramborger et al. (2017) we chose this plant for our phytoremediation test. According to Luo et al. (2016), most hyperaccumulating plants are herbaceous with limited biomass, and although they may accumulate high amounts of contaminants in their aerial part this is limited by their low production of biomass. The species we use has basic characteristics to be a phytoremediation plant, which include rapid growth, adaptation to the environment, easy cultivation, however, the results indicate that its ability to accumulate sulfentrazone was impaired by the dosage to which it was exposed.

The phytoremediation mechanism used by the boldo with 2,4-D is not defined. From the result obtained in our work we believe that phytoaccumulation has been used. Phytoaccumulation occurs when the contaminant taken up by the plant is not degraded rapidly or completely, resulting in an accumulation in the plant (Susarla et al., 2002).

There is a stabilization in the reduction of sulfentrazone in water and a small increase in the concentration of the pesticide in water from day 24. This is due to damage in the roots that impaired absorption and could, over time, lead to the release of sulfentrazone in water, since there was no growth of biomass in the plant (Alvarado et al., 2008). This shows that further studies are needed to understand the dynamics of sulfentrazone in the boldo, to determine what are the adequate concentrations for the plant to remedy this herbicide and the possible metabolization of the same.

An alternative viable to potentiate the remediation of the herbicide is the microbe-assisted phytoremediation, which consists of the complex interactions involving roots, root exudates and microbes result (Gerhardt et al., 2009).

#### 4. Conclusion

*Plectranthus neochilus* showed satisfactory tolerance to the sulfentrazone pesticide in its commercial formulation Boral 500 SC. The plant was able to remediate the herbicide in high concentration even under phytotoxicity. This resistance demonstrates the plant's potential to remedy water sources contaminated by such pesticides at lower concentrations, such as those used commercially. This work had a series of components that differ from the information found in the literature, because until then, we did not find similar trials for sulfentrazone performed in water, with high doses and vegetable species. This makes the search for explanations for our results need to be obtained through further laboratory investigations. The analytical methods developed for analysis were efficient for determining sulfentrazone in aqueous matrix. The SPE method with C18 cartridge was proved to be a simple and fast way to prepare the actual sample of the sulfentrazone herbicide. The LC-DAD method showed good sensitivity and repeatability and is a reliable tool for the determination of herbicides in water.

#### References

- Alvarado, S.; Guédez, M.; Lué-Merú, M. P.; Nelson, G.; Alvaro, A.; Jesus, I. A. A.; Gyula, Z. 2008. Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). *Bioresource Technology*. 99. 8436–8440.
- Amado, S.; Chaves Filho, J. T. 2015. Fitorremediação: uma alternativa sustentável para remediação de solos contaminados por metais pesados. *Natureza on line*. 13, 4, 158-164.
- Besil, N. Cesio, V. Heizen, H. and Fernández, A. R. A. 2017. Matrix effects and interferences of different citrus fruits coextractives in pesticide residue analysis using ultra high-performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65, 23,4819-4829.

Caldas, S. S. Demolier, A. and Primel, E. G. 2009. Validation of a Method using Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography for the Determination of Pesticide Residues in Groundwaters. *Journal Brazilian Chemical Society*. 20, 1, 125-132.

Dayan, F. E.; Romagi, J. G.; Duke, S. O. 2001. Protoporphyrinogen Oxidase Inhibitors. In: *Handbook Of Pesticide Toxicology Principles*. United States Department of Agriculture. 1529-1541.

DG-SANTE, E. C. 2017. ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED.

Duarte, M. R. and Lopes, J. F. 2007. Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr., Lamiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 17, 4, 549-556.

Duke, S. O.; Lyndon, J.; Becerril, J. M.; Sherman, T. D.; Larry, P. 1991. Protoporphyrinogen Oxidase-Inhibiting Herbicides. *Weed Science*. 39, 3, 465-473.

Gerhardt, K. E., Huang, X. D., Glick, B. R., Greenberg, B. M. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*, 16, 1, 20-30.

Gomes, M. P.; Marques, T. C. L. L. S. M.; Nogueira, M. O. G.; Silva, G. H.; Castro, E. M.; Soares, A. M. 2011. Efeitos dos rejeitos da indústria de zinco na anatomia e crescimento de plantas jovens de *Salix humboldtiana* Willd. (salgueiro). *Hoehnea*. 38, 1, 135-142.

Ibbini, J. H.; Davis, L. C.; Erickson, L. E. 2009. Phytoremediation in Education: Textile Dye Teaching Experiments. *International Journal of Phytoremediation*, 11:5, 451-462, DOI: 10.1080/15226510802655989.

IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). 1997. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford. XML online corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B.

Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8.  
<https://doi.org/10.1351/goldbook>. Last update: [2014-02-24](#); version: [2.3.3](#).

Luo, Z. B.; He, Ji.; Polle, A.; Rennenberg, H. 2008. Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). *Bioresource Technology*, 99, 8436–8440.

Mandalão, J. C.; Pires, F. R.; Filho, A. C.; Nascimento, A. F.; Chagas, K. Procópio, S. O.; Araújo, R. S.; Bonomo, R. and Taufner, G. 2012. Selection of species tolerant to the herbicide sulfentrazone with potential for phytoremediation of contaminated soils. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*. 33, 6, 2199-2214.

Marchi, G., Marchi, E. C. S., Guimarães, T. G. 2008. *Herbicidas: mecanismos de ação e uso*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 36 p. (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 227).

Ohmes, A. G.; Mueller, T. C. 1999. Liquid Chromatographic Determination of Sulfentrazone in Soil. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*. 82, 5, 1214-1214.

Ohmes, G.A.; Mueller, T.C. 2007. Sulfentrazone Adsorption and Mobility in Surface Soil of the Southern United States. *Weed Technology*. 21, 3, 796-800.

Oliveira Jr., R. S. Mecanismo de ação de Herbicidas. In: *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. Curitiba, PR: Omnipax, 2011.

Oliveira, M. A.; Pires, F. R.; Ferrazo, M. and Belo, A. F. The Validation of an Analytical Method for Sulfentrazone residue Determination in Soil Using Liquid Chromatography and a Comparison of Chromatographic Sensitivity to Millet as a Bioindicator Species. *Molecules*. 19, 10982-10996.

Ramborger, B. P. et al. 2017. The phytoremediation potential of *Plectranthus neochilus* on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the role of antioxidant capacity in herbicide tolerance. *Chemosphere*. 188, 231-240.

Reiling, K. L.; Simmons, F. W.; Riechers, D. E.; Steckel, L. E. 2006. Application timing and soil factors affect sulfentrazone phytotoxicity to two soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars. *Crop Protection*. 25. 230–234.

Rodrigues, S. A.; Caldas, S. S.; Furlong, E. B. and Primel, E. G. 2011. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CEBOLA. *Química Nova*. 34, 5, 780-786.

Shabir, G. A. 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*. 987, 57–66.

Susarla, S.; Medina, V. F.; McCutcheon, S. C., 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*. 18, 5, 647-658.

Szmigielski, A. M.; Schoenau, J. J.; Johnson, E. N.; Holm, F. A.; Sapsford, K. L. and Liu, J. 2009. Development of a Laboratory Bioassay and Effect of Soil Properties on Sulfentrazone Phytotoxicity in Soil. *Weed Technology*. 23 3, 486-491.

Thorngren, J. L.; Harwood, A. D.; Murphy, T. M.; Hartz, K. E. H.; Fung, C. Y.; Lydy, M. J. . 2017. FATE AND RISK OF ATRAZINE AND SULFENTRAZONE TO NONTARGET SPECIES AT AN AGRICULTURE SITE. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 36, 5, 1301–1310.

Vieira, G, E, G; Silveira, C, R; Curtim, J; Ribeiro, J. 2011. Avaliação dos principais aspectos da fitorremediação aplicados na redução da poluição no solo e água. *Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal*. 8, 2, 182-192.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

Os resultados mais relevantes desta dissertação foram organizados em um manuscrito que será submetido a revista científica da área.

Para realização desse trabalho houve desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para o herbicida sulfentrazone nas condições do laboratório, onde comparamos a eficiência de duas colunas cromatográficas e validamos o método de SPE com cartucho C18. Para comparar a eficiência das duas colunas optamos pelo método da equação de número de pratos teóricos ( $n$ ) (LANÇAS, 2009), que pode ser definido como sendo um estágio da coluna onde se atinge um equilíbrio termodinâmico entre fase móvel, fase estacionária e o analito. Sendo assim, a quantidade de pratos teóricos por coluna relaciona-se com a quantidade de espaços de equilíbrio entre os componentes já citados, o que influenciará a separação dos picos no cromatograma. Considerando as diferenças ao comparar duas colunas, usa-se a equação para altura equivalente de um prato teórico nessa comparação (CIOLA, 1998).

Os valores necessários para calcular o número de pratos teóricos foram encontrados alterando o fluxo de fase móvel do sistema, como presente na tabela 1. A partir do resultado obtido a altura equivalente de um prato teórico foi determinada.

Tabela 2: Valores obtidos para altura equivalente de um prato teórico em diferentes fluxos

Fluxo (mL/min)	Synergi			Inertsil		
	L (mm)	n	h (mm)	L (mm)	n	h(mm)
0,8	250	4484	0,055	250	4367	0,057
0,9	250	4718	0,052	250	3884	0,064
1,0	250	4256	0,058	250	5952	0,042

Tr = tempo de retenção; Wh = largura do pico na sua meia altura; N = número de pratos teóricos. Fases móveis utilizadas: Na coluna Inertsil ODS-3 de fase reversa (C18) e a fase móvel constituída por acetonitrila: água ultrapura pH3 (90:10); na coluna Synergi Fusion de fase reversa (C18), tamanho 250 mm X 4,60 mm, para as análises feitas com esta coluna foi utilizada uma fase móvel constituída por acetonitrila: água ultrapura pH3 (70:30).

Pode-se observar que, quando o valor mínimo de  $h$  é atingido, que no caso da coluna Inertsil foi no fluxo de 1 mL/min de fase móvel, a eficiência  $n$  tem seu melhor

desempenho. Já para Synergi o melhor desempenho ocorreu no fluxo de 0,9 mL/min. Isso evidencia a relação direta entre o número de pratos teóricos (n) e a altura equivalente de um prato teórico (h), quanto menor o valor de h maior será o valor de n, assim formando picos mais definidos e com melhor separação (CIOLA, 1998).

O número de pratos teóricos de uma coluna não poder ser um fator determinante na seleção da coluna, uma vez que a eficiência de uma coluna dependerá do composto escolhidos, das condições de análise, uma vez que o tempo de retenção e a largura variam para cada composto e também com as condições experimentais. Ainda surgem outras dificuldades como o fato que muitas variáveis influenciam a eficiência da coluna, como o comprimento desta (Lanças, 2011). Devido a esses fatores, utiliza-se a equação de altura equivalente de um prato teórico que permite comparar duas colunas diferentes (COLLINS, 1997).

Quanto à otimização da análise, os fluxos mais intensos de fase móvel apresentaram um tempo de retenção e altura equivalente de um prato teórico menor, podendo assim se reduzir o tempo de análise do Sulfentrazone significativamente, sendo necessário um volume menor de solventes, gerando menos resíduos por análise.

O método de SPE se mostrou eficiente e adequado como pode ser observado pelos valores de recuperação obtidos, que variaram de 99,66 a 105,44 % (RSD < 12%) para amostra de água da torneira e 95,89 a 113,76% (RSD < 15%) para matriz real com o cartucho C18 Strata X®, estando de acordo com os valores recomendados para pesticidas (DG-SANTE, 2017). Isso se diferencia das informações encontradas da literatura consultada, onde geralmente são utilizados métodos mais tradicionais e sorvente C8 (OLIVEIRA et al., 2014; THORNGREN et al., 2017; OHMES E MULLER, 1999).

Observamos nesse trabalho que o boldo gambá possui potencial para fitorremediar o herbicida sulfentrazone em água, bem como, esta planta se mostrou bastante resistente a altas concentrações do herbicida. Conforme verificamos no ensaio de sensibilidade, em concentrações mais baixas os danos radiculares não ocorrem de forma tão evidente o que provavelmente favorece o desempenho na fitorremediação, visto que, mesmo nessas condições a planta reduziu em 25% a concentração do sulfentrazone em água. Sendo assim, é de se esperar que em situação de menor toxicidade a planta seja capaz de fitorremediar concentrações maiores de herbicida.

Os sintomas apresentados pela planta diferem ligeiramente do que encontramos na literatura. (Oliveira Jr et al., 2011, Marchi et al., 2008; Dayan et al., 2001). No entanto, a

concentração que utilizamos extrapola os valores encontrados em trabalhos semelhantes (MELLO et al., 2017; MANDALÃO et al., 2012; MANDALÃO et al., 2017), o que provavelmente desencadeou os danos tão aparentes das raízes, que assemelham-se aos efeitos da toxicidade de metais pesados (YADAV, 2010).

Considerando que o mecanismo de ação empregado pela planta tenha sido fitoextração, torna-se relevante avaliar sua ação em um contexto onde as raízes estejam em condições mais saudáveis.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho foi desenvolvido um método cromatográfico para análise do pesticida sulfentrazone, que mostrou eficiência para análise de amostra extraída de matriz aquosa. Esse método foi otimizado e o tempo de análise foi reduzido, assim tornando o processo mais dinâmico e mais econômico, visto que reduziu o gasto de solvente e utiliza uma coluna de menor custo.

Além disso, desenvolveu-se um método de extração em SPE com cartucho C18 Strata X. Esse método foi validado com amostras de água da torneira e amostra real obtida do Arroio Felizardo, apresentando um bom desempenho para as duas amostras.

O *Plectranthus neochilus* Schltr. remediou 25% de herbicida sulfentrazone na formulação comercial Boral 500 SC em água, utilizando dose maior que o recomendado, demonstrando seu potencial para descontaminação de recursos hídricos.

Embora a pesquisa utilizando essa espécie como planta fitorremediadora seja recente (esta dissertação e Ramborger, 2017), a planta se mostrou apta a essa função, o que mostra a necessidade de desenvolver mais estudos no sentido de conhecer detalhadamente sobre a tolerância da planta a herbicidas com diferentes mecanismos de ação e estabelecer o boldo como planta fitorremediadora.

## 7. PERSPECTIVAS

Algumas perspectivas futuras são:

- Avaliar o desempenho do boldo para fitorremediar o herbicida sulfentrazone em concentrações menores;
- Avaliar mais detalhadamente o mecanismo de fitorremediação utilizado pela planta;
- Compreender o mecanismo de resistência dessa planta ao sulfentrazone e a outros pesticidas;
- Avaliar se há translocação do herbicida na planta e em qual parte é acumulado;
- Determinar se há presença de metabólitos de sulfentrazone em água;
- Desenvolvimento e validação de método de extração para o sulfentrazone em solo;
  - Avaliar a influenciado pH na absorção de sulfentrazone pelas raízes.

## Referências

ABHILASH, P. C.; JAMIL, S.; SINGH, N. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. **Biotechnology Advances**. Vol. 27, No. 4, p. 474–488, 2009.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals Concepts and applications. **Chemosphere**. Vol. 91, p. 869–881, 2013.

BARRIGOSI, J. A. F. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fohgb6co02wyiv8065610dc2ls9ti.html>> Acesso em 01/06/2018.

BESIL, N.; CESIO, V.; HEINZEN, H.; ALBA, A. R. F. Matrix effects and interferences of different citrus fruits coextractives in pesticide residue analysis using ultra high-performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 65, p. 4819–4829, 2017.

BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MORALES, M. A. M. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**. Vol. 144, p. 475–483, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

\_\_\_\_\_. CONAMA Ministério do Meio Ambiente nº 420. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *RCD nº 166*, de 24/07/2017.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégias e Discussão. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. Vol.13, p.129-146, 2003.

BRONDI, S. H.G.; MACEDO, A. N.; VICENTE, G. H.L. NOGUEIRA, A. R. A. Evaluation of the QuEChERS Method and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Analysis Pesticide Residues in Water and Sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. Vol. 86, No. 1, p. 18–22, 2011.

CALDAS, S. S.; DEMOLINER, A.; PRIMEL, E. G. Validation of a Method using Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography for the Determination of Pesticide Residues in Groundwaters. **Journal Brazilian Chemical Society**. Vol. 20, No. 1, p. 125–132, 2009.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. PRINCIPAIS TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS E POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS. **Química Nova**. Vol. 34, No. 9, p. 1604-1617, 2011.

CAIXETA, S. C.; MAGALHÃES, L.G.; MELO, N. I.; WAKABAYASHIA, K. A. L.; AGUIAR, G. P.; AGUIAR, D. P.; MANTOVANI, A. L. L.; ALVESA, JACQUELINE M.; OLIVEIRA, P. F. Chemical Composition and in vitro Schistosomicidal Activity of the Essential Oil of *Plectranthus neochilus* Grown in Southeast Brazil. **CHEMISTRY & BIODIVERSITY**. Vol. 8, p. 2149-2157, 2011.

CAMESELLE, C.; CHIRAKKARA, R. A. e REDDY, K. R. Electrokinetic-enhanced phytoremediation of soils: Status and opportunities. **Chemosphere**. Vol. 93, p. 626–636, 2013.

CARNEIRO, F F; PIGNATI, W; RIGOTTO, R M; AUGUSTO, L G S. RIZOLLO, A; MULLER, N M; ALEXANDRE, V P. FRIEDRICH, K; MELLO, M S C. **Dossiê ABRASCO –Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. ABRASCO, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1ª Parte. 98 p.

CASTRO, V. L. S. S.; DESTEFANI, C. R.; DINIZ, C.; POLI, P. Evaluation of neurodevelopmental effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. **NeuroToxicology**. Vol. 28, p. 1249-1259, 2007.

CHOWDHURY, A. PRADHAM, S.; SAHA, M.; SANYAL, N. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal Microbiology**. Vol. 48, p. 114-127, 2008).

CLUIS, C. Junk-greedy Greens: Phytoremediation as a New Option for Soil Decontamination. **BioTeach Online Journal**. Vol. 2, p. 62-68, 2004.

COLEMAN, J. O. D.; KALFF, M.M.A.B.; DAVIES, T.G.E. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. **Trends in plant science**. Vol. 2, No 4, p. 144-151, 1997.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1997. 273p.

CREVELIN, J. E. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Plectranthus neochilus* against Cariogenic Bacteria. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Vol. 2015, p 1-6.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. Vol. 8, p. 1402-1419, 2011.

DAYAN, F. E.; ROMAGI, J. G.; DUKE, S. O. 2001. Protoporphyrinogen Oxidase Inhibitors. In: **Handbook Of Pesticide Toxicology Principles**. United States Department of Agriculture. 1529-1541.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Vol. 18, No. 12, p. 1296-1301, 2014.

ESCOTO, D. F. **USO DA PISTIA STRATIOTES COMO FITORREMEIADORA DE RECURSOS HÍDRICOS CONTAMINADOS POR CLOMAZONE**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguai, 2017.

ESTÉVEZ, M. E.; PERIAGO, E. L.; CARBALLO, E. M.; GÁNDARA, J. S.; MEJUTO, J. C.; RÍO, L. G. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. Vol. 123, p. 247–260, 2008.

ETIM, E. E. Phytoremediation and Its Mechanisms: A Review. **International Journal of Environment and Bioenergy**. Vol. 2, No 3, p. 120-136, 2012.

FAUSTINO, L. A.; FREITAS, M. A. M.; PASSOS, A. B. R. J.; SARAIVA, D. T.; FARIA, A. T.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R. MOBILIDADE DO SULFENTRAZONE EM SOLOS COM DIFERENTES CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS. **Planta Daninha**. Vol. 33, No. 4, p. 795-802, 2015.

FAVAS, P. J. C; PRATAS, J.; VARUN, M. ROHAN, DS.; PAUL, M. S. Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora. In: Maria C. Hernandez Soriano (Ed.). **Environmental Risk Assessment of Soil Contamination**. InTech. p. 485-517, 2014. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/environmental-risk-assessment-of-soil-contamination>> Acesso em: 25/01/2018.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. **The Plant Cell**. Vol. 17, p. 1866-1875, 2005.

FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.; MORENO, J. L F.; GONZÁLEZ, R. R. Compensation for matrix effects in gas chromatography–tandem mass spectrometry using a single point standard addition. **Journal of Chromatography A**. Vol. 1216, p. 4798–4808, 2009.

GALLI, A. SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS. **Química Nova**. Vol. 29, No. 1, 2006.

GEBLER, L.; **Banco de Informações Ambientais e Toxicológicas dos Agrotóxicos Utilizados até a Safra 2002/2003 na Produção Integrada de Maçãs no Brasil**. Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves, RS, Circulação Técnica n 48, julho 2004.

GILL, H. K.; GARG, H. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLENSKI, S. Pesticides - Toxic Aspects (Ed.). InTech. 2014, p. 187-230. Disponível em <<https://www.intechopen.com/books/citations/pesticides-toxic-aspects>> Acesso em: 16/02/2018.

IJAZ, A.; IMRAM, A.; HAQ, M. A.; KHAN, Q. M.; AFZAL M. Phytoremediation: recent advances in plant-endophytic synergistic interactions. **Plant Soil**. Vol. 405, p. 179–195, 2016.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) DOQ-CGCRE-008, Revisão 02 - Junho/2007: Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2011.

JAGTAP, S. S.; WOOB, S. M.; KIM, T. S.; DHIMAN, S. S.; KIM, D.; LEE, J. K. Phytoremediation of diesel-contaminated soil and saccharification of the resulting biomass. **Fuel**. Vol. 116, p. 292–298, 2014.

JALLOW, M. F. A.; AWADH, D. G.; ALBAHO, M.S.; DEVI, V. Y.; THOMAS, B. M. Pesticide risk behaviors and factors influencing pesticide use among farmers in Kuwait. **Science of the Total Environment**. Vol. 574, p. 490–498, 2017.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**. Vol.2, No. 1, 13-25, 2010.

KITTLAUS, S.; SCHIMANKEB, J.; KEMPEC, G.; SPEERB, K. Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. Vol.1218, p. 8399–8410, 2012.

KARAVANGELI, M.; LABROU, N. E.; CLONIS, Y. D.; TSAFTARIS, A. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. **Biomolecular Engineering**. Vol. 22, p.121-128, 2005.

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

LAGHLIMI, M.; BAGHDAD, B.; HADI, H. E.; BOUABDLI, A. Phytoremediation Mechanisms of Heavy Metal Contaminated Soils: A Review. **Open Journal of Ecology**, Vol, 5, p. 375-388, 2015.

LAMEGO, F.P.; VIDAL, R.A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição. Pesticidas: **Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. Vol. 17, p. 9-18, 2007.

LANÇAS, F. M. Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde? **Scientia Chromatographica**. Vol. 1, n. 3, p. 17-23, 2011.

LANÇAS, F. M. Estratégias para diminuição do tempo de análise em Cromatografia Líquida Moderna. **Scientia Chromatographica**. Vol. 1, n 4, p. 39-47, 2009.

LIMA, A. L.; ROMAGNANO, L. F. T.; LEITE, D. C. Processos biológicos: fitorremediação in: Guia de elaboração de planos de intervenção para o gerenciamento de áreas contaminadas. p. 267-290, 2014.

MACEK, T.; MACKOVÁ, M.; KÁS, J. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. **Biotechnology Advances**, Vol. 18, p. 23–34, 2000.

MANDALÃO, J. C. et al. Action of *Canavalia ensiformis* in remediation of contaminated soil with sulfentrazone. **Bragantia**. Vol. 76, n. 2, p.292-299, 2017.

MANDALÃO, J. C. et al. Selection of species tolerant to the herbicide sulfentrazone with potential for phytoremediation of contaminated soils. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. Vol. 33, n. 6, p. 2199-2214, 2012.

MANSILHA, C.; MELO, A.; REBELO, H.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; DOMINGUES, V. PINHO, C. GAMEIRO, P. Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. **Journal of Chromatography A**. Vol. 1217, p. 6681–6691, 2010.

MARGNI, M.; ROSSIER, D; CRETTEZ, P.; JOLLIET, O. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. Vol. 93, p. 379–392, 2002.

MARIANO, D. C.; OKUMURA, R. S. Aspectos Agronômicos, Uso pelo Homem e Mecanismos da Fitorremediação: uma revisão. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**. Vol. 5, No. 2 Especial, 2012

MARTINI, L. F. D.; CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; BUNDT, A. C.; PRIMEL, E. G.; AVILA, L. A. Risco de contaminação das águas de superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz irrigado. **Ciência Rural**. Vol. 42, No. 10, p. 1715-1721, 2012.

MARTÍNEZ, R. C.; GONZALO, E. R.; ÁLVAREZ, J. D.; MÉNDEZ, J. H. Determination of triazine herbicides in natural waters by solidphase extraction and non-aqueous capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. Vol. 869, p. 451–461, 2000.

MEDEIROS, Thales Augusto de Miranda. Efeito fitotóxico e potencial remediador de três espécies vegetais contaminadas com benzeno. 2015.

MELO, C. A. D.; SOUZA, W. M.; CARVALHO, F. P.; MASSENSINI, A. M.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R.; COSTA, M. D. Microbial activity of soil with sulfentrazone associated with phytoremediator species and inoculation with a bacterial consortium. **Bragantia**. Vol. 76, No. 2, p. 300-310, 2017.

MELO, R. F. de; BRITO, L. T. de L.; GIONGO, V.; ANGELOTTI, F.; MIGUEL, A. A. Pesticidas e seus impactos no ambiente. In: BRITO, L. T. de L.; MELO, R. F.; GIONGO, V. (Ed.). **Impactos ambientais causados pela agricultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. p. 101-136.

MORAES, S. L.; TEIXEIRA, C. E.; MAXIMIANO, A. M. S. **Guia de elaboração de planos de intervenção para o gerenciamento de áreas contaminadas**. São Paulo: IPT/BNDS, 2014. 394 p.

NIE, M.; WANG, Y.; YU, J.; XIAO, M.; JIANG, L.; YANG, J.; FANG, C.; CHEN, J.; LI, B. Understanding Plant-Microbe Interactions for Phytoremediation of Petroleum-Polluted Soil. **PLoS ONE**. Vol. 6, p. 1-8, 2011.

MOTA, L. et al. Volatile-Oils Composition, and Bioactivity of the Essential Oils of *Plectranthus barbatus*, *P. neochilus*, and *P. ornatus* Grown in Portugal. **CHEMISTRY & BIODIVERSITY**. Vol. 11, 719-732, 2014.

NIR, S.; AMIR, D. Z.; K. A.; GONEN, Y. Simulation of adsorption and flow of pollutants in a column filter: Application to micelle–montmorillonite mixtures with sand. **Applied Clay Science**. Vol. 67–68, p. 134-140, 2012.

OLIVEIRA, M. A.; PIRES, F. R.; FERRAÇO, M.; BELO, A. F. The Validation of an Analytical Method for Sulfentrazone Residue Determination in Soil Using Liquid Chromatography and a Comparison of Chromatographic Sensitivity to Millet as a Bioindicator Species. **Molecules**. Vol. 19, p. 10982-10997, 2014.

PARRILLA, P.; VIDAL, J. L. M.; GALERA, M. M.; FRENICH, A. G. Simple and rapid screening procedure for pesticides in water using SPE and HPLC/DAD detection. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**. Vol. 350, p. 633-637, 1994.

PASSOS, A. B. R. J.; FREITAS, M. A. M.; GONÇALVES, V. A.; SILVA, G. S.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; LIMA, C. F.; SILVA, D. V. Leaching of sulfentrazone in soils of reforestation in Brazil. **Environ Earth Science**. Vol. 74, p. 1211–1215, 2015.

PATERSON, S.; MACKEY, D. TAM, D.; SHIU, W.Y. UPTAKE OF ORGANIC CHEMICALS BY INSECTS: A REVIEW OF PROCESSES, CORRELATIONS AND MODELS. *Chemosphere*. Vol. 21, No. 3, p. 297-331, 1990.

PIAIA, B. R.; ZAGO, M. L. C.; DENARDIN, E. L. G.; ROEHRS, R. Fitorremediação dos herbicidas 2,4-diclorofenoxiacético e propanil em solo cultivado por erva cidreira (*Melissa officinalis*). *Ciência e Natura*. Vol. 39, No. 1, P. 91-98, 2017.

PILON-SMITS, E.; FREEMAN, J. L. Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerations. *Frontiers in Ecology and the Environment*. Vol. 4, No. 4, p. 203–210, 2006.

PROCÓPIO S. O.; PIRES, F. R.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A. **Fitorremediação de solos com resíduos de herbicidas**. Aracaju: EMBRAPA Tabuleiros Costeiros. p. 32, 2009.

QUEIROZ, S. C. N. NOVOS SORVENTES BASEADOS EM POLI(METILOCTILSILOXANO) SOBRE SÍLICA PARA USO EM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA. *Química Nova*. Vol. 29, No. 4, p. 637-640, 2006.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E/OU CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS ENCONTRADOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA. *Química Nova*. Vol. 24, No. 1, p. 68-76, 2001.

RAMBORGER, Bruna Piaia. **FITORREMEDIAÇÃO DO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) PELO *Plectranthus neochilus***. 2017. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2017.

RASKIN, I. Phytoremediation. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. Vol. 49, p.p. 643–68, 1998.

REYES, R. C.; MONERO, J. L. F.; GONZÁLEZ, R. R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*. Vol. 85, p. 183-196, 2011.

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, p.771-780, 2004.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. *Caderno de Saúde Pública*. Vol. 30, No. 7, p. 1-3, 2014.

ROSA, Anderson da Silva. **Fitorremediação de Pesticidas Utilizados em Lavouras de Arroz Através do Cultivo Hidropônico de Alface (*Lactuca sativa L.*)**. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2013.

RODRIGUES, S.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase

dispersion with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**. Vol. 678, Pp 82–89.

SAIER JR., M. H.; TREVORS, J. T. Phytoremediation. **Water Air Soil Pollut.** Vol. 205, No. 1, p. 61.

SANDERMANN JR, H., 1992. Plant metabolism of xenobiotics. **Trends in Biochemical Science**. Vol. 17, p. 82-84.-63, 2010.

SHABIR, G.A. V alidation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. Vol. 987, p. 57–66, 2003.

SHANER, D. L. Field Dissipation of Sulfentrazone and Pendimethalin in Colorado. **Weed Technology**. Vol. 26, No. 2, p. 633- 637, 2012.

SZMIGIELSKI, A. M.; SCHOENAU, J. J.; JOHNSON, E. N.; HOLM, F. A.; SAPSFORD, K. L.; LIU, J. Development of a Laboratory Bioassay and Effect of Soil Properties on Sulfentrazone Phytotoxicity in Soil. **Weed Technology**. Vol. 23, No. 3, p. 486-491, 2009.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDREA, M. M. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna: 29 p. 2004.

TAVARES, S. R. de L. Técnicas de remediação. In: TAVARES, S. R. de L. Remediação de solos e águas contaminadas por metais pesados: conceitos básicos e fundamentos. Joinville: Clube de Autores, 2013. cap. 2, p. 61-90

TAVARES, A. D. C.; GROPOB, M.; RODRIGUES, V.; CUNHA, W. R.; VENEZIANIA, R. C. S.; FILHO, A. S.; CROTTI, A. E. M. Chemical Composition and in vitro Schistosomicidal Activity of the Essential Oil of *Plectranthus neochilus* Grown in Southeast Brazil. **Chemistry & Biodiversity**. Vol. 8, p. 2149-2157, 2011.

THOMAS, W. E.; TROXLER, S. C.; SMITH, W. D.; FISHER, L. R.; WILCUT, J. W. Uptake, translocation, and metabolism of sulfentrazone in peanut, prickly sida (*Sida spinosa*), and pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*). **Weed Science**. Vol. 53, p.446–450, 2005.

THORNGREN, J. L.; HARDWOOD, A. D.; MURPHY, T. M.; HARTZ, K. E. H.; FUNG, C. Y.; LYDY, M. J. FATE AND RISK OF ATRAZINE AND SULFENTRAZONE TO NONTARGET SPECIES AT AN AGRICULTURE SITE. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 36, No. 5, p. 1301–1310, 2017.

TUZIMSKI, T.; REJCZAK. Application of HPLC–DAD after SPE/QuEChERS with ZrO<sub>2</sub>-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. **Food Chemistry**. Vol. 190, p. 71–79, 2016

UNITED STATES OF AMERICA. USEPA. Technology Innovation Office. Treatment technologies screening matrix and reference guide: Version 4.0. Washington, 2001.

\_\_\_\_\_. USEPA. Introduction to Phytoremediation. EPA 600/R-99/107. Fevereiro, 2000.

\_\_\_\_\_. USEPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Technical Fact Sheet on Sulfentrazone. USEPA 1997.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do sudeste do Brasil. **Caderno Saúde Pública**, Vol. 22, No 11, p. 2391-2399, 2006.

Vidali, M. IUPAC, *Pure and Applied Chemistry*. Vol. 73, p.1163–1172, 2001.

Xu, S.; LUA, H.; CHENB, L. Double water compatible molecularly imprinted polymers applied as solid-phase extraction sorbent for selective preconcentration and determination of triazines in complicated water samples. **Journal of Chromatography A**. Vol. 1350, No. 23–29, 2014.

YADAV, S. K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. **South African Journal of Botany**. Vol. 76, p. 167–179, 2010.

YANG, X.; FENG, Y.; H. E, Z.; STOFFELLA, P. J. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. Vol.18, No. 4, p.339-353, 2005.