

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

MARISA DE JESUS SILVA CHAVES

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE 2,4-D  
EM ÁGUA NATURAL SUPERFICIAL E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE  
DESTE HERBICIDA E SEU PRINCIPAL METABÓLITO**

São Luís – MA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

MARISA DE JESUS SILVA CHAVES

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE 2,4-D  
EM ÁGUA NATURAL SUPERFICIAL E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE  
DESTE HERBICIDA E SEU PRINCIPAL METABÓLITO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Universidade Federal do Maranhão como  
requisito para obtenção do título de Bacharel  
em Química Industrial

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Teresa Cristina  
Rodrigues dos Santos Franco.

São Luís –MA

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

CHAVES, MARISA DE JESUS SILVA.

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE 2,4-D EM ÁGUA NATURAL SUPERFICIAL E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DESTE HERBICIDA E SEU PRINCIPAL METABÓLITO / MARISA DE JESUS SILVA CHAVES. - 2017.

47 f.

Orientador(a): TERESA CRISTINA RODRIGUES DOS SANTOS FRANCO.

Monografia (Graduação) - Curso de Química Industrial, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS - MA, 2017.

1. ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO. 2. ARTÊMIA SALINA.  
3. CLAE-DAD. 4. TOXICIDADE. I. FRANCO, TERESA CRISTINA RODRIGUES DOS SANTOS. II. Título.

MARISA DE JESUS SILVA CHAVES

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE 2,4-D  
EM ÁGUA NATURAL SUPERFICIAL E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE  
DESTE HERBICIDA E SEU PRINCIPAL METABÓLITO**

Data da aprovação: 03/07/2017

---

Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco

Universidade Federal do Maranhão

---

Cáritas de Jesus Silva Mendonça

Universidade Federal do Maranhão

---

Marianna Basso Jorge

Universidade federal do maranhão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Maranhão por ter me proporcionado uma formação acadêmica exemplar e por ter disponibilizado espaço físico e equipamentos laboratoriais para a realização deste trabalho. À professora Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco por ter me dado a oportunidade de desenvolvimento deste trabalho e sempre estar presente mesmo quando estava distante. À Raphael Teixeira Verbinnen por todo o auxílio prestado e todas as dicas sempre enriquecedoras. Ao professor Marcio Aurélio Pinheiro Almeida por ter disponibilizado um pouco de seu tempo para me auxiliar nas coletas de água. Meu “muito obrigada” aos integrantes do Laboratório de Química Analítica e Ecotoxicologia – LAEC, que foi fundamental durante a realização deste trabalho, principalmente Marta e Lucas que estavam sempre presentes e dispostos a tirar minhas dúvidas. Ao Núcleo de Combustível, Catálise e Ambiental - NCCA, na pessoa da professora Cáritas Mendonça, por ter disponibilizado os equipamentos laboratoriais quando foram necessários. Aos amigos que fiz durante esta jornada: Bárbara Ellen, Isabela, Wemerson Daniel e Rubens Matheus, por todo carinho e compreensão em mim depositados. À minha irmã Julieta que sempre me incentivou em tudo que faço. Agradeço também às instituições de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, que financiaram os projetos, sendo seus apoios de fundamental importância.

## RESUMO

No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método de análise para o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e os principais parâmetros analíticos são apresentados, bem como sua aplicação na determinação do herbicida em água natural superficial. No desenvolvimento do método analítico usou-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para detecção e quantificação do 2,4-D no comprimento de onda de 230 nm. No preparo das amostras foi utilizada a técnica de extração em fase sólida (EFS) e determinou-se o volume adequado para pré-concentração em cartuchos C-18, obtendo-se para 100 mL de amostra recuperações superiores a 80% que diminuíram sensivelmente para maiores volumes de amostra. O método de EFS utilizado foi eficiente para extração e concentração de 2,4-D em água de rio, apresentando bons resultados de recuperação, repetitividade e baixos valores para intensidade de efeito matriz. O método cromatográfico mostrou-se linear, na faixa de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , seletivo, preciso e robusto, com Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) de  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. A robustez do método foi avaliada pelo teste de Youden. O método mostrou-se adequado para a investigação de 2,4-D em amostras de água natural superficial. A avaliação da toxicidade aguda do 2,4-D foi feita para organismos aquáticos (*Artêmia Salina*), não se observando efeito tóxico para as concentrações testadas, entretanto, seu principal produto de degradação, 2,4-diclorofenol, mostrou-se extremamente tóxico para os organismos-teste, em níveis de concentração de  $14,88$  e  $13,73 \text{ mg L}^{-1}$  para 24 e 48 horas de exposição, respectivamente.

## ABSTRACT

In the present work a analytical method for the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) has been developed and validated and the main analytical parameters are presented, as well as its application in the determination of the herbicide in natural surface water. In the development of the analytical method, high-performance liquid chromatography coupled to a photodiode array detector (HPLC-PDA) was used for the detection and quantification of 2,4-D at the wavelength of 230 nm. In the preparation of the samples, the adequate volume for pre-concentration in Solid Phase Extraction (SPE) cartridges was determined, obtaining recoveries greater than 80%, which decreased significantly for larger sample volumes. The SPE method was efficient for extraction and concentration of 2,4-D in river water, presenting good results of recovery, repetitiveness and low values for matrix effect intensity. The chromatographic method was linear, in the range of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , selective, accurate and rugged, with Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) of  $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The robustness of the method was evaluated by Youden test. The method was adequate for the investigation of 2,4-D in surface natural water samples. The evaluation of acute toxicity of 2,4-D was made to aquatic organisms (*Artêmia Salina*), and toxic effect was not observed for the concentrations tested. However, its main degradation product, 2,4-dichlorophenol, showed up extremely toxic to test organisms at concentration levels of 14.88 and  $13.73 \text{ mg L}^{-1}$  for 24 and 48 hours of exposure, respectively.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Percentual de municípios monitorados quanto à presença de agrotóxicos em água, no período de 2011 a 2014. ....	15
Figura 2: distribuição espacial dos municípios que realizaram o monitoramento de agrotóxicos em água para consumo humano no Brasil, em 2014. ....	16
Figura 3: Procedimento de extração em fase sólida. ....	27
Figura 4: Espectros obtidos para 2,4-D na matriz. ....	31
Figura 5: Espectros obtidos para 2,4-D em solvente. ....	32
Figura 6: Cromatogramas obtidos pela injeção de soluções em concentração crescente de 2,4-D nas condições descritas acima. ....	33
Figura 7: Taxas de recuperação do teste de volume de pré-concentração nos cartuchos. ....	34
Figura 8: Curvas analíticas para 2,4-D em solvente e na matriz. ....	35
Figura 9: Cromatogramas obtidos para amostras do branco da matriz (A) e da matriz fortificada com 5 µg L <sup>-1</sup> (B). ....	35
Figura 10: Diagramas de efeito do teste de robustez. O valor em destaque em cada um dos gráficos é referente à intensidade de efeito crítica. ....	38
Figura 11: Carta-controle 24 e 48 horas, respectivamente. ....	39
Figura 12: Curva dose-resposta para 2,4-D 24 e 48 horas, respectivamente. ....	40
Figura 13: Curva dose-resposta para 2,4-DCF para 24 e 48 horas, respectivamente. ....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura molecular e propriedades químicas do 2,4-D. ....	17
Tabela 2: Propriedades químicas do 2,4-diclorofenol. ....	17
Tabela 3. Parâmetros avaliados no teste de Youden.....	29
Tabela 4: Planejamento experimental do Teste de Youden. ....	29
Tabela 5: Precisão obtida para o método de análise para o Ácido 2,4-Diclorofenáxiacético (2,4-D).....	36
Tabela 6: Dados sobre a intensidade do Efeito Matriz obtidos para a curva analítica. .	36
Tabela 7: Efeito matriz em cada nível de concentração da curva analítica. ....	37
Tabela 8: Valores de recuperação.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2,4-DCF – 2,4-diclorofenol

APA – Área de Proteção Ambiental

CG – Cromatografia Gasosa

CL – Concentração Letal

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV – Coeficiente de Variação

DAD- Detector de Arranjo de Diodo

EFS – Extração em Fase Sólida

ELL – Extração Líquido-Líquido

EM – Efeito Matriz

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MEFS – Micro Extração em Fase Sólida

MS – Espectrometria de Massas

SBSE – Extração Sortiva em Barra Magnética

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFE – Extração com Fluido Supercrítico

SISAGUA - Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano.

SQR – Substância Química de Referência

UV – Ultravioleta

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	11
2.	REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1.	Poluição dos Recursos Hídricos.....	13
2.2.	Monitoramento de Agrotóxicos em Água para Consumo Humano no Brasil.....	14
2.3.	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e seu principal metabólito, 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) .....	16
2.4.	Técnicas Cromatográficas para Análise de Agrotóxicos em água.....	17
2.5.	Extração em Fase Sólida.....	18
2.6.	Validação de Metodologia Analítica .....	18
2.6.1.	SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE .....	19
2.6.2.	LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DE TRABALHO.....	19
2.6.3.	SENSIBILIDADE.....	20
2.6.4.	LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	20
2.6.5.	PRECISÃO .....	21
2.6.6.	EXATIDÃO.....	21
2.6.6.1.	Efeito Matriz .....	22
2.6.6.2.	Recuperação.....	22
2.6.7.	ROBUSTEZ.....	23
2.7.	Avaliação do impacto do uso de agrotóxicos sobre organismos vivos .....	23
3.	OBJETIVOS .....	25
3.1.	Objetivo geral.....	25
3.2.	Objetivos específicos.....	25
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
4.1.	Materiais e reagentes .....	26
4.2.	Condições Cromatográficas.....	26
4.4.	Volume de pré-concentração nos cartuchos .....	27
4.5.	Validação analítica .....	28
4.6.	Avaliação da toxicidade do 2,4-D e 2,4-DCF.....	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
5.1.	Condições cromatográficas.....	31
5.2.	Volume de Pré-concentração nos Cartuchos .....	33
5.3.	Validação do Método .....	34
5.4.	Avaliação da toxicidade do 2,4-D e 2,4-DCF.....	38
6.	CONCLUSÃO .....	41
	REFERÊNCIAS .....	42

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das principais atividades na economia brasileira, representando assim um setor importante no equilíbrio da balança comercial. De 2005 a 2014 a quantidade de agrotóxicos utilizada no país teve um aumento acima de 190%, ultrapassando a média mundial que é de 93% (IBGE, 2015). O estado do Maranhão é eminentemente agrícola e, na região nordeste do país, destaca-se como o segundo maior consumidor de agrotóxicos, sendo o nono no ranking nacional, utilizando cerca de 21 kg/ha de área plantada. Semelhante ao comportamento nacional, o estado apresentou taxa de consumo de agrotóxico crescente, sem aumento proporcional na área plantada. Tal comportamento tem sido atribuído ao aumento da produtividade agrícola (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; SAGRIMA, 2016). No entanto, é possível que também esteja relacionado ao uso excessivo de agrotóxicos, prática comum nos meios agrícolas, onde cerca de 40 % do total aplicado é superior ao necessário e se perde para o ambiente (WANG, *et al*, 2017; ABREU E ALONZO, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Buscando maior produtividade e melhor qualidade dos produtos, é comum a utilização de grande variedade de princípios ativos de agrotóxicos, os quais são pulverizados sobre as plantações, sendo diretamente liberados para o meio ambiente, atingindo as águas superficiais e subterrâneas. Atualmente há cerca de 1700 ingredientes ativos com uso autorizados no Brasil (ANVISA, 2017). Assim, pode-se considerar que a maior parte da população está exposta, de alguma forma, a tal contaminação (HELLER, *et al*, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A utilização de agrotóxicos tornou-se uma das principais causas da contaminação das águas no Brasil, devido à intensa utilização de tais produtos (WANG, *et al*, 2017; ABREU E ALONZO, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Estes produtos podem causar diversos efeitos colaterais aos organismos aquáticos e à saúde humana, dependendo do princípio ativo envolvido. Entre os principais efeitos, pode-se citar problemas no sistema nervoso central, nos sistemas cardiovascular e reprodutivo, além do aumento de vários tipos de câncer (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASEREGISTRY, 2007).

Dentre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil e no mundo, o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos mais comuns e antigos (AMARANTE JR, *et*

*al*, 2014). É classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como um herbicida hormonal de toxicidade I, portanto “extremamente tóxico”. Semelhante classificação é dada por órgãos internacionais, tais como a Organização Mundial de Saúde e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Em condições ambientais, o 2,4-D e alguns dos seus derivados são sólidos cristalinos, solúveis em águas naturais persistindo de duas a quatro semanas (AMARANTE JR, *et al*, 2014).

O principal metabólito do 2,4-D é o 2,4-diclorofenol, o qual foi relatado por diversos autores (AMARANTE JR. *et al*, 2014; QIUA, *et al*, 2016) ser mais tóxico que o composto originário, podendo causar uma série de efeitos adversos à saúde de muitos organismos aquáticos assim como dos seres humanos.

Tem-se, portanto, necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos que produzam resultados confiáveis e condizentes com os limites permitidos pela legislação, para determinação de agrotóxicos em matrizes ambientais. Para tanto, é necessária metodologia devidamente validada. Os parâmetros de validação a serem analisados são a seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, Tendência/ recuperação, exatidão, precisão e robustez (INMETRO, 2011).

Tradicionalmente são utilizadas as técnicas cromatográficas para fazer a análise de resíduos de agrotóxicos, pois estas fornecem uma capacidade de separação, identificação e quantificação quando utilizados detectores apropriados. As técnicas cromatográficas mais utilizadas são a Cromatografia Gasosa (CG) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), podendo a última ser acoplada a diferentes detectores, como por exemplo, o espectrômetro de massas (MS), o detector de arranjos de diodos (DAD) e o detector UV-vis.

Normalmente, para que seja possível a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes ambientais é necessário um pré-tratamento da amostra para remover os interferentes presentes na matriz (CALDAS, *et al*, 2011; QUEIROZ, *et al*, 2001; JARDIM, 2010). Dentre as técnicas de preparo de amostras podem-se citar a extração em fase sólida (EFS), a microextração em fase sólida (MEFS), a extração sortiva em barra magnética (SBSE), extração com fluido supercrítico (SFE) e a extração líquido-líquido (ELL).

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Poluição dos Recursos Hídricos**

Do verbo latino *polluere*, o termo “poluição” significa sujar. Ou seja, indica a ocorrência de alterações prejudiciais no meio ambiente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Rotineiramente os termos contaminação e poluição ambiental são usados como sinônimos, entretanto, há diferenças significativas entre estes termos. Contaminação diz respeito a ocorrência de alguma substância ou outro fator que altera a composição do meio, mas não causa danos a este. Já poluição, é utilizado nos casos em que a presença do contaminante causa efeitos adversos ao meio (HARRISON, 2001).

As principais causas de contaminação das águas são o grande crescimento populacional e a expansão das atividades industriais e agrícolas, sendo que esta expansão está diretamente relacionada ao crescimento populacional, pois é necessária uma intensa transformação de matérias-primas em bens de consumo, gerando grande quantidade de resíduos, cujo destino final não é definido. Assim, a qualidade do abastecimento público de água é uma preocupação crescente, pois a escassez dos recursos hídricos e a deterioração dos mananciais podem influenciar diretamente nas características da qualidade das águas.

A introdução de substâncias artificiais e estranhas ao meio, como o lançamento de agrotóxicos em rios é uma das três principais formas de contaminação das águas. As outras duas formas são a introdução de substâncias naturais e estranhas ao meio, como o aporte de sedimentos às águas de um lago e alteração na proporção ou nas características dos elementos constituintes do próprio meio, como a diminuição do teor de oxigênio dissolvido nas águas de um rio em decorrência da presença de matéria orgânica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Apesar dos cuidados com a qualidade dos mananciais de captações de águas superficiais destinada ao abastecimento humano, estes estão expostos a fatores que comprometem a qualidade das águas captadas. O esgoto sanitário, os resíduos de agrotóxicos e a destinação inadequada do lixo foram relatados como responsáveis por 72% das incidências de contaminação na captação em mananciais superficiais. Entre as três formas de captação, a de água superficial foi a que apresentou maior incidência de problemas com fontes de poluição ou contaminação (IBGE, 2011).

A vigilância em saúde ambiental no Brasil é regulamentada pela Instrução Normativa nº 01, de 07 de março de 2005, Portaria nº 1.172/2004 GM, que estabelece as competências da União, Estados, Municípios e Distrito Federal na área de vigilância em saúde ambiental no país. É importante destacar que tanto a qualidade da água quanto a sua quantidade e regularidade de fornecimento são fatores determinantes para o acometimento de doenças no homem. Portanto, o estudo da contaminação de águas superficiais por agrotóxicos é de suma importância, tendo em vista as consequências que podem causar aos seres humanos e ao meio ambiente.

A Portaria Nº 2914 de 12/12/2011, do Ministério da Saúde, dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, regulamentando os limites máximos de algumas substâncias químicas que representam risco à saúde. São regulamentadas por esta portaria algumas substâncias químicas, tais como os metais cobre, níquel, mercúrio, cádmio, etc. São também regulamentadas substâncias orgânicas como benzeno, estireno, tetracloroetano e alguns agrotóxicos, como o alaclor, atrazina, diuron, 2,4-D, entre outros. Entretanto, dos mais de 500 ingredientes ativos de agrotóxicos existentes apenas 27 deles são regulamentados pela portaria.

## **2.2. Monitoramento de Agrotóxicos em Água para Consumo Humano no Brasil**

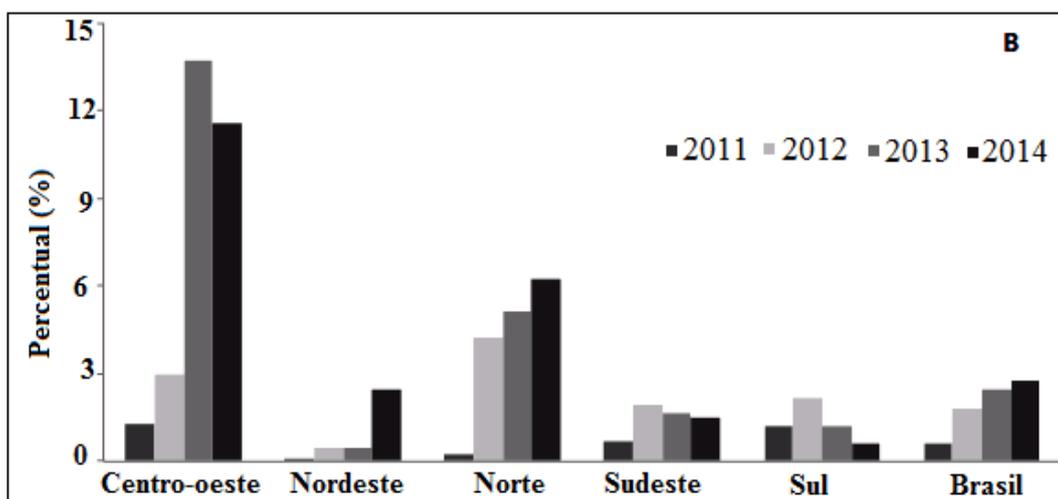
Para obtenção de água potável são necessários processos de tratamento adequados às peculiaridades da água do manancial (HELLER, *et al*, 2006). A presença de agrotóxicos nos mananciais pode trazer dificuldades para o tratamento da água devido à necessidade de tecnologias mais avançadas do que as tradicionalmente utilizadas. Por isso, há uma crescente necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos que produzam resultados confiáveis para determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes ambientais.

A grande dificuldade de adoção de medidas que impeçam a contaminação dos rios e lagos por agrotóxicos se dá devido à forma difusa com que ocorre o transporte de tais substâncias. Além de sua difícil biodegradabilidade, muitos desses compostos apresentam características carcinogênicas, mutagênicas e até mesmo teratogênicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O Brasil, desde 2008, é considerado um dos países que mais consome agrotóxicos. Logo, os riscos relacionados à exposição humana a essas

substâncias químicas, presentes em diferentes compartimentos ambientais, são uma realidade no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Estes produtos podem causar efeitos adversos não somente aos seres humanos, mas principalmente aos organismos aquáticos, pois ao atingir as águas dos rios e lagos entram em contato direto com tais seres vivos.

No Brasil, desde 2007 são realizadas análises para monitorar agrotóxicos e a qualidade da água pelo Ministério da Saúde. Os dados do percentual de municípios monitorados quanto à presença de agrotóxicos em água para consumo humano, por região geográfica no Brasil de 2011 a 2014 estão representados na figura 1. A região brasileira que há mais registros de dados quanto ao monitoramento destes produtos em água é o Centro-oeste, enquanto a que menos apresentou tais dados foi a região Nordeste.

Figura 1: Percentual de municípios monitorados quanto à presença de agrotóxicos em água, no período de 2011 a 2014.

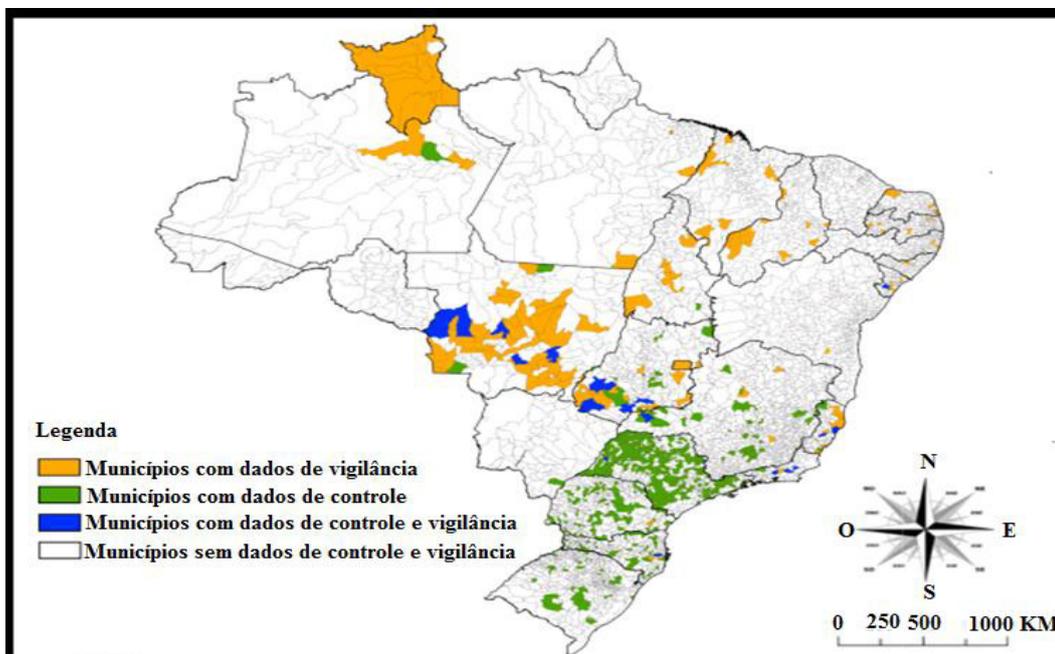


Fonte: SISAGUA, 2014

Entretanto, para o estado do Maranhão, segundo o Ministério da Saúde (2014), não há dados de controle nem monitoramento até o ano de 2012. Em 2013, apenas um município maranhense apresentou dados de monitoramento de agrotóxicos em água. Em 2014, sete municípios apresentaram tais dados. A situação, tanto de monitoramento quanto de controle de agrotóxicos no Brasil para o ano de 2014, está representada na Figura 2. Pode-se ver que houve um aumento do número de cidades e municípios que aderiram ao monitoramento de resíduos de agrotóxicos em água, porém esse número

ainda é pequeno, considerando que a maioria dos estados brasileiros tem a agricultura como uma das principais atividades econômicas.

Figura 2: distribuição espacial dos municípios que realizaram o monitoramento de agrotóxicos em água para consumo humano no Brasil, em 2014.



Fonte: SISAGUA, 2014.

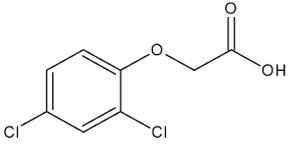
### 2.3. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e seu principal metabólito, 2,4-diclorofenol (2,4-DCF)

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos herbicidas mais comuns e antigos do mundo. É comercializado em formulações de sais de amina e éster, sendo de ação pós-emergente (CASTRO, 2010). Usado há bastante tempo, o 2,4-D e outros produtos fenoxiacéticos continuam sendo mundialmente usados como ferramentas básicas na agricultura moderna (MEKONEN, *et al*, 2016; MASSEY, *et al*, 2014; MORGAN, 2015; PINHEIRO, *et al*, 2010; XIONG, *et al*, 2014; HARRAHY, *et al*, 2014; WIJNJA, *et al*, 2014; DONALD, *et al*, 2007), devido às suas vantagens como herbicida seletivo de folha larga.

Valores de meia-vida do 2,4-D em solos variam de 6,4 dias em solos minerais a 8,3 dias em solos orgânicos (AMARANTE JR., 2014). Em águas naturais, possui maior persistência, podendo chegar até 4 semanas, dependendo das condições no ambiente aquático. Suas propriedades químicas assim como sua estrutura são apresentadas na Tabela 1. Este princípio ativo é comercializado em mais de 1500 produtos diferentes e

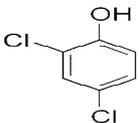
em algumas formulações de misturas de herbicidas, o que pode aumentar seu caráter tóxico.

Tabela 1: Estrutura molecular e propriedades químicas do 2,4-D.

	<p>Ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D)</p> <p>Fórmula Molecular: C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub></p>
Solubilidade em água a 25 °C / (g L <sup>-1</sup> )	0,9
pK <sub>a</sub>	2,6
Log K <sub>ow</sub>	2.58 –2.83
Tempo de meia-vida em águas naturais	2 a 4 semanas

O 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) é o metabólito intermediário da degradação do 2,4-D e que possui considerável toxicidade. A degradação do herbicida 2,4-D requer, portanto, atenção especial, pois há formação de produtos intermediários que podem ser mais tóxicos que o composto original. O 2,4-DCF é um composto não biodegradável, possui odor característico, é muito solúvel em água, tem certa mobilidade em solos e pode estar presente no ambiente aquático de diversas formas, seja adsorvido em sólidos suspensos ou em sedimentos bentônicos (RESENDE, 2011). Suas propriedades químicas estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades químicas do 2,4-diclorofenol.

	<p>2,4-diclorofenol (2,4-DCF)</p> <p>Fórmula Molecular: C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OCl<sub>2</sub></p>
Solubilidade em água a 20 °C (g L <sup>-1</sup> )	4,6
pK <sub>a</sub>	8,05
Log K <sub>ow</sub>	3,06

#### 2.4. Técnicas Cromatográficas para Análise de Agrotóxicos em água.

Atualmente, a maioria dos agrotóxicos usados possui caráter relativamente polar, e, por isso, dificilmente determinados por Cromatografia Gasosa sem uma etapa prévia de derivatização, o que aumenta o custo das análises. Em contrapartida, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma alternativa viável para a análise de tais substâncias, pois além de não ser preciso a etapa de derivatização, esta técnica permite a análise de substâncias termicamente instáveis. Frequentemente são publicados trabalhos utilizando

cromatografia líquida e cromatografia gasosa, acopladas a Espectrometria de Massas na determinação de resíduos de agrotóxicos. Entretanto, métodos que utilizam CLAE com detecção por arranjo de diodos (DAD) ainda são empregados, principalmente para a análise de herbicidas mais polares, pois não demandam um elevado investimento em instrumentação.

## **2.5. Extração em Fase Sólida**

Uma das técnicas de preparo de amostras mais utilizadas em matrizes ambientais é a Extração em Fase Sólida (EFS). Esta técnica permite a detecção de analitos em concentrações muito baixas. É utilizada para extrair analitos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas, mas também pode ser usada para amostras sólidas pré-extraídas com solventes. A fase sólida utilizada para extrair e concentrar os analitos são também denominadas de adsorventes, as quais são recheadas em cartuchos, nas formas de barril ou seringa (JARDIM, 2010).

Na SPE os analitos presentes em matriz aquosa são extraídos, após passarem por um cartucho contendo sorvente. Normalmente, utiliza-se um solvente orgânico seletivo para remover os interferentes e outro para eluir os analitos de interesse (BARRIONUEVO, 2001). Os materiais utilizados como adsorventes nos cartuchos, em geral, são semelhantes aos usados em cromatografia líquida (QUEIROZ, 2001).

A remoção de interferentes da matriz, o isolamento e concentração dos analitos são os principais objetivos da EFS. Portanto, na técnica parte-se de um grande volume de amostra para um volume pequeno permitindo, assim, a análise tanto qualitativa quanto quantitativa, em nível de traços. O fator de concentração é obtido pela razão entre o volume inicial de amostra aplicado no cartucho e o volume final de solução concentrada (JARDIM, 2010).

## **2.6. Validação de Método Analítico**

A validação de métodos analíticos é fundamental para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e de qualidade. Através de estudos experimentais deve-se garantir que o método atenda às necessidades das aplicações analíticas à que se destina assegurando a confiabilidade dos resultados mediante critérios objetivos (INMETRO, 2011; ANVISA, 2016).

Dependendo do uso pretendido de um método analítico, há muitos parâmetros que devem ser validados. Pois, um método validado elucida problemas imprevisíveis durante a rotina de trabalho (CHAUHAN, 2015). Os parâmetros de validação devem incluir, quando aplicável, a especificidade e seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e tendência, precisão, robustez e incerteza de medição (INMETRO, 2011).

#### 2.6.1. SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE

A especificidade e a seletividade estão relacionadas à detecção. Um método específico é aquele que produz resposta para apenas um analito. Se, no entanto, produz respostas para vários analitos e é possível distinguir a resposta de cada analito, é chamado seletivo. A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Tais componentes podem aumentar ou reduzir o sinal analítico (INMETRO, 2011).

Em métodos cromatográficos, devem-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. Para isso, vários testes e suas estatísticas correspondentes podem ser utilizados para o estudo da seletividade, dependendo da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse (ANVISA, 2016).

#### 2.6.2. LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DE TRABALHO

Linearidade expressa a capacidade de um método analítico produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração. Este parâmetro pode ser obtido por padronização interna ou externa e formulado como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2011; ANVISA, 2016).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos experimentos em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada à reta como modelo matemático (INMETRO, 2011; ANVISA, 2016). Para o estabelecimento da linearidade deve-se utilizar no mínimo

cinco concentrações diferentes para as soluções em triplicata, conforme o caso em estudo (ANVISA, 2016).

A faixa linear de trabalho de um método analítico é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. Já no limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2011).

### 2.6.3. SENSIBILIDADE

Segundo o INMETRO (2011), a sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da reta de regressão da curva analítica e é determinada simultaneamente com os testes de linearidade. Pode ser expressa pela seguinte equação:

$$S = \frac{dc}{dx} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:  $S$  = sensibilidade;  $dx$  = variação da resposta;  $dc$  = variação da concentração.

### 2.6.4. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

A menor concentração do analito de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental é denominada LD, enquanto LQ é a mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão (0 a 15%) e exatidão do método durante as operações de rotina do laboratório (INMETRO, 2011). Mediante a equação da reta obtida com a curva analítica ou pelo método visual, chamado método sinal-ruído, é possível determinar ambos os limites. A ANVISA (2016) recomenda que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base e para a determinação do limite de detecção baseada em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser calculado por:

$$LD = 3,3 * \frac{\sigma}{IC} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração,  $\sigma$  é o desvio padrão.

Já para a determinação do limite de quantificação pelo método sinal-ruído, recomenda-se que o LQ seja 10 vezes maior que o ruído da linha de base. Baseado em parâmetros da curva analítica, o LOQ pode ser calculado por:

$$LD = 10 * \frac{\sigma}{IC} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que: IC é inclinação da curva analítica;  $\sigma$  o desvio padrão residual da linha de regressão.

#### 2.6.5. PRECISÃO

Precisão diz respeito à avaliação da dispersão de resultados entre experimentos independentes quando executados sob as mesmas condições, sendo normalmente representada por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade (INMETRO, 2011). A precisão pode ser expressa em termos do desvio-padrão, desvio-padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) das medidas de concentração das amostras.

A repetitividade é a capacidade do método em repetir, em um curto intervalo de tempo, os resultados obtidos nas mesmas condições de análise, ou seja, com o mesmo analista, com o mesmo equipamento, no mesmo laboratório e fazendo uso dos mesmos reagentes. A precisão intermediária define a capacidade do método em fornecer os mesmos resultados quando executado por analistas diferentes em dias diferentes e em equipamentos diferentes, porém no mesmo laboratório. Já a reprodutibilidade é definida quando um método é executado utilizando as mesmas condições cromatográficas, porém em laboratórios diferentes, ou seja, diferentes analistas, equipamentos e solventes.

#### 2.6.6. EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico é definida como sendo a concordância entre o resultado de um experimento e o valor de referência aceito como verdadeiro. Os procedimentos utilizados para avaliar a exatidão de um método são o uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2011).

Assim como a precisão, a exatidão também é um parâmetro que permite julgar a confiabilidade do método analítico. A ANVISA, 2016, recomenda que a exatidão, assim

como a precisão deve ser investigada pela análise de, no mínimo, 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta), analisados em 5 replicatas de preparo de amostras.

#### 2.6.6.1. Efeito Matriz

A investigação do efeito de matriz durante o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de analitos em matriz ambiental é um importante parâmetro a ser avaliado. Segundo a ANVISA, 2016, o efeito matriz se refere ao efeito na resposta do analito causado por componentes da matriz. Pode ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a substância química de referência (SQR) do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito. Este efeito ocorre quando na matriz há substâncias que coeluem ou interagem com os compostos de interesse, causando alterações no sinal do analito. A intensidade do efeito matriz também pode ser calculado pela seguinte relação:

$$EM (\%) = \frac{\text{Coeficiente angular da curva analítica na matriz}}{\text{Coeficiente angular da curva analítica em solvente}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Para valores de EM igual a 1, nenhum efeito de matriz é observado, EM menor que 1 sugere supressão da resposta do analito, enquanto que EM maior que 1 pode ser causado por um aumento no sinal deste devido à coeluição de algum interferente da matriz. A variabilidade de EM deve apresentar coeficiente de variação menor que 15%. Para calcular a percentagem de efeito matriz em cada nível de concentração da curva analítica na matriz pode-se utilizar a equação abaixo (Kruve *et al.*, 2008).

$$EM (\%) = \frac{\text{Área do padrão adicionado à matriz} \times 100\%}{\text{Área do padrão no solvente}} \quad (\text{Eq. 5})$$

#### 2.6.6.2. Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de preparo das amostras. A partir dos resultados obtidos para o analito extraído da matriz e com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente, pode-se calcular a porcentagem de recuperação do método, ou seja, sua eficiência.

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo em, pelo menos, três diferentes concentrações.

Os níveis devem ser próximos ao limite de detecção, próximos à concentração máxima permissível e em concentração próxima à média da faixa de uso do método (INMETRO, 2011; ANVISA, 2016). A recuperação é calculada segundo a equação a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C1 - C2}{C3} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Na qual:  $C1$  = concentração determinada na amostra adicionada,  $C2$  = concentração determinada na amostra não adicionada,  $C3$  = concentração adicionada.

#### 2.6.7. ROBUSTEZ

A robustez mede a sensibilidade que um método analítico apresenta quando sujeito a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar-se praticamente insensível às pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado (INMETRO, 2011).

Para avaliar a robustez de um método analítico é necessário examinar as possíveis causas de variações dos resultados que possam ser causados por fatores externos, tais como: pH, força iônica e quantidade de solvente orgânico da fase móvel, temperatura da coluna, vazão da fase móvel, diferentes colunas, assim como os procedimentos envolvidos no preparo das amostras. Para o método ser considerado robusto os resultados obtidos após as alterações das condições analíticas devem estar dentro dos limites aceitáveis de exatidão e precisão.

#### 2.7. Avaliação do impacto do uso de agrotóxicos sobre organismos vivos

É sabido que muitas substâncias sintéticas podem causar efeitos adversos à saúde dos organismos vivos, dos menos aos mais desenvolvidos. Os agrotóxicos não são exceções e apresentam certa toxicidade dependendo do princípio ativo envolvido. Assim, a fim de avaliar os efeitos causados por estes produtos, tradicionalmente são feitas avaliações de risco ambiental.

A avaliação de risco ambiental é a análise cuidadosa da probabilidade de um material manufaturado ou não em causar algum efeito adverso ao ecossistema devido à sua exposição aguda ou crônica a tal contaminante. Por meio das avaliações de risco ambiental é possível avaliar sistematicamente as relações entre os agrotóxicos e seus possíveis efeitos adversos ao meio ambiente, sendo possível assim, ter maior base para as tomadas de decisões quanto às questões ambientais (REBELO e CALDAS, 2014).

A área da toxicologia que analisa tais efeitos adversos de substâncias químicas manufaturadas ou naturais sobre o meio ambiente é a Ecotoxicologia. São avaliadas substâncias como, por exemplo, pesticidas, derivados do petróleo, detergentes e metais sobre os organismos aquáticos (SOUSA, 2002, apud PIMENTEL *et al*, 2011).

Ensaio ecotoxicológicos vêm sendo empregados no monitoramento de efluentes industriais objetivando minimizar o impacto ambiental da indústria, de efluentes agrícolas e como forma de avaliar a eficiência de estações de tratamento de água e esgoto. Também são requisitos para a obtenção e a manutenção de licenças junto aos órgãos ambientais de monitoramento de poluição e contaminação aquática. (SOUSA, 2002, apud PIMENTEL *et al*, 2011; Costa, Espíndola, 2000).

Há vários organismos teste que podem ser utilizados nestes ensaios, como por exemplo, a bactéria *Vibrio fischeri*, o peixe *Danio Rerio*, os microcrustáceos *Daphnia magna* e *Artêmia salina*, dependendo do meio e exposição. Ensaio de toxicidade aguda com *Artêmia salina* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer pequena quantidade de amostra (NUNES, *et al*, 2002; AYDIN, *et al*, 2015; PIMENTEL, *et al*, 2011, CARBALLO, *et al*, 2002).

A *Artêmia salina* é um microcrustáceo da classe anostracea e família artemidae. Possui um ciclo de vida relativamente curto, sendo iniciado pelo estágio larval chamado de náuplios, seguido pelo estágio metanáuplios, com cerca de 6 dias atingem o estágio pré-adultos ou jovens e com 10 dias alcançam a fase adulta, dependendo das condições do meio em que se encontram (VINATEA, 1994).

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda podem ser expressos de várias formas, como por exemplo, através da concentração de efeito (CE50), concentração de inibição (CI50) e a concentração letal (CL50), a qual corresponde à concentração da amostra responsável pelo efeito em 50% dos organismos ensaiados. Mediante os cálculos matemáticos é possível prever as concentrações intermediárias que causam efeito sobre a população exposta e, quanto mais baixo for este valor, mais elevada será a toxicidade da amostra avaliada (ARENZON, *et al*, 2011). Portanto, CL50-24h, e CL50-48h são as concentrações efetivas medias que causam efeito agudo em 50% dos organismos-teste, após 24 e 48 horas de exposição, respectivamente.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Validar método analítico para determinação de 2,4-D em águas naturais superficiais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado com detector de arranjo de diodos e realizar a avaliação da toxicidade deste herbicida assim como seu principal metabólito, 2,4-diclorofenol, frente a *Artêmia salina*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a linearidade e faixa de trabalho do método analítico.
- Avaliar a seletividade do método analítico
- Definir o limite de detecção e limite de quantificação do método analítico.
- Avaliar a precisão do método analítico.
- Avaliar a exatidão do método analítico.
- Avaliar a robustez do método analítico.
- Realizar testes ecotoxicológicos com o 2,4-D e seu principal metabólito, 2,4-diclorofenol, utilizando *Artêmia salina* como organismo-teste.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Materiais e reagentes**

Os padrões de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), com pureza de 99.9%, foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os solventes orgânicos de grau cromatográfico, acetonitrila (ACN) e ácido fórmico, foram obtidos da Merck. Água ultrapura (18  $\Omega$ .m) foi obtida do sistema Milli-Q, da Millipore (Direct-Q UV 3). Cartuchos para extração em fase sólida, do tipo seringa, foram obtidos da Phenomenex (StrataC-18-E, 55  $\mu$ m, 500 mg, 6 mL). Para a realização dos testes preparou-se solução estoque de 2,4-D em acetonitrila, a partir da qual foram feitas diluições para as soluções de trabalho, preparadas em água ultrapura. As amostras de água superficial do Rio da Prata foram filtradas em membranas de microfibras de vidro adquiridas da Merck, com tamanho de partículas de 0,2  $\mu$ m (Filtro AP 15, 47 mm de diâmetro). Todos os testes foram realizados em triplicata. Para os testes de toxicidade foram adquiridos ovos de *Artemia Salina* na Maramar e sal marinho na MF Aquarium.

### **4.2. Condições Cromatográficas**

As análises foram realizadas em Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência, acoplado a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD) da Shimadzu, modelo DGU-20, com injeção manual. Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna SunFire C18 (Waters), com dimensões de 100 x 3,0 mm e diâmetro de partícula de 3,5  $\mu$ m. A validação da metodologia analítica foi feita após o estudo das condições cromatográficas que melhor se adaptaram à substância em estudo, tais como constituintes da fase móvel, gradiente de eluição, tempo de retenção e comprimento de onda de maior absorção pelo analito. Utilizou-se fase móvel constituída por acetonitrila (componente A) e solução aquosa de ácido fórmico pH 2,18  $\pm$  0,1 (componente B) (45A:55B), em modo isocrático, por seis minutos e fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi 20  $\mu$ L.

### **4.3. Amostragem e preparo de amostras**

A coleta de amostras para validação dos parâmetros analíticos foi realizada no Rio da Prata, localizado no bairro do Maracanã, na porção Sudoeste da Ilha de São Luís, MA (2°35'54.5"S 44°16'08,0"W). Este rio integra o Parque Estadual do Bacanga, é um dos pontos de captação de água do sistema produtor de água Sacavém da Companhia de

Saneamento Ambiental do Maranhão, o qual contribui com 20% do abastecimento público da população da Ilha de São Luís (CAEMA, 2015).

O Parque Estadual do Bacanga foi criado pelo Decreto Estadual nº 7.545 de 02 de março de 1980 (MARANHÃO, 1980). Nas áreas próximas do Rio da prata (Reservatório do Batatã) e entorno são encontradas as unidades de uso e ocupação da mata ciliar, proporcionando uma área degradada (sem vegetação), urbanizada ou em fase de urbanização (PEREIRA, 2006). Na zona de recuperação da APA encontram-se as áreas degradadas e ocupações espontâneas do Recanto Verde. Essa ocupação e o Bairro Vila Itamar, contribuem com a contaminação das águas do Igarapé Batatã por coliformes fecais e termo-tolerantes que escoam para o reservatório (PEREIRA, 2011)

Foram coletadas amostras de águas superficiais do Rio da Prata nos dias 27 de Janeiro e 08 de março de 2017, ambas coletadas no período matutino. As amostras foram conservadas em frascos âmbar e transportadas em caixa térmica ( $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) até o laboratório onde foram feitas, logo em seguida, as etapas de preparo de amostras. As amostras foram filtradas primeiramente em papel de filtro qualitativo e depois em membrana de microfibras de vidro com capacidade de retenção de partículas de  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  (Filtro AP 15, Merck) para filtração das amostras. Tais amostras foram também utilizadas para a realização dos testes de recuperação, avaliação do efeito matriz e testes de volume de pré-concentração nos cartuchos. A extração do analito foi feita em cartuchos C-18 por meio da extração em fase sólida (EFS), seguida de redução de volume em sistema Syncore Analyst (BUSHI). O procedimento é apresentado na Figura 3. Utilizou-se ácido fórmico para acidificar a acetonitrila até o  $\text{pH } 2,3 \pm 0,1$ .



Figura 3: Procedimento de extração em fase sólida utilizado para remover o analito da matriz.

#### 4.4. Volume de pré-concentração nos cartuchos

Para determinar o volume de amostra a ser utilizado na validação do método (volume de ruptura) fez-se experimentos com volumes de amostras variando de 100 a 1000 mL. Foram preparadas soluções contendo 0,5 mg do analito em diferentes

volumes de amostra real, ou seja, diferentes concentrações, a fim de se avaliar a quantidade máxima e mínima de analito que pode ser adsorvida na fase estacionária escolhida (C18). Além do efeito matriz que pode variar com o aumento do volume de amostra, outro aspecto a ser considerado é o fator de concentração, pois quanto maior o volume de amostra utilizado nos cartuchos, maior é o fator de concentração, logo menor será a sensibilidade do método. O fator de concentração é a relação entre o volume inicial de amostra e o volume final de extrato. Nos experimentos foram utilizados 100, 250, 500, 750 e 1000 mL de amostras resultando em 1 mL de extrato.

#### **4.5. Validação analítica**

Os parâmetros analíticos para validação do método foram avaliados de acordo com o guia do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2011) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2016), sendo eles: linearidade e faixa de trabalho, seletividade, limite inferior de detecção (LD), limite inferior de quantificação (LQ), precisão, recuperação, efeito matriz e robustez.

Para o estudo da linearidade, curvas analíticas foram obtidas a partir de solução padrão de 2,4-D em água ultrapura, em concentrações de 0,05 a 20 mg L<sup>-1</sup>. As curvas foram utilizadas para verificar a resposta linear do detector. A faixa de trabalho foi definida a partir da avaliação dos pontos que se mostraram dentro da faixa linear do método e a partir do limite de quantificação obtido.

A seletividade do método foi avaliada por meio da análise de amostras da matriz fortificadas em concentrações próximas ao LQ e injetadas em triplicata, cujos resultados foram comparados com aqueles obtidos das amostras em branco.

Neste trabalho foram utilizados os coeficientes de variação como medida de precisão analítica. A precisão das medidas foi avaliada em níveis de repetitividade, no qual foram feitas injeções consecutivas por um mesmo analista e no mesmo dia, e precisão intermediária, na qual se fez injeções por dois analistas e em dias diferentes, sob as mesmas condições.

A exatidão foi avaliada por meio do efeito matriz e da recuperação do analito após passar pelo procedimento de extração da matriz. Ambos podem ser estimados pela análise de amostras reais adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras foram fortificadas com o analito em três diferentes concentrações, sendo próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima da faixa linear de

trabalho e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. O efeito matriz foi calculado utilizando a Eq. 4 e Eq. 5. A recuperação foi calculada pela Eq. 6.

Para determinar a robustez do método, recorreu-se ao teste de Youden, pois este permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (CÉSAR e PIANETTI, 2009). O Teste de Youden mostra como, em oito experimentos, é possível avaliar a influência de cada variação. Os parâmetros variados no teste, assim como as quantidades nominal e variável de cada parâmetro encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros avaliados no teste de Youden.

Parâmetros	Nominal		Variável	
Proporção da fase móvel	45% B	(A)	50% B	(a)
pH da fase móvel	2,18 ± 0,1	(B)	2,20 ± 0,1	(b)
Temperatura da coluna	30 °C	(C)	35 °C	(c)
Fluxo da fase móvel	0,5 mL/min	(D)	0,6 mL/min	(d)
Marca da Acetonitrila	Merck	(E)	J. T. Backer	(e)
Analistas	X	(F)	Y	(f)

Na Tabela 4 é apresentado o planejamento experimental para avaliação da robustez segundo o Teste de Youden. Todas as medidas de concentração foram realizadas em triplicata, sendo analisados os efeitos sobre o tempo de retenção e área do pico do analito.

Tabela 4: Planejamento experimental do Teste de Youden.

Parâmetros	Combinação Fatorial *							
	Exp.1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp.5	Exp.6	Exp.7	Exp.8
<i>Proporção da F. M.</i>	A	A	A	A	A	a	A	a
<i>pH da fase móvel</i>	B	B	b	B	B	B	B	b
<i>Temperatura da coluna</i>	C	c	C	C	C	c	C	c
<i>Fluxo da fase móvel</i>	D	D	d	D	D	d	D	D
<i>Marca da Acetonitrila</i>	E	e	E	E	E	E	E	E
<i>Analistas</i>	F	f	f	F	F	f	F	F
<i>Resultados</i>	<i>S</i>	<i>T</i>	<i>U</i>	<i>V</i>	<i>W</i>	<i>X</i>	<i>Y</i>	<i>Z</i>

\* Os parâmetros das variáveis A/a, B/b ... estão especificados na Tabela 3.

#### 4.6. Avaliação da toxicidade do 2,4-D e 2,4-DCF

A avaliação da toxicidade foi realizada através de testes de toxicidade aguda com *Artêmia salina*. Ovos de *Artemia salina* foram adquiridos comercialmente (MARAMAR) e colocados para eclodirem em Erlenmeyers em solução sintética de sal marinho a  $30 \text{ g L}^{-1}$  com pH entre 8,5 e 9,0 e mantidos em incubadora de fotoperíodo (SOLAB CIENTIFICA, SL 225) de 12 h claro/ 12 h escuro, a  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 48 horas com aeração constante. Neste período, estas condições são ideais para os náuplios atingirem a fase ótima para execução dos testes.

Os experimentos foram realizados com soluções de 2,4-D e 2,4-DCF, em pH entre 8,5 e 9,0 em concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; e  $40 \text{ mg L}^{-1}$  em placas estéreis de 12 cavidades, adicionando-se 10 náuplios em cada cavidade. A placa foi preparada com três réplicas por concentração, sendo o volume final de 5 mL em cada cavidade e incubada a  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após os períodos de 24 e 48 horas, os organismos mortos e vivos em cada réplica foram contados com uso de microscópio. Testes-controle com a solução sintética de sal marinho, sem a presença do agente tóxico, foram realizados para garantir que a mortalidade dos organismos-teste decorreria apenas em função da presença do contaminante e não por algum fator externo.

Neste trabalho, utilizou-se soluções do composto de referência Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) em concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 25,0 e  $35,0 \text{ mg L}^{-1}$  para controle de sensibilidade e determinação da  $CL_{50-24h}$  e  $CL_{50-48h}$ , a qual foi utilizada na avaliação da toxicidade de 2,4-D e de 2,4-DCF à biota aquática. Os bioensaios realizados foram adaptados do método descrito por Veiga e Vital (2002). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo cada um, preparado com três replicatas, totalizando um total de nove ensaios para cada concentração. Foram realizados os cálculos de concentração letal média ( $CL_{50}$ ) para exposição a períodos de 24 e 48 horas utilizando o método estatístico PROBIT (EPA-US).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Condições cromatográficas

Após as adaptações das condições cromatográficas, a fase móvel que apresentou melhor resultado foi acetonitrila:água (45:55 v/v) na vazão de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . O tempo de retenção e o espectro de absorção molecular foram utilizados para determinar a identidade dos analitos nas amostras (Figura 4), comparando-os com os obtidos das soluções padrão (Figura 5). O analito foi monitorado no comprimento de onda 230 nm, apresentando tempo de retenção de  $4,0 \pm 0,1$  minutos, conforme pode ser observado na Figuras 6.

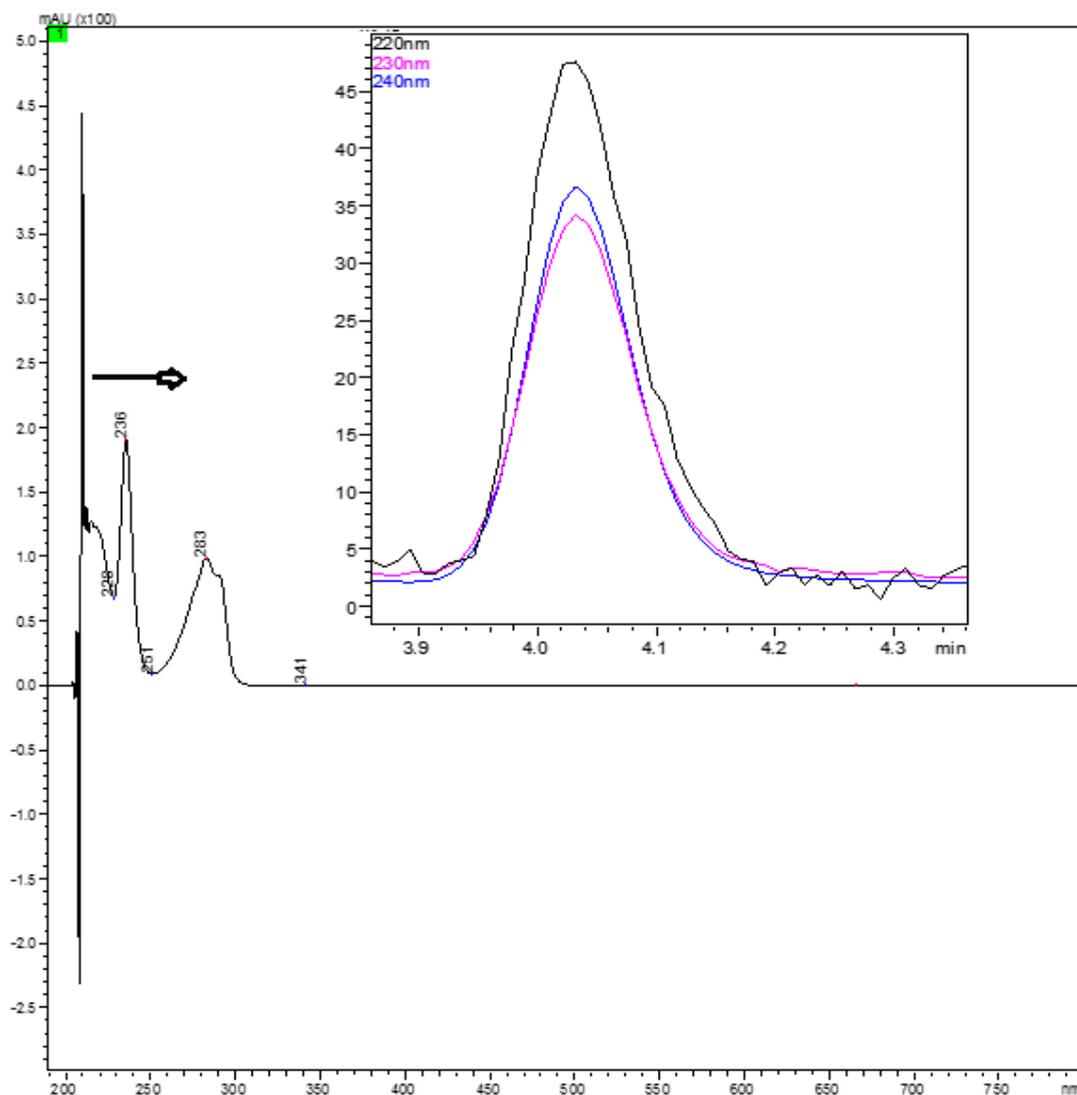


Figura 4: Espectros obtidos para 2,4-D em água natural superficial do Rio da Prata, utilizando acetonitrila:água (45:55 v/v) na fase móvel sob fluxo de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

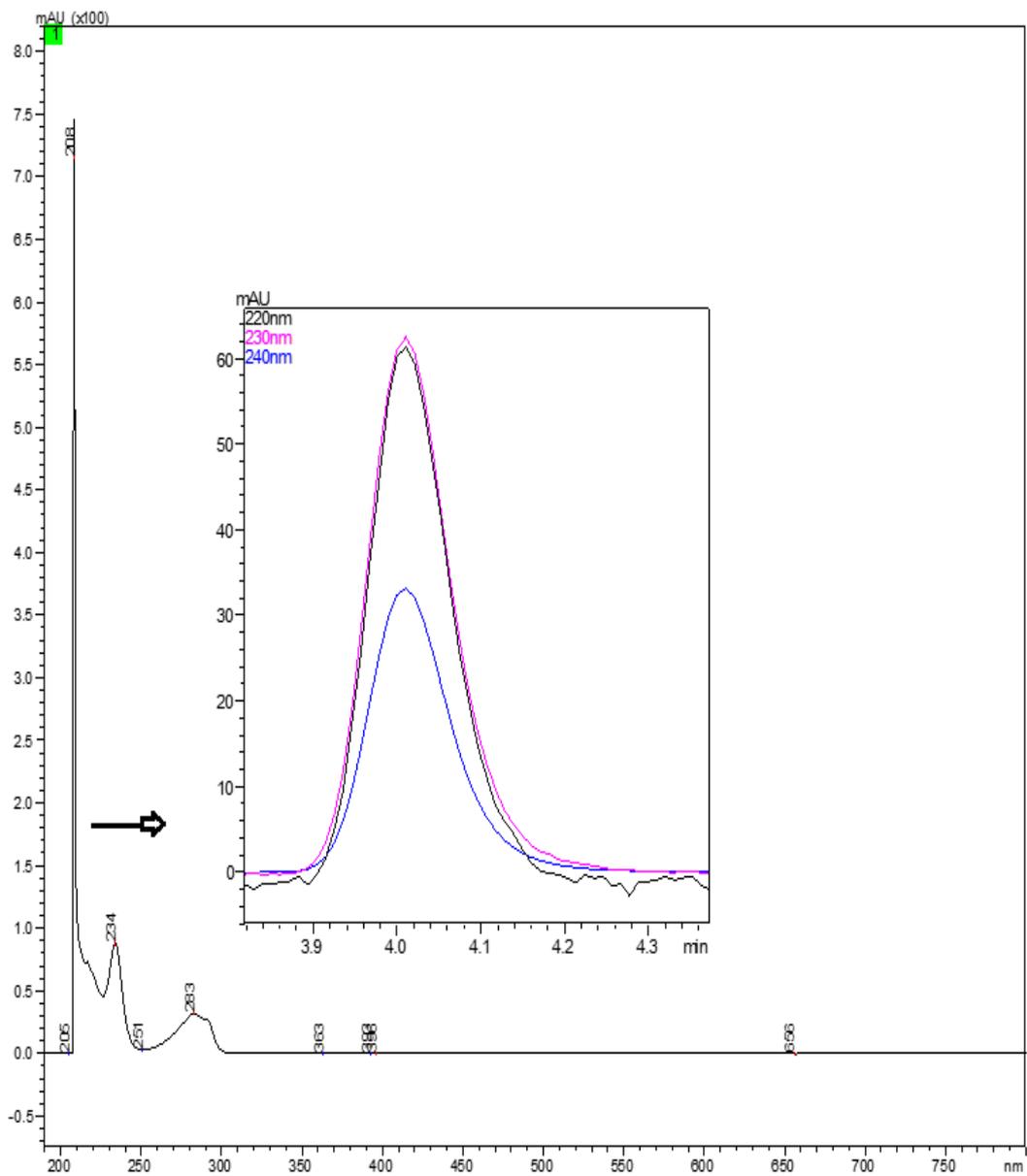


Figura 5: Espectros obtidos para 2,4-D em solvente utilizando acetonitrila:água (45:55 v/v) na fase móvel sob fluxo de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

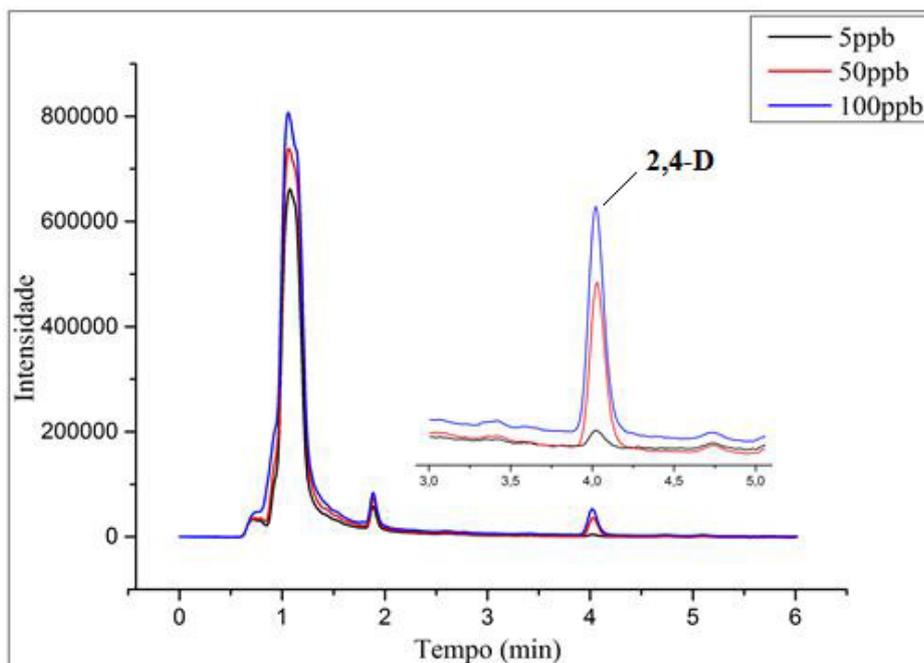


Figura 6: Cromatogramas obtidos pela injeção de soluções em concentração crescente de 2,4-D na matriz, utilizando na fase móvel acetonitrila:água (45:55 v/v) sob fluxo de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , monitorando o comprimento de onda 230 nm.

Apesar da grande utilização da CLAE acoplada com espectrometria de massa para identificação e quantificação precisas de analitos em matriz ambiental, esta instrumentação ainda é bastante dispendiosa e nem sempre está disponível em todos os laboratórios de análises ambientais. Por essa razão, procedimentos analíticos suficientemente seletivos e sensíveis que envolvem instrumentação de baixo custo, como o CLAE-DAD, podem ser utilizados em análise de resíduos de pesticidas uma vez que a confiabilidade da identificação de um analito por DAD é comparável à confiabilidade da identificação por espectrometria de massas, quando utilizado padronização externa.

## 5.2. Volume de Pré-concentração nos Cartuchos

A avaliação do volume de amostra a ser pré-concentrada (volume de ruptura) indicou que a extração em fase sólida utilizando-se de 100 a 500 mL de amostra forneceu recuperações superiores a 80%, diminuindo sensivelmente para maiores volumes de amostra. Para volume de 1000 mL, excedeu o volume de ruptura do cartucho, não sendo possível ter boa recuperação do analito. As taxas de recuperação, de cada volume testado estão representadas na Figura 7. Segundo a Portaria Nº 2914 de

12/12/2011 do Ministério do trabalho, a Organização Mundial da Saúde e a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a concentração de 2,4-D permitida em água superficial é  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , então, optou-se em trabalhar com 100 mL de amostras devido à sensibilidade apropriada do método, visto que o LD é  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , 12 vezes menor que o limite permitido. Outro fator que influenciou na escolha deste volume foi o menor tempo de preparo de amostras. Apesar de ter sido escolhido trabalhar com 100 mL de amostras, pode-se optar também por 250 ou 500 mL, pois as recuperações para estes volumes ficaram acima de 80%, que é o recomendado pelo INMETRO, sendo a vantagem desses volumes maiores, o fator de concentração, que implica na sensibilidade do método.

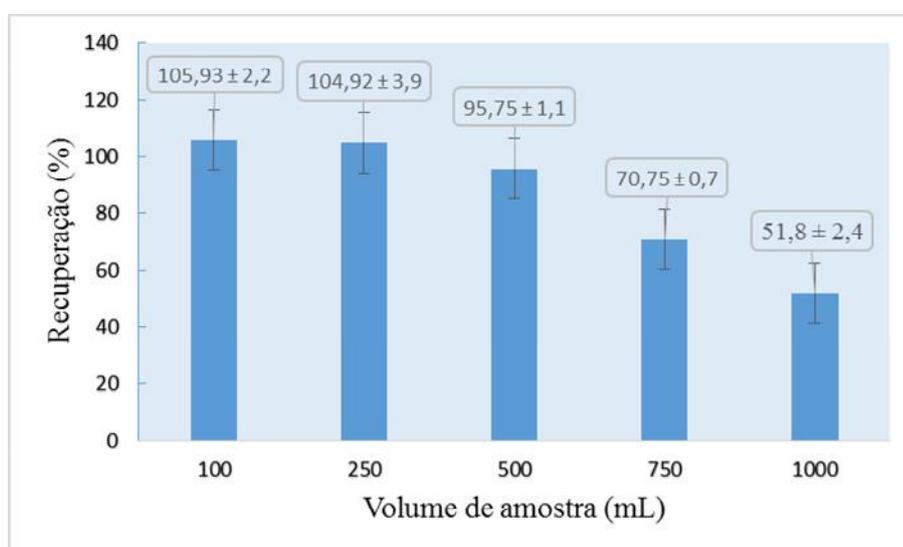


Figura 7: Taxas de recuperação do teste de volume de pré-concentração nos cartuchos.

### 5.3. Validação do Método

As curvas analíticas obtidas pela injeção de concentrações crescentes, tanto em solvente quanto na matriz, apresentaram coeficientes de correlação linear superiores a 0,99 ( $R = 0,999$  e  $R = 0,991$ , respectivamente). Isso indica que há forte correlação linear entre as concentrações do 2,4-D e as áreas obtidas nos cromatogramas. As curvas analíticas obtidas estão representadas na Figura 8. A faixa de trabalho foi definida a partir do LQ,  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  em amostra real.

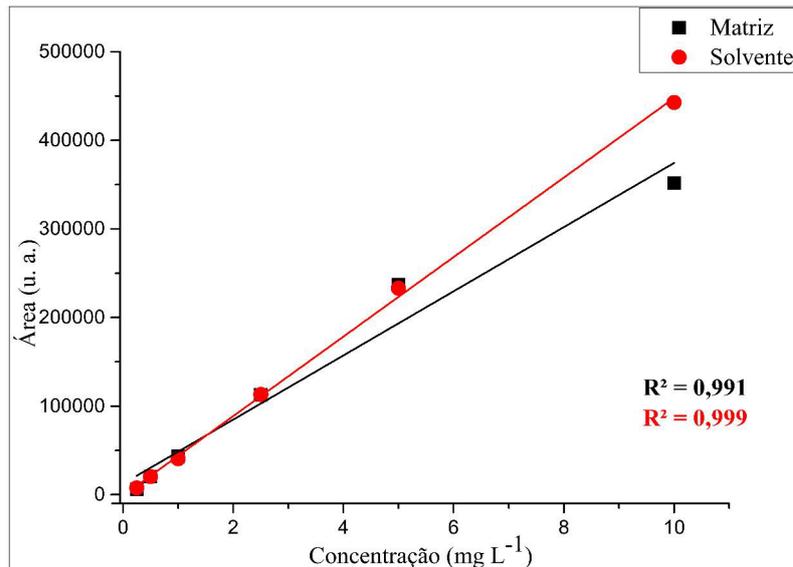


Figura 8: Curvas analíticas para 2,4-D em solvente e na matriz.

Os cromatogramas correspondentes às injeções dos extratos fortificados com concentrações conhecidas de 2,4-D comparados aos cromatogramas dos brancos da matriz mostram que o pico observado é exclusivamente do analito de interesse, não havendo assim, nenhum pico adicional proveniente de interferente da matriz interferindo na quantificação do analito de interesse (Figura 9), sendo, portanto, um método seletivo.

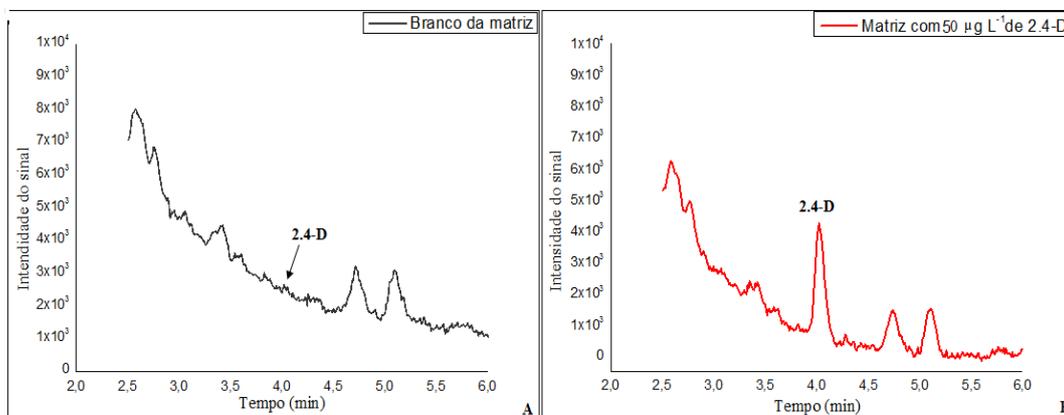


Figura 9: Cromatogramas obtidos para amostras do branco da matriz (A) e da matriz fortificada com 5 µg L<sup>-1</sup> (B).

Os Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) encontrados foram 2,5 µg L<sup>-1</sup> e 5 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Este método tem a capacidade de detectar uma quantidade de 2,4-D 12 vezes menor que a permitida para esta matriz, e quantificar cerca de 6 vezes menos que os valores estipulados pelas legislações. Existem na literatura alguns

trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos para 2,4-D em água superficial, utilizando EFS e CLAE-DAD, entre eles podem-se citar CALDAS, *et al.*, 2010, que encontrou um LOQ de  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , considerando fator de pré concentração de 250.

Os baixos valores dos coeficientes de variação (CV) (Tabela 5) mostram que há baixa dispersão das respostas, tanto do método quanto do instrumento. O método é, portanto, preciso, o que confere confiabilidade aos resultados. A precisão das medidas foi avaliada nos níveis de repetitividade e de precisão intermediária, sendo que em ambos os casos, os valores de coeficientes de variação estavam abaixo de 15% conforme recomendação dos guias de validação (KRUVE *et al.*, 2015b).

Tabela 5: Precisão do método analítico para o Ácido 2,4-Diclorofenáxiacético (2,4-D)

Concentração / ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Repetitividade	Precisão Intermediária
	Coef. Variação	Coef. Variação
2,5	3,72	2,31
25	1,04	0,47
100	1,49	0,84

A intensidade do efeito matriz foi determinada por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas em cinco níveis de concentrações crescentes em solvente e em matriz (Eq. 4). As equações das retas obtidas para o analito em solvente e na matriz, assim como a intensidade do efeito matriz, podem ser encontrados na Tabela 6. O efeito matriz foi considerado pouco importante, visto que está abaixo do limite permitido pelas normas, ou seja, 20%. Assim, pode-se dizer que o 2,4-D não foi afetado pelos componentes da matriz, podendo ser desprezado tal efeito.

Tabela 6: Dados sobre a intensidade do Efeito Matriz obtidos para a curva analítica.

2,4-D	Curva em solvente	Curva na matriz
Equação da reta	$y = 44874,13x - 1063,73$	$y = 36212,63x + 12321,35$
R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> = 0,999	R <sup>2</sup> = 0,991
Efeito matriz (%)	19,3	

A porcentagem de efeito matriz em cada nível de concentração utilizado na curva analítica foi determinada pela comparação entre as áreas dos picos obtidas pelas injeções do analito na matriz e em solvente (Eq. 5). Estes valores podem ser encontrados na Tabela 7. É importante salientar que para valores de 100%, não há efeito

matriz, enquanto que valores maiores que 100% indicam um aumento na resposta do analito devido a algum interferente da matriz que apresenta o mesmo tempo de retenção do 2,4-D e valores menores do que 100% indicam supressão de sinal.

Tabela 7: Efeito matriz em cada nível de concentração da curva analítica.

<b>Concentração (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Efeito matriz (%)</b>
<b>2,5</b>	80,03
<b>5</b>	100,97
<b>10</b>	106,60
<b>25</b>	99,43
<b>50</b>	101,74
<b>100</b>	79,41

O método de EFS mostrou-se eficiente na extração e concentração do analito de interesse, apresentando recuperações variando de  $79,41 \pm 0,2$  a  $106 \pm 6,5\%$ , valores estes que estão dentro da faixa aceitável pelas normas de validação de métodos analíticos. Os valores de recuperação para as concentrações próxima ao LD, ao ponto médio e à concentração máxima da curva analítica encontram-se na Tabela 8. O fator de concentração foi de 100, portanto, é possível detectar até  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$  de 2,4-D em amostras reais de águas superficiais.

Tabela 8: Valores de recuperação

<b>Concentração / (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação / %</b>
<b>2,5</b>	$80,02 \pm 3,7$
<b>5,0</b>	$100,97 \pm 2,2$
<b>10,0</b>	$106,60 \pm 6,5$
<b>25,0</b>	$99,43 \pm 1,0$
<b>50,0</b>	$101,70 \pm 0,8$
<b>100,0</b>	$79,41 \pm 1,5$

Na Figura 10 são apresentados os gráficos de efeito dos parâmetros investigados no teste de robustez de Youden em relação à área do pico (A) e ao tempo de retenção do herbicida ( $t_R$ ). O valor destacado no eixo horizontal em cada um dos gráficos (0,434 para tempo de retenção ( $t_R$ ) e 138319,95 para Área (A) é referente ao valor crítico de efeito, a partir do qual o parâmetro investigado indica efeito significativo na resposta do método.

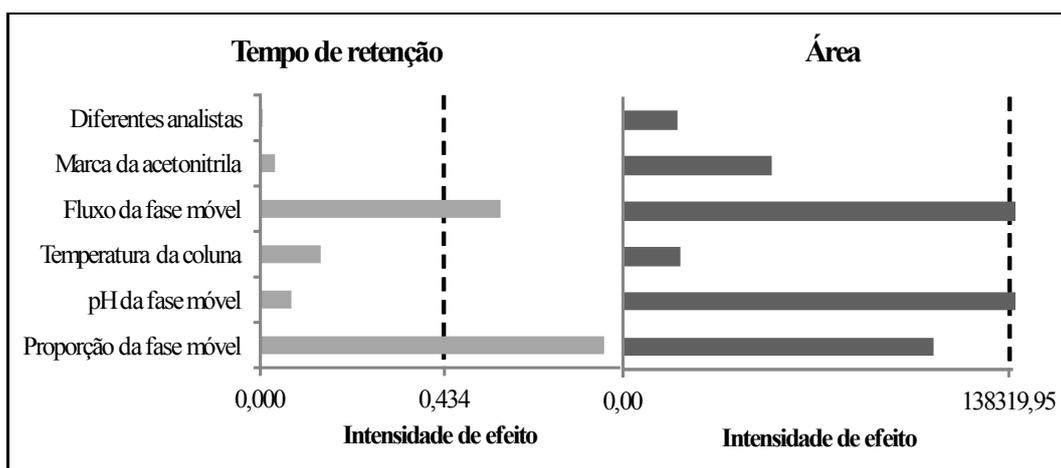


Figura 10: Diagramas de efeito do teste de robustez. O valor em destaque em cada um dos gráficos é referente à intensidade de efeito crítico.

Desta forma, observa-se na Figura 10 que o  $t_R$  do 2,4-D, analisado em água superficial natural pelo presente método, foi afetado pelo fluxo e, principalmente, pela proporção da fase móvel. Para a área do pico, observou-se variação significativa tanto no fluxo quanto no pH da fase móvel.

O teste de robustez de Youden demonstrou que o método foi robusto para: (1) operação por diferentes analistas; (2) marcas diferentes de acetonitrila; (3) variação de temperatura da coluna. Por outro lado, foi possível observar que a variação de  $0,1 \text{ mL min}^{-1}$  no fluxo da fase móvel; de 5% na quantidade do componente B (solução aquosa de ácido fórmico  $\text{pH } 2,18 \pm 0,1$ ) e de até 0,04 unidades de pH foram suficientes para alterar consideravelmente  $t_R$  e área do pico para 2,4-D. Portanto, torna-se evidente que essas variáveis devem ser rigorosamente controladas de modo a manter a validação dos parâmetros analíticos avaliados.

#### 5.4. Avaliação da toxicidade do 2,4-D e 2,4-DCF

Os testes ecotoxicológicos foram considerados válidos visto que no teste de controle apresentaram variação menor que 10% de anormalidades entre os organismos-teste. Para o composto referência estudado, SDS, foi elaborada uma carta de sensibilidade para se poder fazer projeções de variações aceitáveis de CL50 para a espécie em estudo. De acordo com os resultados obtidos foi possível identificar toxicidade aguda aos náuplios de *Artêmia salina* em 24 e 48 horas. O SDS apresentou CL50 média de  $18,17 \text{ mg L}^{-1}$  para 24 horas de exposição, com limite inferior e superior de 13,22 e  $22,86 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente e CL50 média de  $13,46 \text{ mg L}^{-1}$  para 48 horas

(Figura 11), com limite inferior e superior de 10,77 e 15,46 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Esses valores de CL50 para SDS estão condizentes com dados encontrados na literatura para este mesmo organismo-teste.

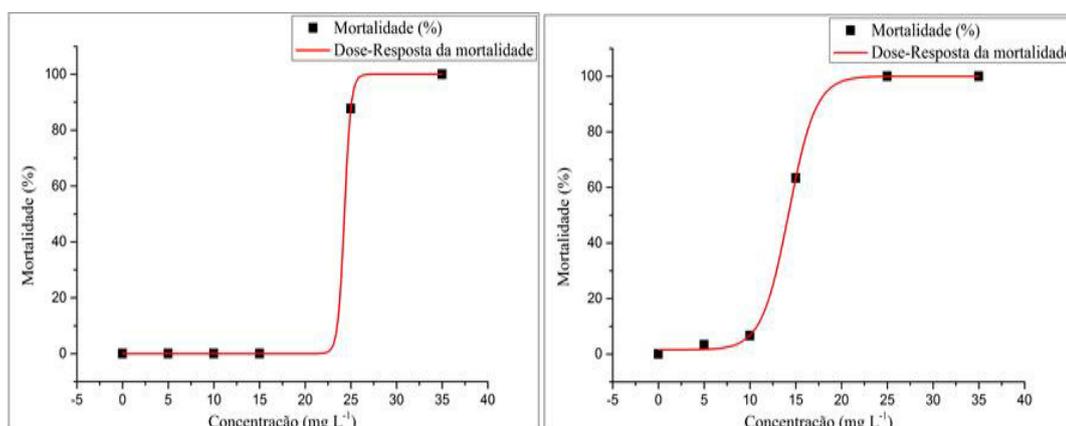


Figura 11: Curva dose-resposta para o controle de sensibilidade feito com exposição ao dodecil sulfato de sódio após 24 e 48 horas, respectivamente.

Nas concentrações de 2,4-D testadas não foi identificada toxicidade significativa aos microcrustáceos. Isso indica que o 2,4-D não apresentou efeito tóxico agudo sobre a *Artêmia salina* (Figura 12). Mas, apesar deste herbicida não causar efeito adverso ao organismo-teste, existem muitos trabalhos na literatura que relatam efeitos tóxicos a outros organismos, como por exemplo, VIGÁRIO, *et al.*, (2014) encontrou CL50-48 h de 34,64 µL de 2,4-D por litro de água para o peixe *Poecilia vivípara*; LI, *et al.* (2017) encontrou CL50-24 h de 46,71 mg L<sup>-1</sup> para embriões de zebrafish (*Danio rerio*); NAKAGOME, *et al.* (2007) encontrou CL50-48 h de 237,1 mg L<sup>-1</sup> para zebrafish adultos; FARAH, *et al.* (2003) encontrou CL50-96 h de 81, 122 e 107 mg L<sup>-1</sup> para os peixes *Heteropneutes fossilis*, *Clarias batrachus* e *Channa punctatus*, respectivamente; BENLI, *et al.* (2007) encontrou CL50-96 h de 32,6 mg L<sup>-1</sup> para lagostim (*Astacus leptodactylus*). SARIKAYA, *et al.* (2003) encontrou CL50-96 h de 63,24 mg L<sup>-1</sup> para carpa comum (*Cyprinus carpio L.*) e SARIKAYA, *et al.* (2005) encontrou CL50-48 h de 28,23 e 86,9 mg L<sup>-1</sup> para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus L.*) nos estádios larval e adultos respectivamente.

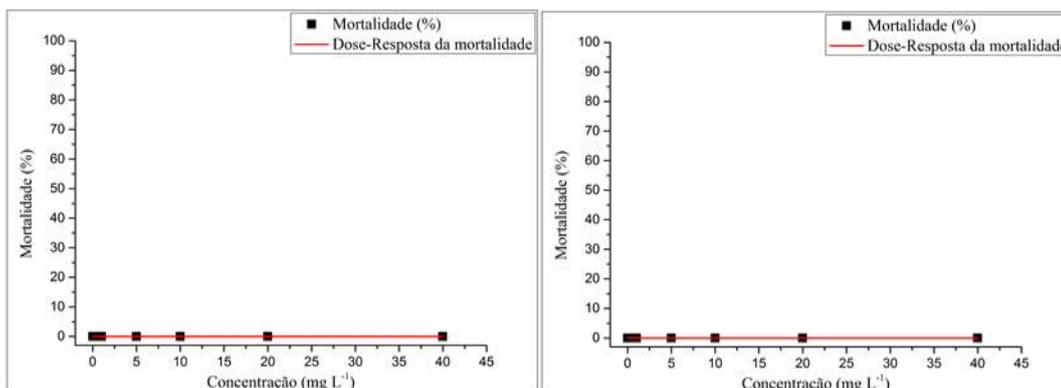


Figura 12: Curva dose-resposta para 2,4-D 24 e 48 horas, respectivamente.

No caso do 2,4-diclorofenol, a concentração média que causou mortalidade de 50% da população de organismos-teste foi de  $14,88 \text{ mg L}^{-1}$  para 24 h, com limite superior e inferior de  $10,25$  e  $18,99 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente e  $13,73 \text{ mg L}^{-1}$  48 horas de exposição (Figura 13) e limite superior e inferior de  $9,89$  e  $17,47 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Tais resultados mostraram que o 2,4-DCF é ainda mais tóxico que a substância de referência utilizada.

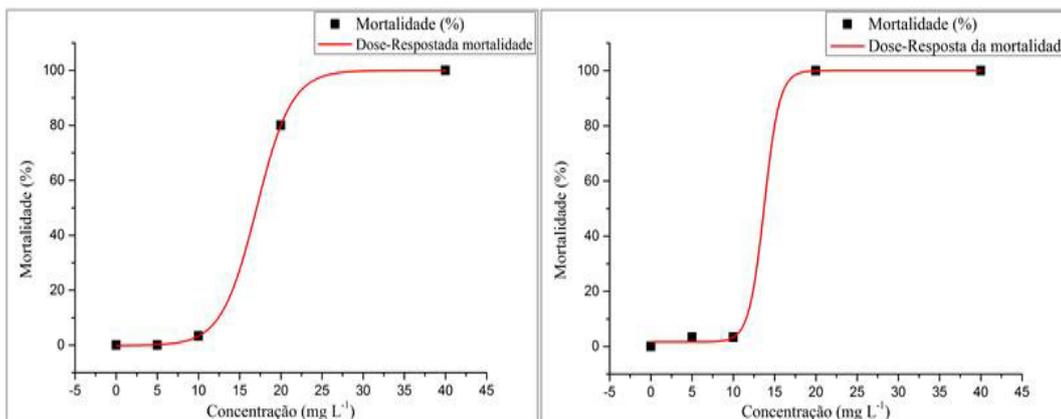


Figura 13: Curva dose-resposta para 2,4-DCF para 24 e 48 horas, respectivamente.

Portanto, através dos testes ecotoxicológicos realizados, pode-se dizer que o principal problema da utilização de 2,4-D como herbicida ocorre quando este se degrada naturalmente no ambiente à 2,4-DCF. O principal produto de degradação do herbicida é, então, altamente tóxico aos organismos marinhos, podendo levá-los à morte em poucos dias.

Os resultados da sensibilidade da artêmia salina ao SDS são satisfatórios, pois são semelhantes ao encontrado na literatura para a espécie. As cartas controle mostraram que os organismos utilizados nos ensaios apresentaram boas sensibilidades e,

portanto, são eficientes na identificação de toxicidade de qualquer substância que cause efeito adverso à biota aquática.

## 6. CONCLUSÃO

O método mostrou-se linear, seletivo, preciso e robusto para a determinação de 2,4-D em águas superficiais, apresentando limites de detecção e quantificação de  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. O tratamento da amostra em cartuchos SPE foi eficiente para extração e concentração de 2,4-D em água de rio, apresentando bons resultados de recuperação e repetitividade. Portanto, o método cromatográfico por CLAE-DAD é adequado para análise de 2,4-D em água natural superficial, visto que apresentou sensibilidade suficiente para detectar e quantificar um valor inferior ao limite permitido para tal herbicida pela legislação.

Em relação aos testes de toxicidade com *Artêmia salina*, o 2,4-D não apresentou toxicidade significativa ao organismo teste. Entretanto, para o 2,4-diclorofenol, observou-se considerável toxicidade.

## REFERÊNCIAS

ABREU, P. H. B.; ALONZO, H. G. A. O agricultor familiar e o uso (in)seguro de agrotóxicos no município de Lavras, Mg. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, 2016; 41:e18. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbso/v41/2317-6369-rbso-41-e18.pdf>. Acesso em 08/06/2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. [www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Consulta Pública nº 129, de 12 de fevereiro de 2016**.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil**. 2017. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/consulta-publica-sobre-avaliacao-toxicologi-1/219201?p\\_p\\_auth=n8Y3FdZ8&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp\\_p\\_auth%3Dn8Y3FdZ8%26p\\_p\\_id%3D101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU%26p\\_p\\_lifecycle%3D0%26p\\_p\\_state%3Dnormal%26p\\_p\\_mode%3Dview%26p\\_p\\_col\\_id%3Dcolumn-3%26p\\_p\\_col\\_count%3D3](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/consulta-publica-sobre-avaliacao-toxicologi-1/219201?p_p_auth=n8Y3FdZ8&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_auth%3Dn8Y3FdZ8%26p_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-3%26p_p_col_count%3D3). Acesso em 15/07/2017.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASEREGISTRY (USA). **Toxicological profile information sheet**. Department of Health and Human Services. 2007. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/Index.asp>. Acessado em 03/02/17.

AMARANTE JR, Ozelito Possidônio de; MELO, Francisca Ivanize; FRANCO, Teresa Cristina Rodrigues dos Santos; BRITO, Natilene Mesquita; RIBEIRO, Maria Lúcia. Avaliação do potencial de contaminação por herbicidas – ácido 2,4-diclorofenoxiacético. São Carlos: **RiMa**, 2014.

ARENZON, A.; PEREIRA NETO, T. J.; GERBER, W. **Manual sobre toxicidade em efluentes industriais**. Porto Alegre, SEP SENAI, de Artes Gráficas Henrique d'Ávila Bertaso, 2011. Disponível em: <http://www.ecotox.com.br/upload/legislacao/3514091-14012.pdf>. Acesso em 07/06/2017.

AYDIN, M. E.; AYDIN, S.; TONGUR, S.; KARA, G.; KOLB, M.; BAHADIR, M. Application of simple and low-cost toxicity tests for ecotoxicological assessment of industrial wastewaters. **Journal of Environmental Technology**, Vol. 36, 2015 – Issue 22.

BARRIONUEVO, W. R. E LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (spe) e micro extração em fase sólida (spme) de piretróides em água. **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 2, 172-175, 2001.

BENLI, A. Ç. K.; SARIKAIA, R.; SEPICI-DINCEL, A.; SELVI, M.; SAHIM, D.; HERKOÇ, F. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid

(2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, 2007, p. 296–299.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, Vol. 34, No. 9, 1604-1617, 2011.

CALDAS, S. S.; DEMOLINER, A.; COSTA, F. P.; D'OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Pesticide Residue Determination in Groundwater using Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 21, No. 4, 642-650, 2010

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol.** 2002; 2: 17. doi: 10.1186/1472-6750-2-17.

CASTRO, Fernando Delalibera de. **Degradação do Ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D) com ozônio eletrogerado.** 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

CÉZAR, I. C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 45, n. 2, abr./jun., 2009

CHAUHAN, A.; MITTU, B.; CHAUHAN, P. Analytical Method Development and Validation: A Concise Review. **J. Analytical & Bioanalytical Techniques** 2015, 6:1. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9872.1000233>.

COMPANHIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL DO MARANHÃO – CAEMA. **Projetos de governo para a produção de água e distribuição na ilha de São Luís.** 2015. Disponível em: [www.sengema.com.br/anexo\\_download.kmf?cod=1141](http://www.sengema.com.br/anexo_download.kmf?cod=1141). Acessado em 08/04/17.

DONALD, D.B., CESSNA, A.J., SVERKO, E., GLOZIER, N.E. Pesticides in surface drinking-water supplies of the Northern Great Plains. **Environ. Health Perspect**, 2007. 115, 1183e1191. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.9435>

FARAH, A. B.; ATEEQ, B.; ALI, M. N.; SABIR, R.; AHMAD, W. Studies on lethal concentrations and toxicity stress of some xenobiotics on aquatic organisms. **Chemosphere** v. 55, 2004, p. 257–265.

HARRAHY, E. A.; EDWARDS, D. S.; HEDMAN, C. J. Persistence of 2,4-D and its effects on benthic macroinvertebrates following spring treatment of Eurasian Watermilfoil, *Myriophyllum spicatum* L. in two lakes in southeastern Wisconsin, USA. **Bull Environ Contam Toxicol.** 2014 Apr;92(4):404-9. doi: 10.1007/s00128-014-1206-9.

HARRISON, M. **Pollution – Causes, Effects and control.** Ed. The Royal Society of Chemistry. 4<sup>th</sup> Ed. Cambridge, 2001.

HELLER, Leo; PÁDUA, Valter Lucio de. **Abastecimento de água para consumo humano**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2006. 859 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Agrícola Municipal 2015**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/00000027422109112016210223405721.pdf>. Acesso em 19/02/2017. Acesso em 19/02/2017

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Atlas de Saneamento 2011**. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://downloads.ibge.gov.br/>. Acesso em 28/02/17.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores de desenvolvimento sustentável**. Brasil, 2015. ISBN 978-85-240-4347-5. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94254.pdf>. Acessado em 08/04/17.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 04 – Jul/2011.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**. Vol.2, N°1, 13-25, 2010. ISSN 1984-4433.

LI, K.; WU, J.-Q.; JIANG, L.-L.; SHEN, L.-Z.; LI, J.-Y.; HE, Z.-H.; WEI, P.; LV, Z.; HE, M.-F. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere** V. 171, (2017), p. 40-48.

KRUVE, A. Tutorial Review On Validation Of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v.870, p.8-28, 2015b.

MARANHÃO. **Decreto Estadual nº 7.545 de 07 de março de 1980**. Diário Oficial Estadual, nº 56 de 21 de março de 1980

MARANHÃO, **LEI Nº 7.712 DE 14 DE DEZEMBRO DE 2001**. Diário Oficial Estadual, nº 242, de 24 de dezembro de 2001.

MASSEY, J. H.; SHAW, D. R.; TAGERT, M. L. M. Water quality survey of Mississippi's Upper Pearl River. Mississippi State, United States. **Science of the Total Environment** 481 (2014) 564–573

MEKONEN, S.; ARGAW, R.; SIMANESEW, A.; HOUBRAKEN, M.; SENA EVE, D.; AMBELU, A.; SPANOGHE, P. Pesticide residues in drinking water and associated risk to consumers in Ethiopia. **Chemosphere**. 2016 Nov;162:252-60. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.096.

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 - Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília, 2016

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relatório: Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos no Estado do Maranhão.** 07/2015. Disponível em: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/08/Relat--rio-Maranh--o.pdf>. Acesso em 17/02/2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano** – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. ISBN 85-334-1240-1.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico - Monitoramento de Agrotóxicos na Água para Consumo Humano no Brasil**, 2013. Volume 46, Nº 4 – 2015. ISSN 2358-9450.

MORGAN, M. K. Predictors of urinary levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, 3-phenoxybenzoic acid, and pentachlorophenol in 121 adults in Ohio. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. Volume 218, Issue 5, July 2015, Pages 479–488. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.03.015>.

NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA JR., C. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *danio rerio*. Pesticidas: R. **Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 17, p. 117-122, 2007.

PEREIRA, E. D.; CAVALCANTI JR., F. A.; COSTA, H. O. S. CASTRO, M. D. F. Reservatório batatã: importância hídrica e conflitos de uso e ocupação no município de São Luís, Maranhão / Brasil. **Revista Geográfica de América Central**, Número Especial EGAL, 2011- Costa Rica.

PEREIRA, E. D. **Avaliação da vulnerabilidade natural a contaminação do solo e do Aquífero do Reservatório Batatã, São Luís - MA**. Tese (doutorado) – Instituto de Geociências e Ciências exatas. Unesp; Rio Claro, 2006

PIMENTEL, M. F.; SILVA JÚNIOR F. C. G; SANTAELLA, S. T.; LOTUFO, I. v. C. O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 6, n. 1, 2011, 15-22. doi: 10.5132/jbse.2011.01.003.

PINHEIRO, A.; RIVAIL, M.; SILVA, R. K. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. **Revista de Gestão de Água da América Latina** - ISSN 2359-1919, VOLUME. 7 - Nº. 2 - JUL/DEZ – 2010.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; STAPPEN, G. V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution** 144 (2006) 453 e 462.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H. E JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 1, 68-76, 2001.

REBELO, R. M; CALDAS, E. D. **Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos**. Quím. Nova, vol.37, São Paulo, 2014.

Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422014000700016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000700016). Acesso em 02/06/2017.

REDE DE LABORATÓRIOS NACIONAIS AGROPECUÁRIOS – LANAGRO. **Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial**. Nov/2014.

RESENDE, J. D. **Degradação de 2,4-diclorofenol em solução aquosa por meio de processo fotoquímico solar**. São Paulo, 2011. Dissertação de mestrado.

SARIKAYA, R.; YILMAZ, M. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). **Chemosphere** V. 52, 2003. P. 195–201.

SARIKAYA, JR.; SELVI, M. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on larvae and adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Environmental Toxicology and Pharmacology** V. 20, 2005, p. 264–268.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E PESCA - SAGRIMA. **Balçoço 2016**. Disponível em: <http://www.sagrma.ma.gov.br/files/2017/01/balan%C3%A7o-2016-web.pdf>. Acesso em 19/02/2017.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E PESCA - SAGRIM. **Perfil da Agricultura Maranhense**. Dezembro, 2016. Disponível em: <http://www.sagrma.ma.gov.br/files/2017/01/boletim-final-18-01.pdf>. Acesso em 17/02/2017.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE VIGILÂNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO – SISAGUA. **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2014 Disponível em: <http://www.saude.gov.br/sisagua>. Acesso em 17/05/2017.

VIGÁRIO, A. F.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivípara*. **Pesq. Vet. Bras.** V. 34(6), P. 523-528, junho 2014.

VINATEA, J. E. Artemia – Um ser vivo excepcional. Ed. Panorama da Aquicultura Ltda, Rio de Janeiro, revista Panorama da Aquicultura, vol.4, nº 25, p. 8,9. 1994.

XIONG, W.; TAO, X.; PANG, S.; YANG, X.; TANG, G.; BIAN, Z. Separation and quantitation of three acidic herbicide residues in tobacco and soil by dispersive solid-phase extraction and UPLC-MS/MS. **J Chromatogr. Sci.** 2014 Nov-Dec;52(10):1326-31. doi: 10.1093/chromsci/bmt172.

WANG, J.; TAO, J.; YANG, C.; CHU, M.; LAM, H.; **Food Control**. 2017, 80, 143-150.

WIJNJA, H.; DOHERTY, J. J.; SAFIE, S. A. Changes in Pesticide Occurrence in Suburban Surface Waters in Massachusetts, USA, 1999–2010. **Bull Environ Contam. Toxicol.** (2014) 93:228–232. DOI 10.1007/s00128-014-1251-4