

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS

RENATA PRUSSAK GABARDO

**ESTUDO PARA DETERMINAÇÃO DE HERBICIDA 2,4-D EM ÁGUA
ATRAVÉS DE CLAE-DAD**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2015

RENATA PRUSSAK GABARDO

**ESTUDO PARA DETERMINAÇÃO DE HERBICIDA 2,4-D EM ÁGUA
ATRAVÉS DE CLAE-DAD**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais do Departamento Acadêmico de Química e Biologia–DAQBi - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná–UTFPR– como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientador: Prof^oMsc. Alessandro Feitosa Machado

Co-orientadora: Prof^a Dra. Larissa Kummer

Curitiba

2015

RENATA PRUSSAK GABARDO

**ESTUDO PARA DETERMINAÇÃO DE HERBICIDA 2,4-D EM ÁGUA
ATRAVÉS DE CLAE-DAD**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Prof^o. Dr. Marcus Vinicius de Liz

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Membro 2 – Prof^a. Dr^a. Valma Martins Barbosa

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Orientador – Prof^oMsc. Alessandro Feitosa Machado

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Co-Orientador- Prof^a Dra. Larissa Kummer

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenador de Curso - Prof^oMsc. Alessandro Feitosa Machado

Curitiba, 24 de novembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo ensino público de qualidade, além de proporcionar a utilização de suas dependências e recursos para a realização deste trabalho.

Aos professores Alessandro Feitosa e Larissa Kummer por terem aceitado me orientar.

Aos professores Marcus Liz e Valma Barbosa por aceitarem fazer parte da banca de avaliação e pelas contribuições feitas a este trabalho.

Aos meus pais e irmãos que procuraram sempre colaborar e me incentivar durante a realização deste trabalho.

Ao Vitor que muitas vezes me acalmou e me deu forças para continuar até o fim, mesmo a milhares de quilômetros de distância.

À Rubia, obrigada por me ouvir nos momentos em que o desespero chegava, obrigada pelos ensinamentos transmitidos, obrigada pelos incentivos desde o início deste projeto e tantas outras coisas que fez para me ajudar a chegar até aqui. Serei eternamente grata a você.

À Thayse e Rubia, obrigada por terem feito meus dias mais alegres com as histórias da vida, obrigada pelos momentos de angústias e sextas de gordices compartilhados. Sou muito grata por tê-las conhecido e compartilhado com vocês tantas coisas em todos esses anos de UTFPR.

“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo. Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, porque somos curiosos... E a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos.

Siga em frente.”

(Walt Disney)

RESUMO

GABARDO. R. P. ESTUDO PARA DETERMINAÇÃO DE HERBICIDA 2,4-D EM ÁGUA ATRAVÉS DE CLAE-DAD. 2015.57f. Trabalho de Conclusão de Curso – Tecnologia em Processos Ambientais. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

Um dos setores de maior importância para a economia brasileira é a agricultura e, com isso, o país torna-se um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas do mundo. Em geral, estes são aplicados no controle de pragas com objetivo de aumentar a produtividade. No entanto, se aplicados de forma indiscriminada podem acarretar sérios danos à saúde da população de entorno além de impactar diversas matrizes ambientais. Com isso, diversos estudos vêm sendo realizados buscando identificar os herbicidas e avaliar o comportamento destes nas diferentes matrizes ambientais. Muitos desses compostos são encontrados em baixas concentrações, desta forma, é necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas que apresentem elevada sensibilidade para detectá-los. Para tal, a cromatografia é uma das principais técnicas analíticas utilizadas para essa finalidade, a detecção de micropoluentes. Portanto, este trabalho teve por objetivo a determinação e implementação de uma metodologia para análise do padrão do herbicida 2,4-D utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Para isso, foram avaliados dois solventes orgânicos (metanol e acetonitrila), comumente utilizados em cromatografia líquida para posterior realização de testes e por fim definição das condições cromatográficas ótimas para a detecção do herbicida. Verificou-se que para o herbicida em questão a melhor condição encontrada foi: eluição de metanol: água acidificada (70:30), volume de injeção de 50µL, vazão de 1 mL min⁻¹, utilizando a coluna C18 (ZORBAX Eclipse Plus – 4,6 x 250 mm, 5 µm), sendo analisados nos comprimentos de onda de 200, 230 e 280nm . Através da análise das figuras de mérito, o método se mostrou preciso e linear, com limite de detecção de 0,212 mg L⁻¹. Pode-se dizer que o herbicida é estável em solvente orgânico e em água acidificada quando armazenados sob temperaturas de 4°C.

Palavras-chaves: Pesticidas. 2,4-D. CLAE-DAD. Contaminação Ambiental.

ABSTRACT

GABARDO.R. P. STUDY FOR DETERMINATION OF 2,4-D HERBICIDE IN WATER BY HPLC-DAD. 2015. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso – Tecnologia em Processos Ambientais. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

One of the most important sectors in the Brazilian economy is agriculture and, therefore, the country becomes one of the largest consumers of pesticides in the world. In general, these are applied in pest control in order to increase productivity. However, if applied indiscriminately may cause serious damage to health of neighboring population beyond impacting various environmental matrices. Thus, several studies have been conducted to identify herbicides and evaluate their behavior in different environmental matrices. Many of these compounds are found in low concentrations, thus, the development of analytical techniques with high sensitivity is required to detect them. To this end, the chromatography is one of the main analytical techniques used for this purpose, detection of micropollutants. Therefore, this study aim to at determining and implementing a methodology for 2,4-D herbicide pattern analysis using liquid chromatography of high efficiency with diode array detector (HPLC-DAD). To this, they were evaluated two organic solvents (acetonitrile and methanol), commonly used in liquid chromatography for further testing and finally setting the optimum chromatographic conditions for detection of the herbicide. It was found that for the herbicide in question was the best condition found: methanol Elution: acidified water (70:30), 50mL injection volume, flow 1 mL min⁻¹, using the C18 column (ZORBAX Eclipse Plus - 4.6 x 250 mm, 5 um) and analyzed at a wavelength of 200, 230 and 280nm. By analyzing the figures of merit, the method was precise and linear, with a detection limit of 0.212 mg L⁻¹. It can be said that the herbicide is stable in acidified organic solvent and water when stored at 4 ° C temperatures.

Keywords: Pesticides. 2,4-D. HPLC-DAD. Environmental contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes processos que ocorrem no transporte dos pesticidas	21
Figura 2: Concentrações médias dos pesticidas no perfil do solo	24
Figura 3: Fórmula estrutural do 2,4-D	25
Figura 4: 2,4-D e seu principal produto de degradação	25
Figura 5: Os 10 ingredientes ativos mais vendidos em 2013	26
Figura 6: Espectro de absorção UV-VIS das soluções de 2,4-D (20 mg L ⁻¹) preparadas com os solventes orgânicos acetonitrila e metanol grau cromatográfico.....	32
Figura 7: Curva analítica de 1 à 100 mg L ⁻¹ de 2,4-D em metanol grau cromatográfico no espectrofotômetro UV-VIS	33
Figura 8: Eluição MeOH: Água acidificada 60:40, vazão de 0,8 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL com solução padrão de 2,4-D de 5 mg L ⁻¹ diluída em 100% MeOH.....	34
Figura 9: Eluição ACN: Água acidificada 40:60, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L ⁻¹ diluída em 100% MeOH.....	35
Figura 10: Eluição ACN: Água acidificada 50:50, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L ⁻¹ diluída em 100% MeOH.....	36
Figura 11: Eluição ACN: Água acidificada 60:40, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L ⁻¹ diluída em 100% MeOH.....	36
Figura 12: Eluição MeOH: Água acidificada 50:50, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L ⁻¹ diluída em 100% MeOH.....	37
Figura 13: Eluição MeOH: Água acidificada 60:40, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L ⁻¹ diluída em 100% MeOH.....	37
Figura 14: Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L ⁻¹ diluída em 100% MeOH.....	38
Figura 15: Sobreposição dos cromatogramas das amostra de 2,4-D preparadas em diferentes diluições, sendo 100% MeOH e 50% Metanol:50% água	

acidificada. Nas condições cromatográficas: Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL	39
Figura 16: Sobreposição dos cromatogramas comparando as colunas. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L ⁻¹ diluída em 50% MeOH	40
Figura 17: Sobreposição dos cromatogramas comparando as vazões. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, volume de injeção de 20 µL com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L ⁻¹ diluída em 50% MeOH	41
Figura 18: Sobreposição dos cromatogramas comparando os diferentes volumes injetados (5, 10, 20, 30, 40 e 50 µL). Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1 mL min ⁻¹ com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L ⁻¹ diluída em 50% MeOH.....	42
Figura 19: Correlação entre a área obtida e o volume injetado. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1 mL min ⁻¹ com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L ⁻¹ diluída em 50% MeOH.	42
Figura 20: Correlação entre a área obtida e o volume injetado. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1 mL min ⁻¹ com solução padrão de 2,4-D de 4 mg L ⁻¹ diluída em 50% MeOH(A); Correlação entre a área obtida e o volume injetado. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão 1 mL min ⁻¹ com solução padrão de 2,4-D de 5 mg L ⁻¹ diluída em 50% MeOH(B).....	43
Figura 21: Cromatograma 3D da melhor condição encontrada. Eluição MeOH: Água acidificada de 70:30, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 50µL com solução padrão de 2,4-D de 5 mg L ⁻¹	44
Figura 22: Curva analítica para o comprimento de onda de 230 nm, 0,84 à 1,4 mg L ⁻¹ (A) e 2,1 à 7 mg L ⁻¹ (B). Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.....	46
Figura 23: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de 1,26 mg L ⁻¹ em solvente orgânico (MeOH). Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.....	48
Figura 24: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de 3,5 mg L ⁻¹ em solvente orgânico (MeOH) . Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.....	48
Figura 25: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de 7,0 mg L ⁻¹ em solvente orgânico (MeOH) . Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.....	49
Figura 26: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de 1,26 mg L ⁻¹ em água acidificada. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 µL	50

Figura 27: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de 3,5 mg L⁻¹ em água acidificada. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL51

Figura 28: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de 7,0 mg L⁻¹ em água acidificada. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:Faturamento do Mercado de Agroquímicos nos últimos anos, em dólares, no Brasil.....	19
Tabela 2: Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	20
Tabela 3: Propriedades físico-químicas do herbicida 2,4-D que permitem avaliar o potencial de risco para ambientes aquáticos.....	22
Tabela 4: Número de amostras positivas obtidas para dois rios do Rio Grande do Sul, coletadas nos anos 2001-2003	22
Tabela 5: Frequência da detecção de pesticidas (%), para 33 amostras de solo	23
Tabela 6: Dados referentes à detecção de herbicidas por métodos cromatográficos, compilados a partir da literatura.....	27
Tabela 7: Diferença entre as características das colunas utilizadas	39
Tabela 8: Características da corrida avaliada em diferentes vazões	41
Tabela 9: Resultados das condições cromatográficas otimizadas	44
Tabela 10: Valores dos limites de detecção e quantificação estimados a partir da equação de regressão para 2,4-D.....	46
Tabela 11: Valores do coeficiente de variação e exatidão calculados para o método de quantificação de 2,4-D.....	47
Tabela 12: Porcentagem de variação da área cromatográfica do herbicida 2,4-D durante os testes de estabilidade em solvente orgânico.....	49
Tabela 13: Porcentagem de variação da área cromatográfica do herbicida 2,4-D durante os testes de estabilidade em solvente orgânico.....	51

LISTA DE SIGLAS

2,4-D	Ácido 2,4- diclorofenóxiacético
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DL50	Dose Letal para 50% da população
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FISPQ	Ficha de Segurança de Produto Químico
GUS	<i>Groundwater Ubiquity Score</i>
Ibama	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	Ministério da Saúde
Sindiveg	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal
UCT	University of Cape Town

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
nm	Nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	partes por milhão
u.a	unidade de área
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVOS GERAIS	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1	OS AGROTÓXICOS	18
3.1.1	Agrotóxicos no Meio Ambiente	20
3.2	AGROTÓXICOS ÁCIDO ARILOXIALCANÓICO	24
3.2.1	Ácido 2,4- diclorofenóxiacético (2,4-D).....	24
3.3	CROMATOGRAFIA	26
3.3.1	Validação de método.....	28
4	METODOLOGIA	30
4.1	REAGENTES E INSUMOS	30
4.2	ENSAIOS PRELIMINARES	30
4.3	IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO 2,4-D.....	30
4.4	FIGURAS DE MÉRITO.....	31
4.5	TESTE DE ESTABILIDADE DO COMPOSTO	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1	ENSAIOS PRELIMINARES	32
5.1.1.	Solvente	32
5.2	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	34
5.2.1	Otimização das condições cromatográficas (CLAE-DAD).....	34
5.2.2	Análise das figuras de mérito para o método	45
6	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é um dos setores de maior importância para a economia brasileira e juntamente com ela, o uso de defensivos agrícolas vem crescendo nos últimos anos (PINHEIRO *et al.*, 2009; MAPA, 2013).

Os defensivos agrícolas são utilizados no controle de diferentes tipos de pragas, objetivando o aumento da produtividade da lavoura, porém, quando aplicado em excesso passam por processos físicos, químicos e biológicos de transformação, que podem levar à dispersão destes agroquímicos nas diversas matrizes ambientais, como ar, solo, água e alimentos (PINHEIRO *et al.*, 2009). Com isso faz-se necessário avaliar o comportamento dos pesticidas nas diferentes matrizes ambientais.

Diversos estudos já detectaram agroquímicos de uso comum em águas superficiais e subterrâneas, como Primel *et al.* (2005) que avaliaram a poluição das águas (superficiais e subterrâneas) por herbicidas utilizados no cultivo de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. Em solos também há inúmeras pesquisas, como a de Pinheiro *et al.* (2009) que avaliaram a movimentação dos pesticidas no decorrer do perfil do solo.

Dentre estes herbicidas temos o herbicidas 2,4-D que é amplamente utilizado nas culturas de arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, cevada, milho, pastagens, soja e trigo. Diversos estudos envolvendo a sua determinação na matriz solo vem sendo realizados tornando possível encontrar na literatura diferentes metodologias, como a de Amadori *et al.* (2013) e a de Kashyap *et al.* (2005) os quais avaliaram diferentes metodologias de extração do herbicida utilizando técnicas cromatográficas para a quantificação do extrato recuperado.

Muitos desses agroquímicos podem ser encontrados em baixas concentrações, sendo necessário o desenvolvimento e a utilização de métodos analíticos que apresentem elevada sensibilidade e confiabilidade para que sejam aplicados nessas diferentes matrizes (PEIXOTO, 2007). Uma das técnicas que apresenta essas características é a cromatografia.

A cromatografia é uma técnica analítica reconhecida para a separação de misturas, na qual é possível realizar análises qualitativas e quantitativas das substâncias separadamente (PEIXOTO, 2007).

Em função dos argumentos acima, este trabalho visa a implementação de uma metodologia para quantificação do herbicida 2,4-D em água ultrapura através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Determinar e implementar uma metodologia de análise do padrão do herbicida 2,4-Datravés de cromatografia líquida de alta eficiência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as seguintes figuras de mérito da metodologia implementada: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, além da precisão e exatidão do método.
- Avaliar estabilidade do composto em solvente orgânico e em água ultrapura.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 OS AGROTÓXICOS

De acordo com a Lei Federal 7.802, de 11 de Julho de 1989:

“Agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.”

Também consideram-se agrotóxicos aquelas substâncias as quais são empregadas como desfolhantes, dessecantes e inibidores de crescimento (BRASIL,1989). Existe uma grande variedade de agrotóxicos devido aos diferentes modos de ação, como herbicidas (plantas), inseticidas (insetos), fungicidas (fungos), nematicidas (microrganismos do solo), moluscidas (moluscos), entre outros (IBAMA,2010).

Os agrotóxicos são utilizados no controle de pragas com o intuito de aumentar a produtividade da lavoura e o seu uso pode vir a causar impactos ambientais negativos, como a degradação do solo e dos recursos hídricos próximos à região (PINHEIRO *et al.*, 2009). Possuem uma ampla cobertura legal, sendo a mais importante a Lei 7.802/89 (BRASIL, 1989) a qual dispõe sobre o processo de registro dos agrotóxicos.

No desenvolvimento econômico pelo qual o Brasil vem passando, o uso de agrotóxicos tem sido relevante, já que o país é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (PRIMEL *et al.*,2005).

De acordo com o informativo de economia agrícola publicado em setembro de 2013, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA,2013), no ano de 2012 as vendas de defensivos agrícolas, termo também usualmente utilizado para referir-se aos agrotóxicos, foram 12,7% superiores ao ano anterior, atingindo

823.226 toneladas de agrotóxicos comercializados no país. Isso gera um capital equivalente a US\$ 9,71 bilhões, sendo o maior crescimento para os inseticidas com 27,4% e os herbicidas com 16,9%.

Com base nos dados da publicação “Estatísticas e Dados Básicos de Economia Agrícola” publicado em agosto de 2015, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA,2015), a Tabela 1 apresenta os valores referentes à venda de defensivos agrícolas no mercado interno nos últimos anos.

Tabela 1:Faturamento do Mercado de Agroquímicos nos últimos anos, em dólares, no Brasil.

SEGMENTOS	2010	2011	2012	2013	2014
	US\$				
HERBICIDAS	2.427.878	2.743.000	3.135.218	3.739.410	3.902.588
FUNGICIDAS	2.128.377	2.315.188	2.468.991	2.591.998	2.907.072
INSETICIDAS	2.364.868	2.944.726	3.606.782	4.553.891	4.892.501
ACARICIDAS	91.285	110.180	101.009	118.748	116.989
OUTROS	291.510	374.850	398.014	450.237	429.396
TOTAL	7.303.918	8.487.944	9.710.014	11.454.284	12.248.546

Fonte : MAPA (2015) (SINDIVEG)

Ainda de acordo com dados do MAPA, em 2014 o Brasil produziu 3.473,151 toneladas do ingrediente ativo 2,4-D.

Para que seja permitida a produção, exportação/importação, comercialização e utilização dos agrotóxicos, faz-se necessário haver um registro destes no órgão federal competente seguindo as exigências dos setores responsáveis pela saúde, meio ambiente e agricultura. Sendo assim, o Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002, o qual regulamenta a Lei 7.802/89, estabelece aos Ministérios da Saúde (MS), do Meio Ambiente (MMA) e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), dentro das suas áreas de competência, controlar, fiscalizar e inspecionar os agrotóxicos consumidos no Brasil.

Desta forma, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), vinculada ao Ministério da Saúde tem a responsabilidade de realizar a avaliação e classificação toxicológica dos agrotóxicos, além de monitorar os resíduos desses produtos em alimentos.

A Anvisa pré estabelece cores as quais devem ser utilizadas no rótulo dos agroquímicos de acordo com o grau de toxicidade destes, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação toxicológica dos agrotóxicos

Classe	Classificação	Cor
Classe I	Extremamente Tóxico	Vermelha
Classe II	Altamente Tóxico	Amarela
Classe III	Medianamente Tóxico	Azul
Classe IV	Pouco Tóxico	Verde

Fonte: ANVISA(2011)

Cabe ao MAPA e ao MMA o registro dos produtos de acordo com as exigências das três esferas federais. Ao MAPA também é incumbida a responsabilidade de avaliar a eficiência desses insumos na agricultura. Já o Ibama, vinculado ao Ministério do Meio Ambiente, encarrega-se de realizar avaliações de impacto ambiental desses insumos no ambiente.

3.1.1 Agrotóxicos no Meio Ambiente

A presença de agrotóxicos no meio ambiente é caracterizada como um problema complexo, heterogêneo e difuso, pois as principais fontes são efluentes industriais, além da agropecuária (CASTRO, 2010).

Com o crescente uso dos agrotóxicos, faz-se necessário avaliar o seu comportamento nas diferentes matrizes ambientais, isto é, após a aplicação do produto na agricultura. Após a sua aplicação nas lavouras, os agrotóxicos podem ter seu destino final influenciado através de três formas de transporte existentes, sendo elas: volatilização, lixiviação e escoamento superficial (FARIA, 2004). Ou seja, não está em contato exclusivamente com as plantas, mas também com o solo e as águas passando por diferentes processos (Figura 1).

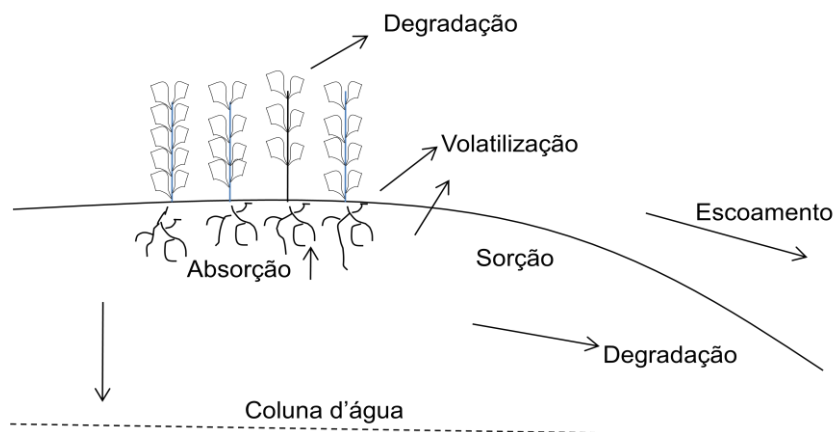


Figura 1: Diferentes processos que ocorrem no transporte dos pesticidas
Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2007)

O solo atua como reservatório final de herbicidas e, por consequência, é a fonte de liberação desses resíduos para a atmosfera, lençol freático e organismos vivos (CASTRO,2010). Como pode ser observado na Figura 1, a maioria dos processos de atenuação e eliminação dos contaminantes ocorre na zona biologicamente ativa do solo, ou seja, em regiões com maior concentração de matéria orgânica e argila, além da população bacteriana existente na área (RIBEIRO *et al.*, 2007;FOSTER *et al.*, 1991). Isto é, na área mais superficial do solo onde acontecem processos de absorção, volatilização, sorção e degradação. Caso o contaminante ultrapasse esta zona poderá vir a atingir o nível do lençol freático e como consequência contaminá-lo.

A volatilização refere-se à transferência do pesticida para a atmosfera. Quando relacionada à contaminação dos recursos hídricos a volatilização possibilita o carreamento desses pesticidas através da atmosfera, os quais serão depositados nas águas superficiais através da chuva (FARIA, 2004).

Já a lixiviação é a responsável pelo transporte desses pesticidas através do perfil do solo juntamente com a água da chuva, sendo apontada como a principal forma de contaminação das águas subterrâneas. No entanto, é necessário levar em consideração algumas características dos solos, como o teor de matéria orgânica, pois isso influencia no processo de lixiviação, uma vez que alguns compostos apresentam maior ou menor afinidade com a matéria orgânica ali presente (FARIA, 2004).

De acordo com Langenbach *et al.* (2001), quanto maior o teor de matéria orgânica no solo, o processo de adsorção tende a ter um aumento e, desta forma,

torna indisponível o contaminante para o processo de biodegradação, aumentando o tempo de permanência no ambiente.

Por fim, o escoamento superficial é responsável pelo transporte dos pesticidas através da água de escoamento na superfície do solo, a qual poderá ter como destino final rios e lagos.

Primel *et al.*(2005) avaliaram a poluição das águas (superficiais e subterrâneas) por herbicidas utilizados no cultivo de arroz irrigado no Rio Grande do Sul, onde o 2,4-D se encontrava entre os herbicidas avaliados. Como forma de avaliar o potencial risco de contaminação das águas subterrâneas por herbicidas, foram utilizados os métodos de “screening” da EPA e o índice GUS. O critério da EPA analisava a solubilidade em água do composto (K_{oc}), o coeficiente de adsorção à matéria orgânica, constante da Lei de Henry (K_H), pH, tempo de meia vida na água ($t_{1/2}$), dentre outros. As propriedades físico químicas encontradas para o 2,4-D são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Propriedades físico-químicas do herbicida 2,4-D que permitem avaliar o potencial de risco para ambientes aquáticos

Herbicida	Solubilidade em água (mg. L ⁻¹)	K_{oc} (cm ³ .g ⁻¹)	Log K_{ow}	PV (mPa)(20°C)	pKa	K_H (Pa.m ³ .mol ⁻¹)	$t_{1/2}$ solo (d)	$t_{1/2}$ água (d)
2,4-D	311 (25°C)	60	2,6-2,8	1,86.10 ⁻²	2,73	1,32. 10 ⁻⁵	<7	7,5

Fonte: adaptada de Primel et al. (2005) K_{oc} : Solubilidade do composto em água; Log K_{ow} : coeficiente de partição; PV: Pressão de Vapor; K_H : Coeficiente de adsorção à matéria orgânica

Como resultado para amostras reais, coletadas de dois rios da região de estudo, Primel et al, (2005) detectaram as seguintes concentrações para o herbicida 2,4-D nas água superficiais da região (Tabela 4).

Tabela 4: Número de amostras positivas obtidas para dois rios do Rio Grande do Sul, coletadas nos anos 2001-2003

Herbicida	Rio	0,1-0,5 µg L ⁻¹	0,5-2,0 µg L ⁻¹	>2,0 µg L ⁻¹	% Amostras positivas
2,4-D	Vacacaí-Mirim e afluentes	0	9	1	12,5
	Vacacaí e afluentes	0	2	4	10

Fonte: adaptada de Primelet al. (2005)

Os autores deste mesmo estudo concluíram que para as águas superficiais o 2,4-D indicava um baixo potencial de contaminação, enquanto que para águas subterrâneas recomendaram estudos complementares, pois o composto apresentava características de ser um potencial poluidor na região. Dos itens avaliados apenas os tempos de meia vida (na água e no solo) não atenderam os padrões analisados.

Já Pinheiro *et al.* (2009) avaliaram o movimento dos pesticidas no perfil do solo sob diferentes tipos de culturas em uma região do estado de Santa Catarina. A amostragem de solo foi realizada em três profundidades (0-20 cm, 40-60 cm e 80-100 cm) e a quantificação dos pesticidas foi realizada por CLAE- UV-Vis. Foram coletadas 33 amostras no total, e destas 21% apresentaram concentrações de 2,4-D na camada mais rasa avaliada (0-20 cm), como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5: Frequência da detecção de pesticidas (%), para 33 amostras de solo

Pesticidas	Profundidade (cm)		
	0-20	40-60	80-100
2,4-D	21	12	18
Alacloro	15	18	9
Atrazina	33	42	55
Diuron	52	64	45
Azoxistrobina	36	48	33
Metalaxyl	52	42	42
Metconazol	61	45	42
Tebuconazol	82	64	48
Lambda-cialotrina	48	58	58

Fonte: Pinheiro et al. (2009)

Em relação a concentração média encontrada, a Figura 2, mostra que suas concentrações são maiores na camada superficial do solo.

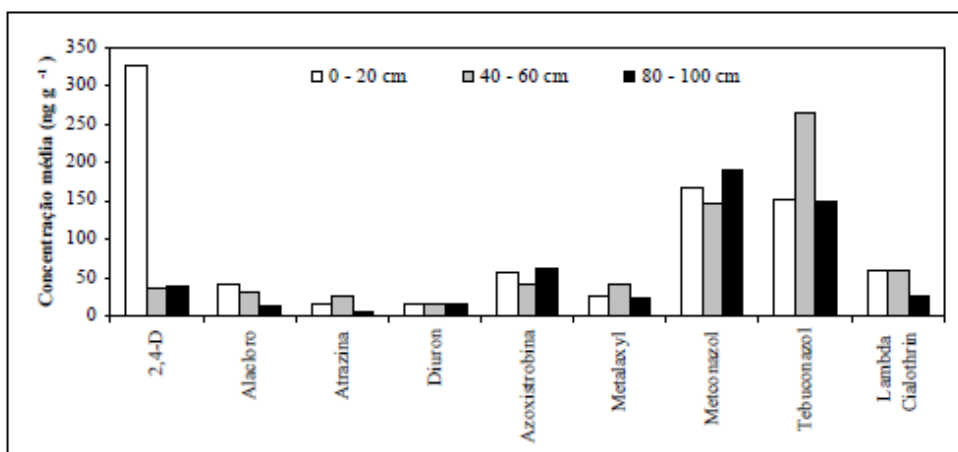


Figura 2: Concentrações médias dos pesticidas no perfil do solo
Fonte: Pinheiro et al. (2009)

Com isso, pode-se dizer que as culturas que utilizam deste agrotóxico acabam absorvendo mais essa substância, uma vez que a 20 cm de profundidade temos a zona de raízes das plantas e, por consequência, a população que se alimenta desta cultura pode bioacumular esse composto, uma vez que este é um herbicida extremamente tóxico, segundo a ANVISA (2014).

3.2 AGROTÓXICOS ÁCIDO ARILOXIALCANÓICO

3.2.1 Ácido 2,4- diclorofenóxiacético (2,4-D)

Segundo a classificação da ANVISA, o 2-4-D, apresentado na Figura 3, pertence ao grupo químico dos ácidos ariloxialcanóico e à classe dos herbicidas. É um herbicida seletivo utilizado no controle de plantas infestantes nas culturas de arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, cevada, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo. É comercializado em formulações de sais, amina e éster.

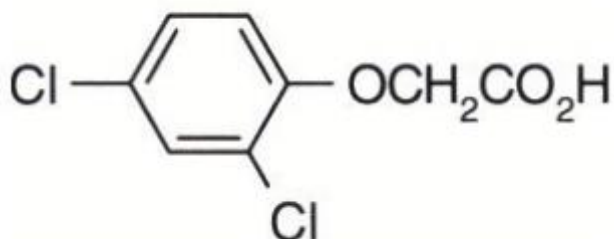


Figura 3: Fórmula estrutural do 2,4-D
 Fonte:ANVISA (20--)

Segundo Castro (2010), o 2,4-D apresenta solubilidade em água (a 25°C) de 900 mg L⁻¹ e em metanol (de 19,7 a 20,3 °C) de 392,8 g L⁻¹. Seu ponto de fusão é de 162,8°C e apresenta massa molar de 221,03 g mol⁻¹. No entanto, Primel *et al* (2005), afirmam que a solubilidade em água a 25°C é de 311 mg L⁻¹. Ainda segundo os autores, o composto possui tempo de meia vida no solo menor que 7 dias e em água o tempo de meia vida é de 7,5 dias.

O 2-4-D é um composto extremamente tóxico(ANVISA, 20--). De acordo com a Ficha de Informação de segurança de Produto Químico (FISPQ), apresentada pela CETESB,o herbicida apresenta uma DL50 oral de 370mg kg⁻¹ e DL50 dermalde1500 mg kg⁻¹para ratos.

Além disso, estudos em humanos mostram que concentrações elevadas do herbicida afetam o sistema nervoso central e podem causar irritações no trato gastrointestinal e na pele (ARAÚJO, 2008).

Este herbicida é altamente seletivo e sistêmico, isto porque se concentra no tecido radicular em crescimento, desta forma impede o crescimento de ervas daninhas (AMARANTE Jr *et al.*, 2003). O principal produto de degradação do 2,4-D é o 2,4- diclorofenol (2,4-DCF) apresentado na Figura 4:

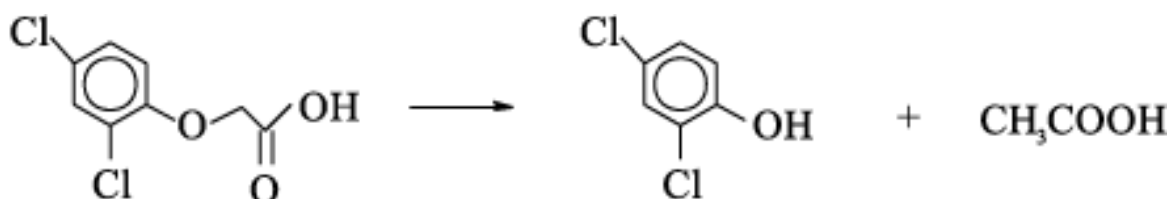


Figura 4: 2,4-D e seu principal produto de degradação
 Fonte:AMARANTE Jr *et al.*, 2003.

De acordo com Resende (2011), o 2,4-DCF é sólido a temperatura ambiente e possui um forte odor característico. É pouco solúvel em água, porém possui elevada solubilidade em álcoois. A resolução CONAMA 357/2005 estabelece em $4,0\mu\text{g L}^{-1}$ a concentração máxima de 2,4-D, em corpos d'água doce classe1, a qual compreende águas destinadas ao consumo humano (CONAMA,2005).

De acordo com o IBAMA, no ano de 2013, o 2,4-D ocupou o segundo lugar dos princípios ativos mais vendidos, ficando atrás apenas do glifosato e seus sais, como pode ser observado na Figura 5.

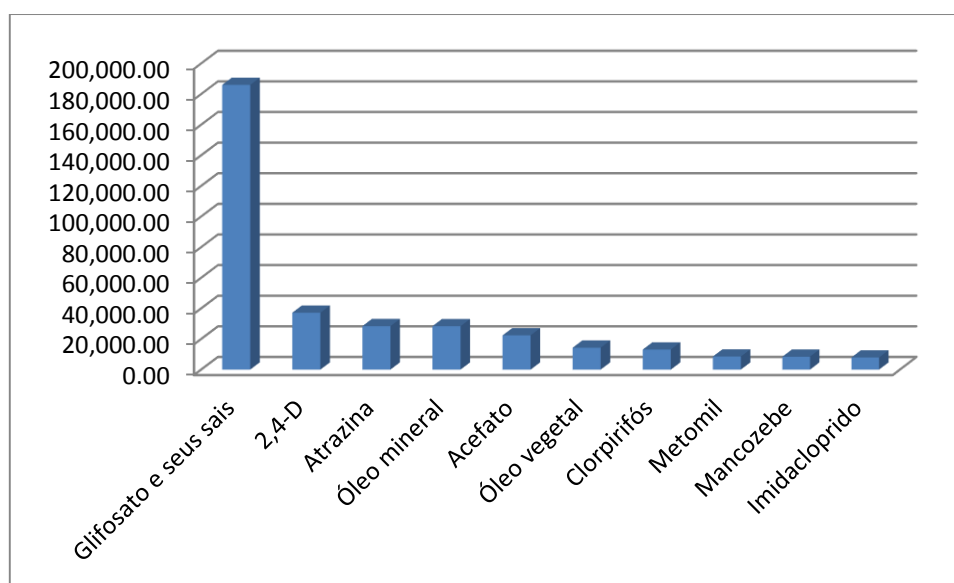


Figura 5: Os 10 ingredientes ativos mais vendidos em 2013
Fonte: Adaptado de IBAMA, 2014

3.3 CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um método físico-químico de separação. É uma técnica na qual os componentes a serem separados se encontram em duas fases: uma fixa, denominada de fase estacionária e outra que é um fluido, denominada fase móvel (DEGANI *et al.*,1998).

A cromatografia líquida de alta eficiência difere da cromatografia líquida clássica por utilizar uma elevada pressão para forçar a passagem do solvente pela coluna, a qual contém partículas de sílica, geralmente, em suas paredes para proporcionar as separações (LEAL,2013).

A técnica de CLAE tem sido utilizada para a análise de agrotóxicos e seus subprodutos a partir de matrizes ambientais complexas, como água, solo e sedimentos, por ser um método que apresenta elevada eficiência de separação, sensibilidade e seletividade (AULAKH *et al*, 2005).

Dados da literatura, mostrados na Tabela 6, demonstram ser possível a detecção de diferentes agrotóxicos por cromatografia, tendo como matriz solos, águas superficiais e subterrâneas.

Tabela 6: Dados referentes à detecção de herbicidas por métodos cromatográficos, compilados a partir da literatura.

	PINHEIRO et al., 2009	KASHYAPet al., 2005	AMADORI et al., 2013	UCT, 2013	PRIMEL et al., 2005
Solução estoque	-	Acetonitrila	-	-	-
Solução de Trabalho	-	Acetonitrila	-	-	Metanol
Técnica	CLAE-UV- Vis	CLAE - DAD	CLAE - DAD	CLAE-MS	CLAE- UV
Tipo de coluna	C18	C18	C18	C18	C18
Tamanho da coluna	250 mm x 4,6 mm	250 mm x 4,6 mm	250 mm x 4,6 mm	100 mm x 2,1 mm	250 mm x 4,6 mm
Diâmetro da partícula (μm)	5	5	5	2,6	5
Volume da injeção (μL)	1	3	25	5	20
Fase móvel	Acetonitrila /água (30:70)	Acetonitrila/água (75:25)	Acetonitrila/água (40:60)	A: 0,1% AC. Fórmico em água ultra-pura B: 0,1 % Ác. Fórmico em Metanol	Metanol/ água acidificada (60:40)
Fluxo da fase móvel	1mLmin ⁻¹	1mLmin ⁻¹	1mLmin ⁻¹	0,4 mLmin ⁻¹	0,8 mLmin ⁻¹
λ (nm)	214	228	220	-	220
Composto	2,4- D	2,4-D	Atrazina	2,4-D	2,4-D

- :Sem informação

Dos dados apresentados destaca-se o trabalho de Primel *et al.*, (2005) onde foi utilizado para a detecção do 2,4-D a fase móvel de metanol e água acidificada (60:40) (v/v), fluxo da fase móvel 0,8 mL min⁻¹ em um CLAE- UV, sendo a condição inicial utilizada neste trabalho.

3.3.1 Validação de método

De acordo com Ribani *et al.*, (2004), para que haja a garantia de que um novo método analítico gere resultados confiáveis faz-se necessário que este passe por uma avaliação denominada de validação.

Para a validação de um método são necessários procedimentos que avaliem se os resultados esperados apresentam credibilidade, precisão e exatidão adequados(LANÇAS, 2004).

Na validação de métodos cromatográficos é necessário realizar a análise de algumas figuras de mérito, são elas: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*,2004).

Seletividade é a capacidade do método separar o composto analisado de forma que não haja interferentes, ou seja, é a forma de garantir que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Para avaliar a seletividade compara-se uma matriz isenta do composto de interesse com uma na qual foi adicionado o padrão (RIBANI *et al.*,2004).

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para isso, é necessário que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes, as quais irão constituir uma equação de reta denominada de curva analítica. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação da reta (r^2) pela Anvisa (2003) deve ser igual a 0,99 e pelo Inmetro (2010) deve ser superior a 0,9.

Faixa de trabalho é o intervalo onde se tem uma variação aceitável da concentração do composto de interesse. No Brasil a Anvisa recomenda uma

variação de $\pm 20\%$ em relação a concentração teórica ou esperada (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Precisão mede a capacidade dos resultados obtidos se assemelharem entre si e representa a dispersão de resultados para uma mesma amostra, amostras ou padrões semelhantes sob condições previamente definidas. Ela pode ser avaliada através da reprodutibilidade a qual é expressa como o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação. O coeficiente de variação é calculado de acordo com a Equação 1, (ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

$$\text{Coeficiente de variação} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média calculada}} \times 100 \quad (1)$$

Exatidão representa o grau de concordância entre o valor encontrado experimentalmente com o valor esperado (concentração teórica) (Equação 2) (ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado (ANVISA, 2003). De acordo com Ribani *et al.* (2004), para a determinação do LD utiliza-se a razão da estimativa do erro do coeficiente linear e a inclinação da curva, multiplicado por 3,3 (Equação 3).

$$LD = \frac{\text{Estimativa do erro do coeficiente linear (Sa)}}{\text{Inclinação da curva (b)}} \times 3,3 \quad (3)$$

Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003). Para o cálculo do limite de quantificação utiliza-se a mesma razão do limite de detecção, porém multiplicada por 10 (Equação 4) (RIBANI *et al.*, 2004).

$$LQ = \frac{\text{Estimativa do erro do coeficiente linear (Sa)}}{\text{Inclinação da curva (b)}} \times 10 \quad (4)$$

4 METODOLOGIA

4.1 REAGENTES E INSUMOS

O padrão de 2,4-D (Sigma-Aldrich) com 99,9% de pureza foi utilizado no preparo da solução estoque com metanol (J.T Baker) grau HPLC.

Utilizou-se água ultra-pura obtida pelo sistema Direct-Q 8UV. Já o ácido fosfórico utilizado no preparo da solução de água acidificada é de grau analítico.

4.2 ENSAIOS PRELIMINARES

Foram preparadas soluções de 20 mg.L⁻¹ de 2,4-D nos solventes orgânicos, metanol e acetonitrila, individualmente para leitura em espectrofotômetro na faixa de 190 à 900 nm. Com o solvente que apresentou melhor resultado foi construída uma curva analítica de 1 a 100 mg.L⁻¹.

4.3 IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO 2,4-D

A determinação do 2,4-D foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o cromatógrafo Agilent 1260, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e colunas C18 (ZORBAX Eclipse Plus – 4,6 x 250 mm, 5 µm) e (ZORBAX ODS – 4,6 x 250 mm, 5 µm).

Inicialmente utilizando a coluna ZORBAX ODS, foram avaliados os solventes acetonitrila e metanol para a fase orgânica da eluição, assim como também foram avaliadas diferentes proporções dos solventes orgânicos na fase móvel, sendo utilizada água acidificada com 0,1% de ácido fosfórico. As proporções testadas da

fase móvel foram 40:60, 50:50 e 60:40 (v/v) para acetonitrila e 50:50, 60:40 e 70:30 (v/v) para o metanol.

Definida a condição de eluição, foi avaliado o modo de preparo da diluição das amostras, 100% metanol e 50% metanol:50% água acidificada (v/v).

Uma vez que a coluna cromatográfica ZORBAX ODS não apresentava repetitividade, foram realizados os mesmos testes com a coluna ZORBAX Eclipse Plus, sendo esta utilizada para os demais testes de otimização do método e validação do método.

Foram então analisada as vazões de 0,8, 1,0 e 1,2 mL min⁻¹ para a fase móvel, e posteriormente o volume de injeção (5, 10, 20, 30, 40 e 50 µL).

Como forma de comprovação da linearidade mesmo em maiores concentrações, foram realizadas injeções de soluções de 4,0 e 5,0 mg L⁻¹ nos volumes de injeção 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µL.

4.4 FIGURAS DE MÉRITO

A análise das figuras de mérito foi feita através do preparo de duas curvas analíticas independentes de 0,84 à 7,0 mg L⁻¹. Tais curvas foram separadas em curvas de baixa concentração (0,84, 0,98, 1,12 e 1,26 mg L⁻¹) e alta concentração (1,4, 2,1, 2,8, 3,5, 4,2, 5,6 e 7,0 mg L⁻¹).

Os testes de precisão foram feitos baseados no coeficiente de variação, o qual é determinado pela razão do desvio padrão sobre a concentração média calculada e multiplicada por 100.

Os testes de exatidão foram determinados pela razão da concentração média experimental sobre a concentração teórica multiplicada por 100.

4.5 TESTE DE ESTABILIDADE DO COMPOSTO

Foram realizados testes de estabilidade do herbicida 2,4-D em solvente orgânico por até 50 dias e em água acidificada por até 22 dias, avaliando cinco concentrações diferentes: 1,26; 1,4; 3,5; 5,6 e 7,0 mg L⁻¹.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ENSAIOS PRELIMINARES

5.1.1. Solvente

Tendo como base os trabalhos de Pinheiro *et al.*(2009), Kashyap *et al.*, (2005) e Amadori *et al.* (2013) nos quais utilizaram acetonitrila, e de Primel *et al.* (2005) em que foi utilizado metanol no preparo da solução estoque, comparou-se neste trabalho o preparo da solução estoque em metanol e acetonitrila, com o intuito de saber em qual dos solventes o herbicida em questão apresentaria melhores resultados na faixa de absorção do composto de 190 a 900nm.

Quando comparados os espectros de absorção no espectrofotômetro UV-VIS para a concentração de 20 mg L⁻¹, observa-se que o solvente que apresentou melhores respostas foi o metanol, como pode ser observado na Figura 6.

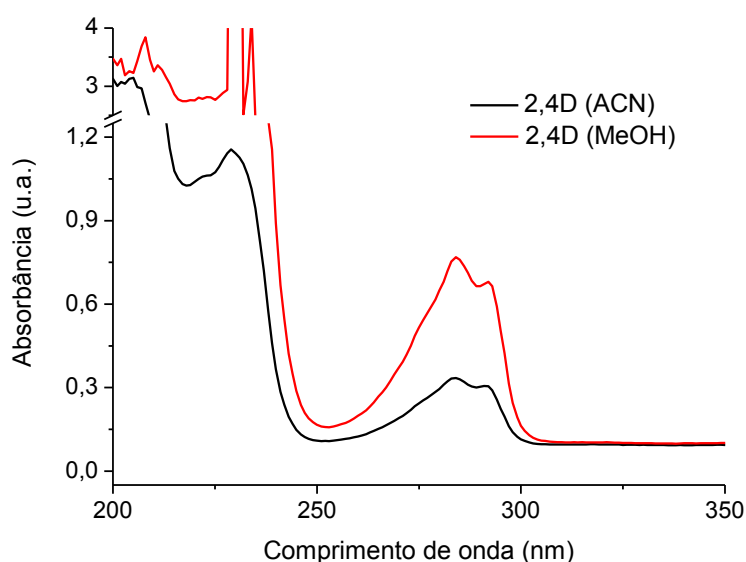


Figura 6: Espectro de absorção UV-VIS das soluções de 2,4-D (20 mg L⁻¹) preparadas com os solventes orgânicos acetonitrila e metanol grau cromatográfico

Pela análise do espectro obtido no UV-Vis também foi possível identificar os pontos máximos de absorção do 2,4-D em 200nm, 230nm e 280nm. Assim como, Kashyap *et al.*, (2005) que observou um maior grau de absorção do 2,4-D na faixa

de 228nm, W. Chu (2001) observou dois picos de absorção majoritários em 229nm e em 283nm.

Desta forma, o metanol foi o solvente utilizado no preparo das soluções estoque e na construção da curva analítica com concentrações variando entre 1,0 e 100 mg L⁻¹, como pode ser observado na Figura 7.

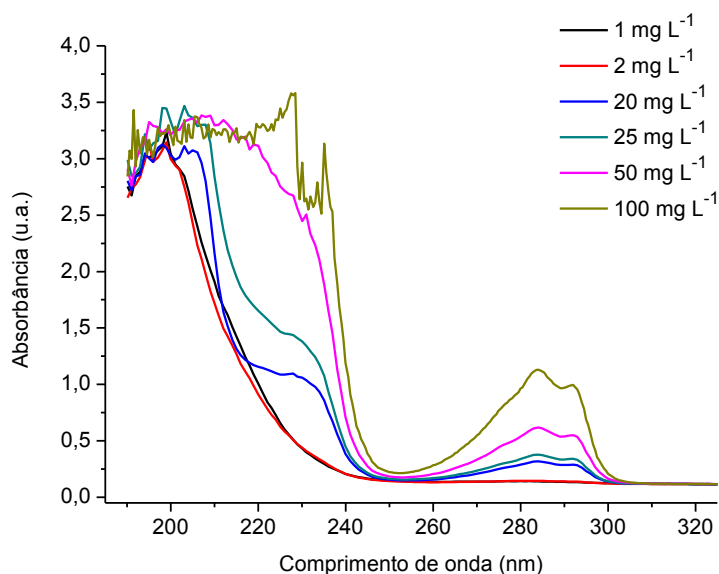


Figura 7: Curva analítica de 1,0 a 100 mg L⁻¹ de 2,4-D em metanol grau cromatográfico no espectrofotômetro UV-VIS

Com base na Figura 7 pode-se observar que o 2,4-D nos diferentes comprimentos de onda (200, 230 e 282 nm) apresenta diferentes absortividades molares, sendo a mais sensível em 200 nm. Porém, neste comprimento de onda muitas substâncias absorvem e, desta forma, causam interferência no resultado. Sendo assim, decidiu-se utilizar o comprimento de 230nm, pois é o segundo em intensidade.

Por se tratar de um micropoluinte, presente no meio ambiente em concentrações na ordem de ng L⁻¹ e µg L⁻¹, faz-se necessária o uso de uma técnica analítica capaz de detectar e quantificar o composto nessa faixa de concentração.

Uma vez que não é possível a quantificação do 2,4-D abaixo de 1ppm no espectrofotômetro, foi escolhida a cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos para as análises futuras do composto.

5.2 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

5.2.1 Otimização das condições cromatográficas (CLAE-DAD)

Tendo por base os resultados apresentados anteriormente obtidos no espectrofotômetro UV-VIS, no qual foi observado que o melhor solvente utilizado era o metanol e com base no trabalho de Primel *et al.*,(2005) que utilizou metanol como um dos componentes da fase móvel, iniciaram-se os testes para a otimização das condições cromatográficas.

As condições iniciais de trabalho foram baseadas nas utilizadas por Primel *et al.*,(2005) com volume de injeção de 20 μL , vazão de 0,8 mL min^{-1} e proporção da fase móvel 60:40 – MeOH:H₂O acidificada (v/v). Inicialmente, variou-se apenas a fase móvel com o objetivo de verificar qual apresentaria melhor resposta para a coluna ZORBAX ODS. No entanto, as respostas obtidas com a coluna utilizada não foram consideradas satisfatórias, pois não estava ocorrendo uma boa separação dos analitos. Além disso, apresentava uma linha de base ruim e cauda cromatográfica (Figura 8). Tal resultado foi interpretado como sendo decorrente de um erro na fase móvel testada.

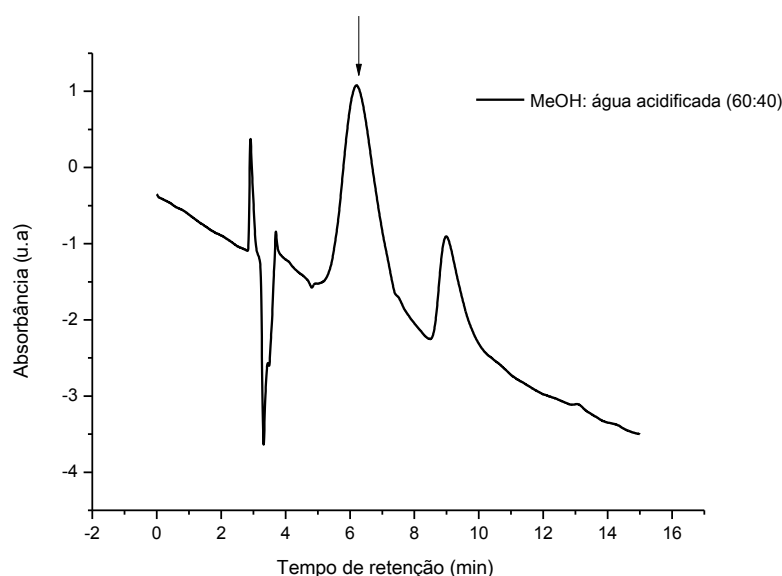


Figura 8: Eluição MeOH: Água acidificada 60:40, vazão de 0,8 mL min^{-1} e volume de injeção de 20 μL com solução padrão de 2,4-D de 5,0 mg L^{-1} diluída em 100% MeOH

Desta forma, foram realizados novos testes para verificar se a fase móvel deveria ser composta por acetonitrila ou metanol, agora utilizando o CLAE-DAD. Variou-se a fase móvel e sua proporção mantendo constantes o volume de injeção e vazão de 20 μ L e 1mL min⁻¹, respectivamente.

Os cromatogramas obtidos para as diferentes proporções de fase móvel são apresentados a seguir (Figuras 9, 10 e 11).

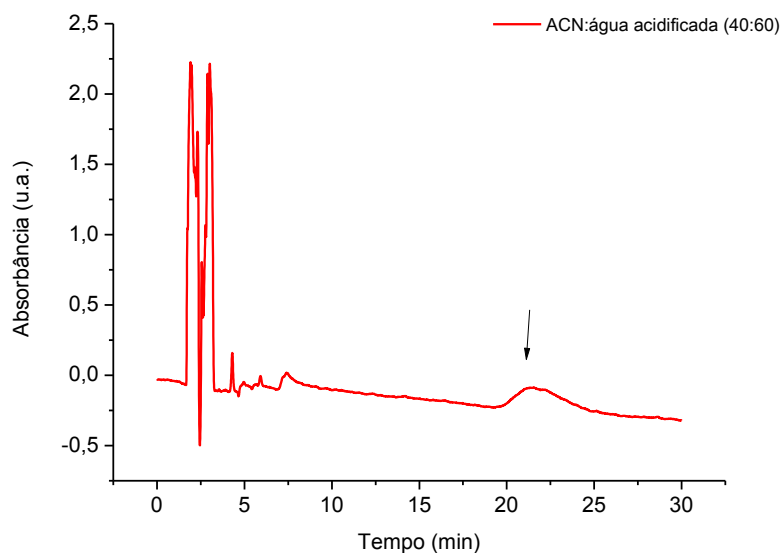


Figura 9:Eluição ACN: Água acidificada 40:60, vazão de 1,0 mLmin⁻¹e volume de injeção de 20 μ L com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L⁻¹diluída em 100% MeOH

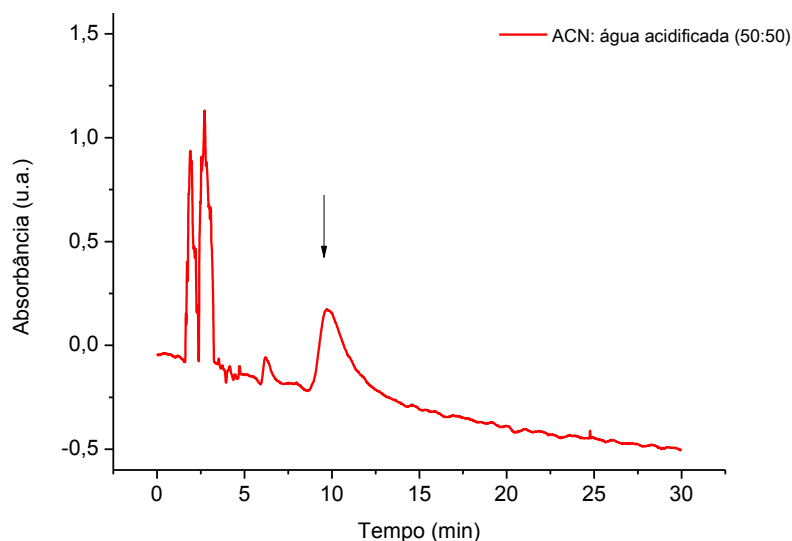


Figura 10: Eluição ACN: Água acidificada 50:50, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ com solução padrão de 2,4-D de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ diluída em 100% MeOH

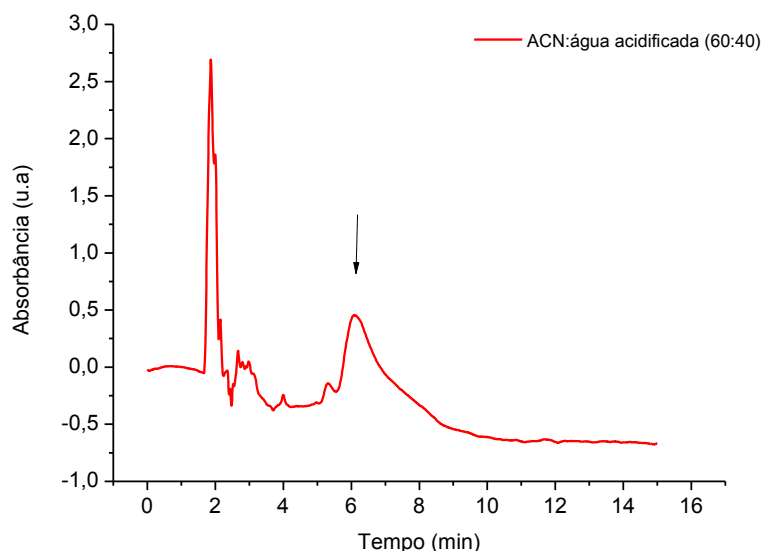


Figura 11: Eluição ACN: Água acidificada 60:40, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ com solução padrão de 2,4-D de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ diluída em 100% MeOH

Utilizando-se acetonitrila, observou que não foi obtida separação dos picos satisfatória ou estes apresentavam cauda, sinal de que a separação não estava sendo eficiente.

A seguir, foram testadas proporções para a eluição de metanol e água acidificada. Vale ressaltar que não foi testada a proporção 40:60 (MeOH: Água acidificada), uma vez que uma maior proporção de água na fase móvel acarreta em

uma maior pressão para o sistema podendo avariar a coluna do equipamento. Desta forma, para metanol foram testadas as proporções para fase móvel (v/v) de 50:50, 60:40 e 70:30 (MeOH: Água acidificada) (Figuras 12, 13 e 14).

Na proporção da fase móvel de 50:50 (MeOH: água acidificada), não foi detectado pico até os 16 minutos de corrida. Desta forma, interrompeu-se a corrida, pois o tempo de retenção estava sendo muito elevado, o que acarretaria em maior consumo de solvente.

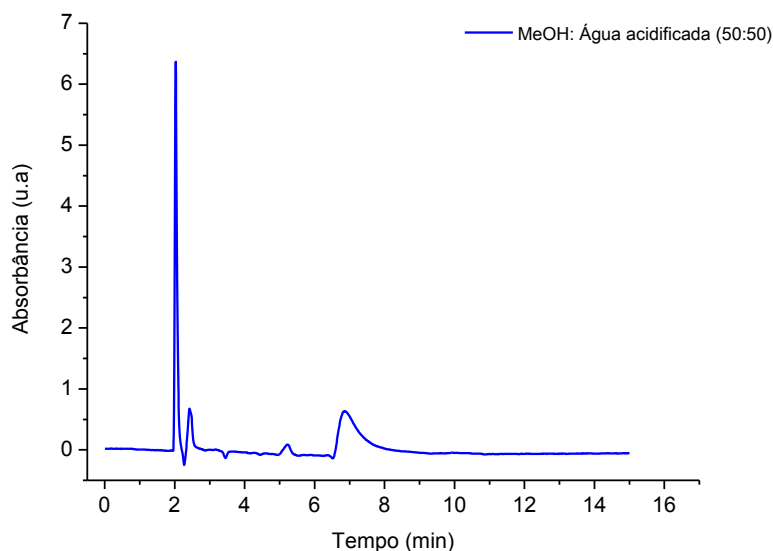


Figura 12: Eluição MeOH: Água acidificada 50:50, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ com solução padrão de 2,4-D de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ diluída em 100% MeOH.

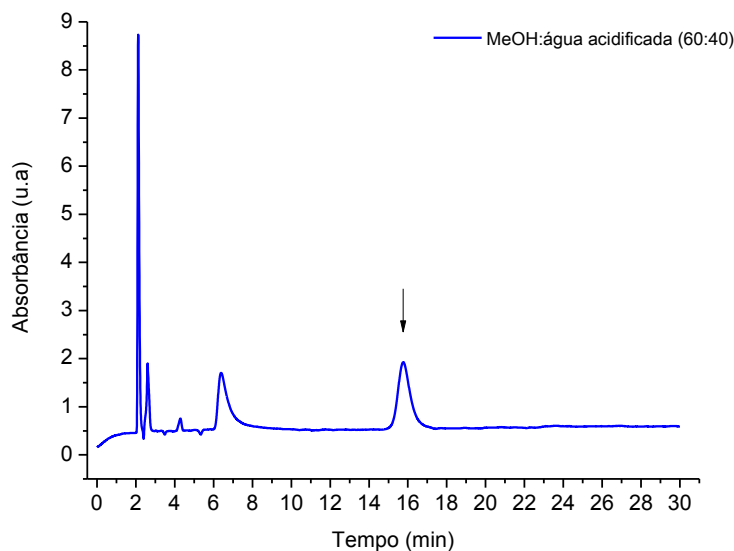


Figura 13: Eluição MeOH: Água acidificada 60:40, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ com solução padrão de 2,4-D de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ diluída em 100% MeOH

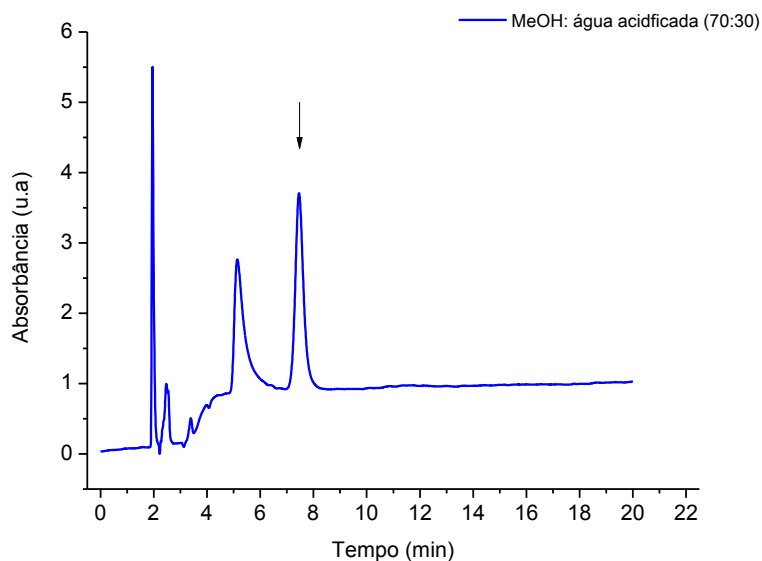


Figura 14: Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ com solução padrão de 2,4-D de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ diluída em 100% MeOH

Com base nos cromatogramas apresentados, pode-se observar que entre os solventes orgânicos o metanol continuou sendo o melhor. Quanto às eluições nota-se que a melhor proporção é de 70:30 (MeOH: água acidificada), pois os picos estão mais separados e além disso apresentam melhor resolução.

Após verificar a melhor eluição para a corrida, foi testado o modo de preparo da diluição da amostra. A partir da mesma solução estoque de 20 mg L^{-1} diluiu-se duas amostras para 1ppm, uma delas utilizando apenas metanol, sendo nomeada de 100% MeOH, e a segunda preparada de forma que se obtivesse 50% MeOH e 50% água acidificada, sendo nomeada de 50% MeOH.

Essas amostras foram analisadas no HPLC-DAD com eluição 70:30 (MeOH: água acidificada), vazão de 1 mL min^{-1} e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. O resultado dessa análise pode ser observado na Figura 15.

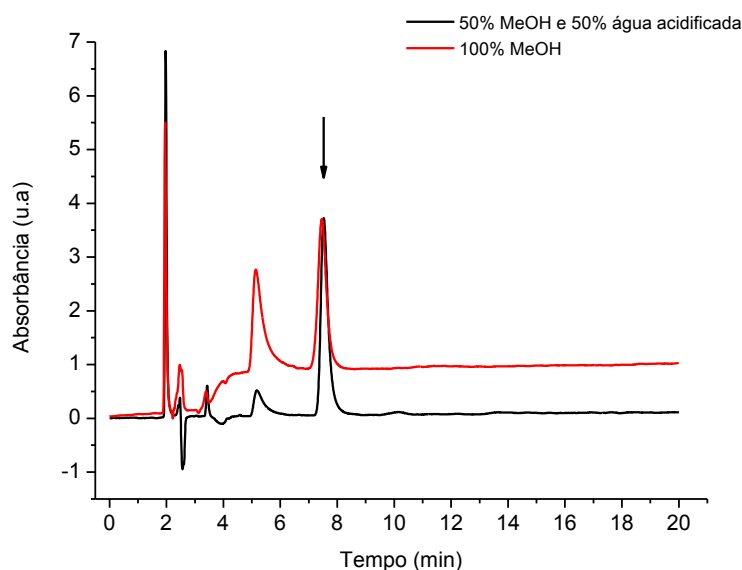


Figura 15: Sobreposição dos cromatogramas das amostras de 2,4-D preparadas em diferentes diluições, sendo 100% MeOH e 50% Metanol:50% água acidificada. Nas condições cromatográficas: Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$

Com base no cromatograma obtido, concluiu-se que a melhor condição de preparo da amostra é utilizando a proporção de 50% metanol e 50% água acidificada, pois como pode ser observado (Figura 15), a solução preparada desta forma apresentou uma maior absorbância em relação à solução preparada somente com metanol.

Até então, todos os testes utilizavam a coluna ZORBAX ODS, no entanto os resultados não apresentavam repetitividade entre ensaios realizados em dias diferentes.

Foi optado por testar uma nova coluna cromatográfica, ZORBAX Eclipse Plus. Todos os testes de eluição e preparo de amostra para a nova coluna foram repetidos, sendo adotada essa coluna para os dados apresentados futuramente.

As principais diferenças encontradas em relação às colunas utilizadas são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7: Diferença entre as características das colunas utilizadas

<i>Características</i>	<i>ODS</i>	<i>Eclipse Plus</i>
% carbono	20%	8%
Tamanho do poro (Å)	70	95
Área de superfície ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	330	160
Endcapped	sim	duplo

Fonte: Adaptado de <http://www.chromatographyshop.com/html/zorbax_agilent.html>

Com base nas características apresentadas das colunas utilizadas, observa-se que a principal diferença está na porcentagem de carbono existente no seu preenchimento, enquanto a coluna ODS possui 20% de carbono em sua composição a coluna Eclipse Plus apresenta apenas 8%. Essas porcentagens estão diretamente relacionadas com o número de poros existentes e a superfície de contato presente na coluna o que resulta diretamente em uma maior área de superfície.

Devido à essas diferenças, quanto maior a porcentagem de carbono, maior a interação do analito com o recheio da coluna cromatográfica resultando em um maior tempo de retenção, alargamento do pico cromatográfico com uma cauda final. Tal interação pode ser observada na Figura 16, na qual as duas colunas são comparadas sob as mesmas condições cromatográficas.

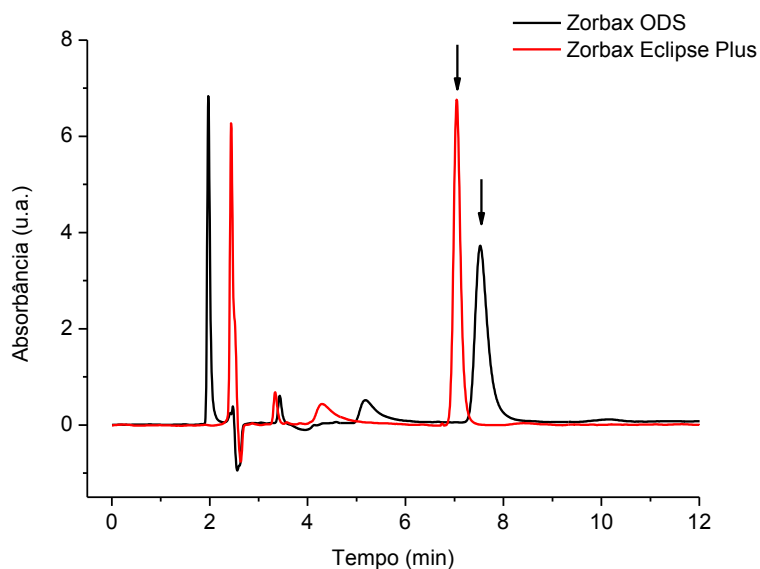


Figura 16: Sobreposição dos cromatogramas comparando as colunas. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ com solução padrão de 2,4-D de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ diluída em 50% MeOH

Desta forma, a coluna ZORBAX Eclipse Plus apresentou melhores resultados frente à coluna ZORBAX ODS, pois resultou em maiores absorvâncias para uma mesma amostra e melhor resolução de pico cromatográfico. Após definida a proporção da fase móvel realizou-se testes de vazão. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 17.

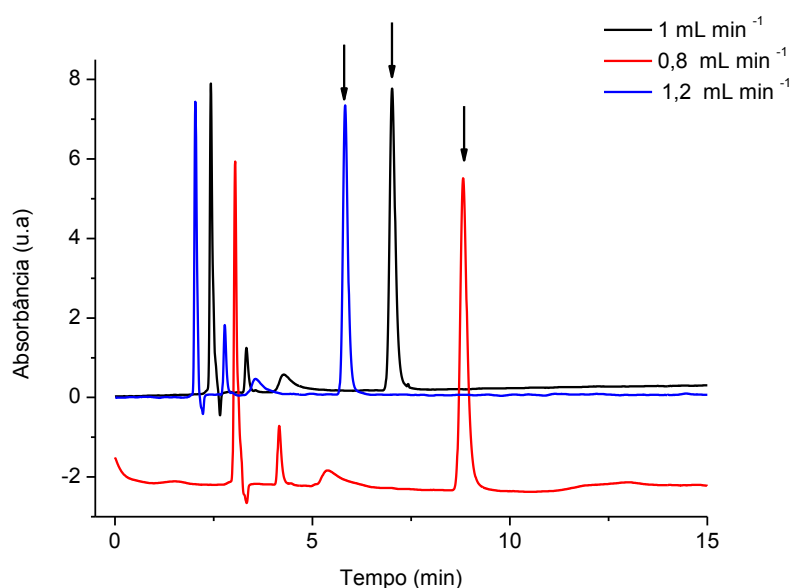


Figura 17: Sobreposição dos cromatogramas comparando as vazões. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, volume de injeção de 20 μL com solução padrão de 2,4-D de 1,0 mg L^{-1} diluída em 50% MeOH

Tabela 8: Características da corrida avaliada em diferentes vazões

Vazão (mL min^{-1})	Tempo de retenção (min)	Pressão da coluna (bar)	Área	Altura	Largura	Simetria
0,8	8,817	138	102,5	7,9	0,1942	0,682
1,0	7,018	175	81,3	7,6	0,1609	0,708
1,2	5,828	203	67,6	7,3	0,1403	0,739

Dados obtidos do cromatograma apresentado na Figura 17

Analisando os dados, observa-se que a vazão de 0,8 mL min^{-1} apresenta uma área maior, no entanto, optou-se em utilizar a vazão de 1,0 mL min^{-1} que, mesmo apresentando uma área 20% menor em relação à vazão de 0,8 mL min^{-1} , apresenta uma melhor simetria e um menor tempo de retenção do analito. Além disso, a vazão de 1,2 mL min^{-1} mesmo apresentando melhor simetria e menor tempo de retenção provoca maior pressão no sistema, por isso, optou-se pela vazão de 1,0 mL min^{-1} .

Desta forma, fixou-se a vazão da corrida em 1,0 mL min^{-1} e realizou-se testes de volume de injeção. Injetou-se uma amostra de 1 mg L^{-1} variando a quantidade de amostra injetada no cromatógrafo (5, 10, 20, 30, 40 e 50 μL), sendo possível obter os seguintes dados (Figura 18):

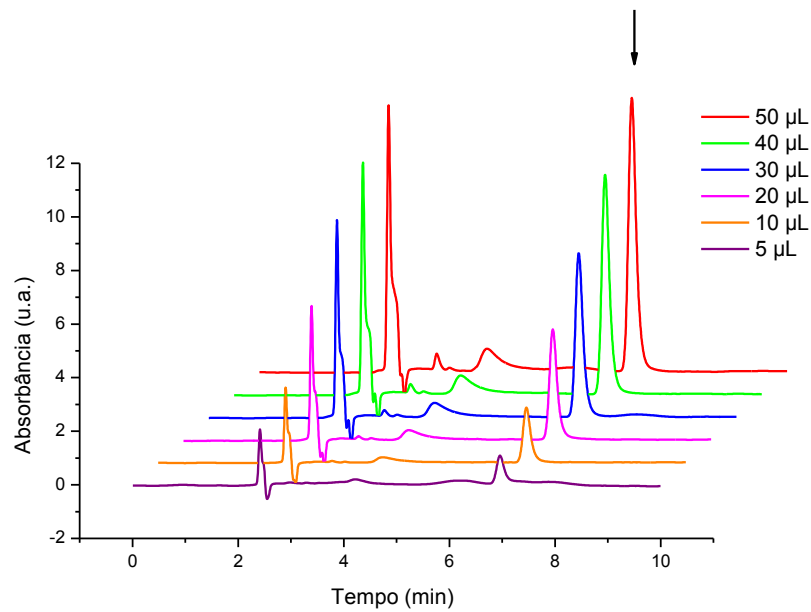


Figura 18: Sobreposição dos cromatogramas comparando os diferentes volumes injetados (5, 10, 20, 30, 40 e 50 μL). Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1 mL min^{-1} com solução padrão de 2,4-D de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ diluída em 50% MeOH

Para avaliar o efeito do volume de injeção, foi realizada uma correlação entre a área obtida e o volume injetado (Figura 19).

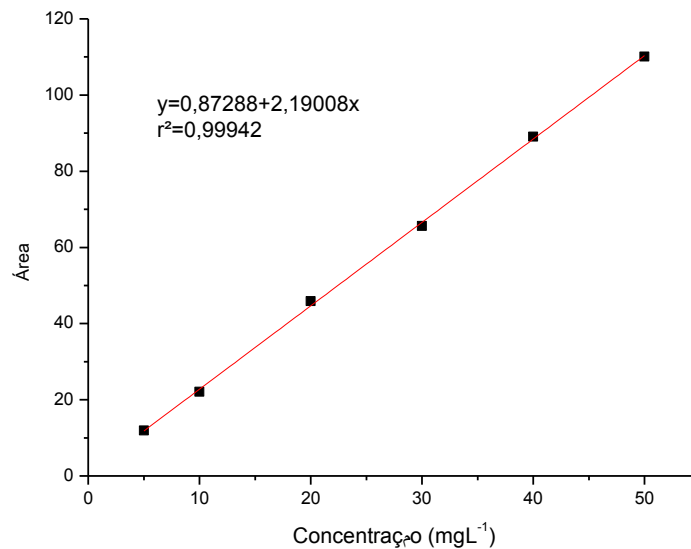
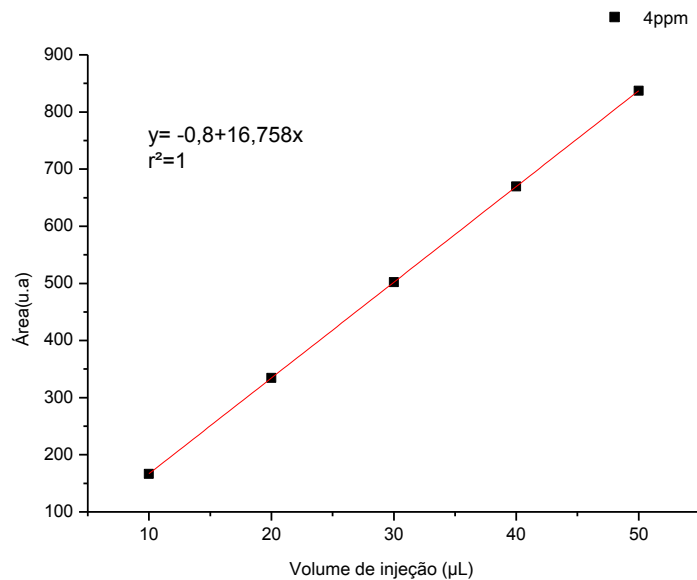


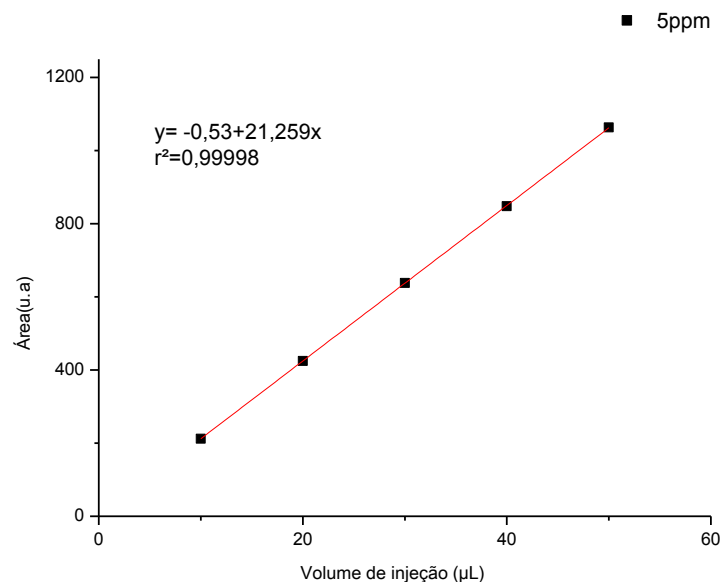
Figura 19: Correlação entre a área obtida e o volume injetado. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1 mL min^{-1} com solução padrão de 2,4-D de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ diluída em 50% MeOH.

A análise dos diferentes volumes injetados mostra ser possível a injeção de 50 μL sem a distorção do pico (Figura 18), assim como a correlação entre o volume

injetado e a área cromatográfica que apresentaram um coeficiente de correlação (r^2) superior a 0,99 (Figura 19). Para confirmar que em amostras com concentrações superiores a 1,0 mg L⁻¹ a linearidade se mantinha, realizou-se testes injetando amostras de 4,0 e 5,0mg L⁻¹ (Figura 20).



A



B

Figura 20: Correlação entre a área obtida e o volume injetado. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1 mL min⁻¹ com solução padrão de 2,4-D de 4,0 mg L⁻¹ diluída em 50% MeOH(A); Correlação entre a área obtida e o volume injetado. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão 1 ml min⁻¹ com solução padrão de 2,4-D de 5,0 mg L⁻¹ diluída em 50% MeOH(B).

Como pode ser observado, injetando-se 50 μL de uma solução de 2,4-D de 4,0 e 5,0 mg L^{-1} a linearidade da curva se mantém. Desta forma, optou-se utilizar 50 μL como volume de injeção.

A análise do cromatograma 3D (Figura 21) do herbicida 2,4-D confirma os comprimentos de onda encontrados no espectrofotometro UV-VIS de 200, 230 e 280nm. Os resultados que serão apresentados no decorrer deste trabalho são referentes ao comprimento de onda de 230nm, pois apesar da intensidade de absorção ser muito maior em 200nm, outros compostos também absorvem nesse mesmo comprimento de onda, podendo apresentar valores que não sejam representativos apenas do herbicida 2,4-D.

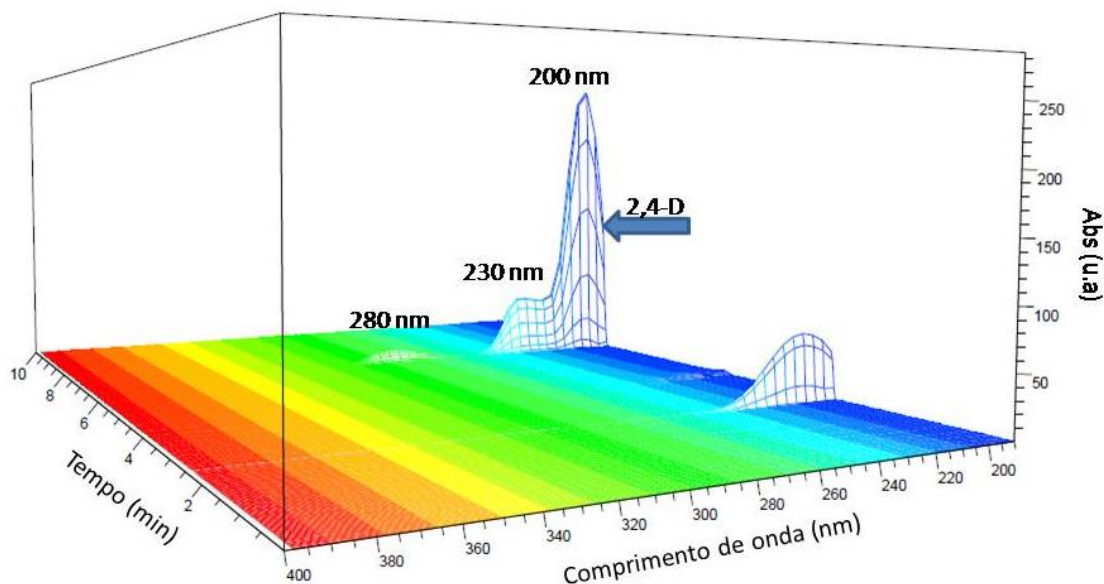


Figura 21: Cromatograma 3D da melhor condição encontrada. Eluição MeOH: Água acidificada de 70:30, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $50 \mu\text{L}$ com solução padrão de 2,4-D de 5 mg L^{-1}

Sendo assim, as condições cromatográficas definidas são apresentadas na tabela a seguir:

Tabela 9: Resultados das condições cromatográficas otimizadas

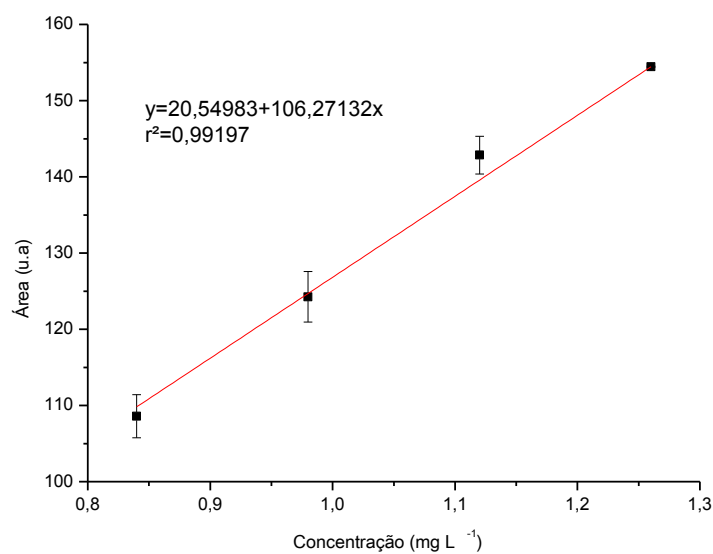
Parâmetros Otimizados	Eluição	Volume de injeção	Vazão	Comprimento de onda
Condições	MeOH: Água acidificada (70:30)	$50 \mu\text{L}$	1 mL min^{-1}	200, 230 e 280nm

5.2.2 Análise das figuras de mérito para o método

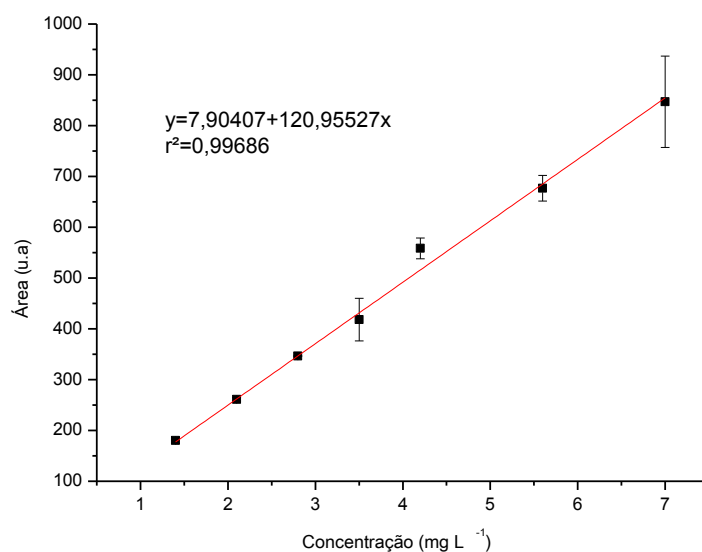
A partir das condições otimizadas, foram elaboradas duas curvas analíticas para serem submetidas à análise cromatográfica e posteriormente realizar a determinação das figuras de mérito: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação e exatidão.

De acordo com o Inmetro, são necessários, no mínimo cinco níveis de concentração para se construir uma curva analítica.

A figura 22 apresenta as curvas analíticas elaboradas em duas faixas de concentração 0,84 à 1,26 mg L⁻¹ (A) e 1,4 à 7 mg L⁻¹ (B) com suas respectivas regressões lineares, para o comprimento de onda (λ) de 230 nm.



A



B

Figura 22: Curva analítica para o comprimento de onda de 230 nm, 0,84 à 1,26 mg L⁻¹ (A) e 1,4 à 7,0 mg L⁻¹(B).Eluição MeOH : Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL

Nesse caso as curvas apresentaram um coeficiente de correlação (r^2) superior a 0,9, sendo consideradas lineares de acordo com o Inmetro.

De acordo com Ribani *et al.* (2004), para a determinação do limite de detecção utiliza-se a razão da estimativa do desvio padrão da resposta e o coeficiente angular da curva multiplicado por 3,3. Já para a determinação do limite de quantificação utiliza-se a mesma razão, porém, multiplicada por dez. Os resultados dos limites de detecção e quantificação alcançados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Valores dos limites de detecção e quantificação estimados a partir da equação de regressão para 2,4-D

Comprimento de onda (nm)	LD (mg L ⁻¹)	LQ (estimado) (mg L ⁻¹)	LQ (adotado) (mg L ⁻¹)
230	0,2126	0,6443	0,84

Os resultados obtidos são superiores aos encontrados na literatura, como Kashyap *et al.*, (2005) encontraram valores de LD e LQ de 0,003 mg L⁻¹ e 0,006 mg L⁻¹, respectivamente. No entanto, estes valores levam em consideração o fator de concentração da amostra, por isso são menores em relação aos encontrados no decorrer deste trabalho.

A Tabela 11 apresenta os valores do coeficiente de variação para o método de quantificação de 2,4D em CLAE-DAD.

Tabela 11: Valores do coeficiente de variação e exatidão calculados para o método de quantificação de 2,4-D

Concentração teórica (mg L ⁻¹)	Concentração média (obtida) (mg L ⁻¹)	CV (%)	Exatidão (%)
0,84	0,83	2,98	98,47
0,98	0,98	3,20	99,57
1,12	1,15	2,02	102,75
1,26	1,26	0,05	100,00
1,40	1,43	3,28	101,81
2,10	2,10	1,26	99,78
2,80	2,80	0,15	99,99
3,50	3,39	10,18	96,93
4,20	4,55	3,72	108,38
5,60	5,53	3,79	98,74
7,00	6,94	10,70	99,12

Analisando os dados, pode-se dizer que o método é preciso, pois apresenta coeficientes de variação inferiores a 15% para a região da curva de baixa concentração e inferiores a 20% para os valores referentes a curva da alta concentração (RIBANI *et al.*, 2004 e ANVISA, 2003).

Visto que as correlações apresentam coeficiente de correlação superiores a 0,99, a faixa linear de trabalho foi dividida em baixa e alta, sendo elas 0,84 à 1,26 mg L⁻¹ e 1,4 à 7 mg L⁻¹, respectivamente.

Além disso, foram realizados testes de estabilidade para o 2,4-D em solvente orgânico por até 50 dias e em água acidificada por até 22 dias, avaliando cinco concentrações diferentes: 1,26; 1,4; 3,5; 5,6 e 7,0 mg L⁻¹. São apresentados os cromatogramas referentes ao teste de estabilidade das amostras de 1,26, 3,5 e 7,0 mg L⁻¹, em solvente orgânico (Figuras 23, 24 e 25).

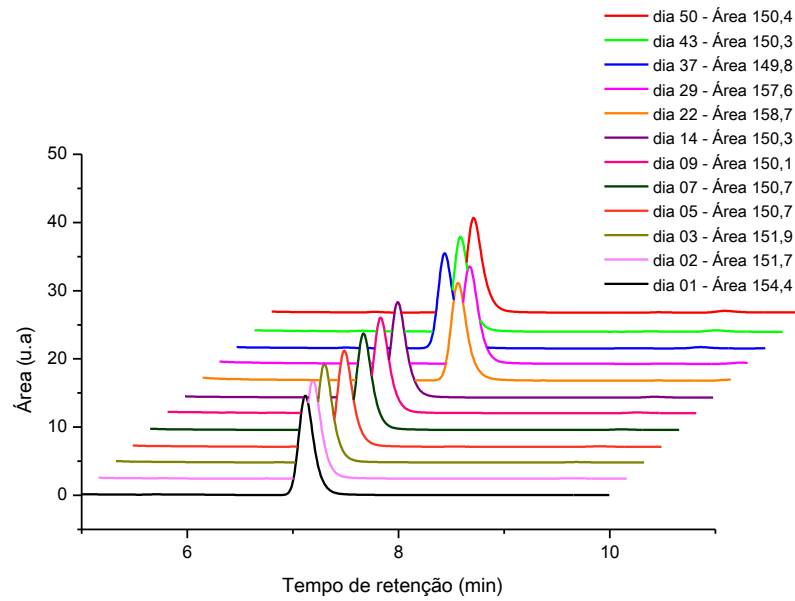


Figura 23: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de 1,26 mg L⁻¹ em solvente orgânico (MeOH). Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL

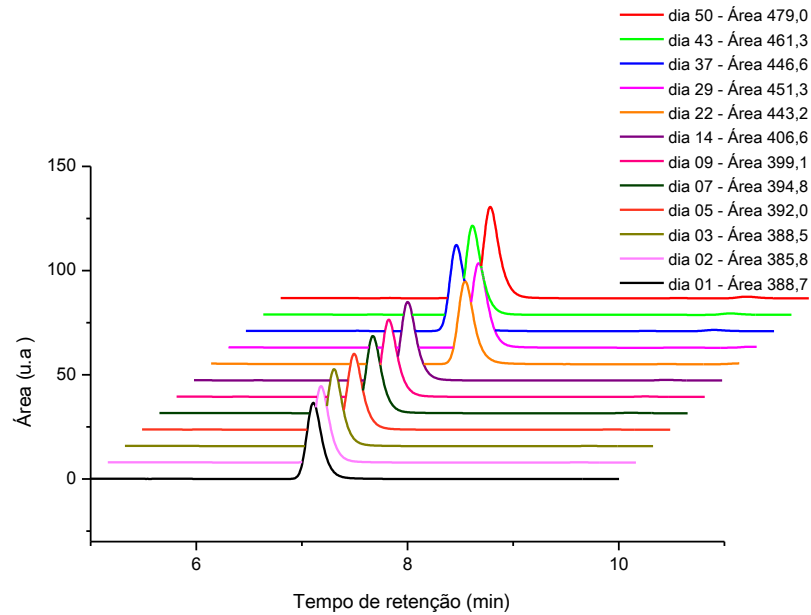


Figura 24: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de 3,5 mg L⁻¹ em solvente orgânico (MeOH). Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL

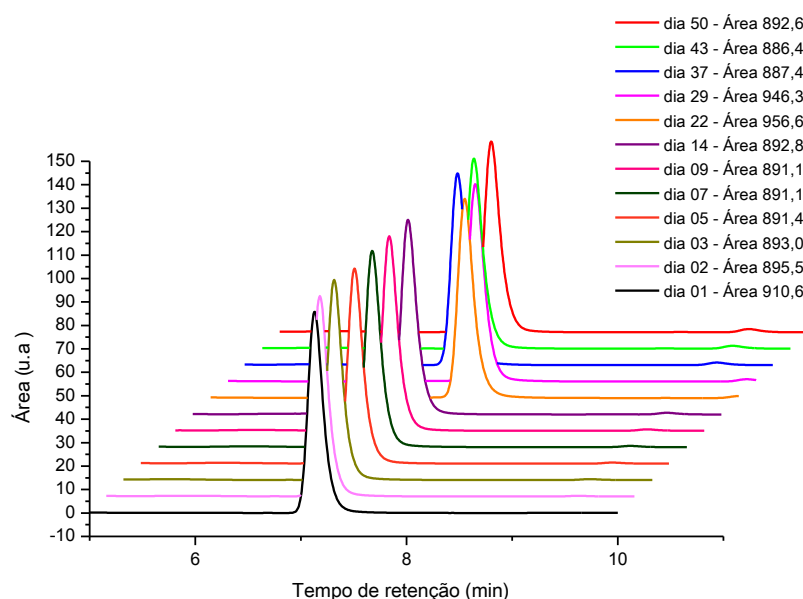


Figura 25: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de 7,0 mg L⁻¹ em solvente orgânico (MeOH) . Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL

Tabela 12: Porcentagem de variação da área cromatográfica do herbicida 2,4-D durante os testes de estabilidade em solvente orgânico

Concentração (mg L ⁻¹)	Dia	Dia	Dia	Dia	Dia	Dia	Dia	Dia	Dia	Dia	Dia	Dia
	01	02	03	05	07	09	14	22	29	37	43	50
	% de variação da área cromatográfica											
1,26	0,0	-1,7	-1,6	-2,4	-2,4	-2,8	-2,7	2,8	2,1	-3,0	-2,7	-2,6
3,5	0,0	-0,7	-0,1	0,8	1,6	2,7	4,6	14,0	16,1	14,9	18,7	23,2
7,0	0,0	-1,7	-1,9	-2,1	-2,1	-2,1	-2,0	5,1	3,9	-2,5	-2,7	-2,0

(-): redução da área cromatográfica.

Os resultados para a amostra na concentração de 3,5 mg L⁻¹(Figura 24), juntamente com a análise da Tabela 12, mostram a ocorrência de um aumento significativo na área do pico a partir do vigésimo segundo dia, chegando a alcançar no quinquagésimo dia um aumento de 23%.

Uma hipótese para tal aumento na área do pico pode ser devido à volatilização do solvente utilizado, o que acarretou em aumento da área cromatográfica. Vale ressaltar que todas as amostras eram acondicionadas em freezer (4°C) entre as análises de diferentes dias.

As demais amostras apresentaram uma redução na área do pico em torno de 2%, desta forma, pode-se dizer que com exceção de casos de volatilização o 2,4-D

apresenta estabilidade em solvente orgânico, quando armazenado em freezer. Na literatura não há relatos de estudos de estabilidade do padrão puro em metanol.

Nos resultados para a amostra na concentração de $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 25), é observado o aparecimento de um pico cromatográfico, o qual pode ser um subproduto do herbicida devido à similaridade do espectro de absorção (226, 230 e 282 nm), sendo do 2,4-D ($200, 230$ e 282 nm). No entanto, não é possível fazer mais suposições por falta de dados da literatura na comparação dos subprodutos formados na degradação do herbicida.

Como citado anteriormente, também foram realizados testes de estabilidade do composto em água acidificada durante 22 dias. A seguir, serão apresentados os cromatogramas referentes ao teste de estabilidade das amostras de $1,26, 3,5$ e $7,0 \text{ mg L}^{-1}$, em água acidificada (Figuras 26, 27 e 28).

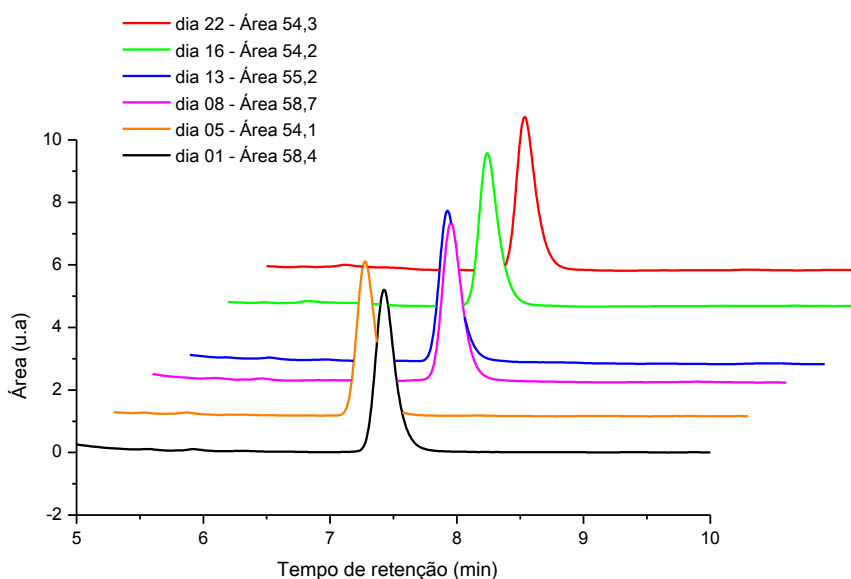


Figura 26: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de $1,26 \text{ mg L}^{-1}$ em água acidificada. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$

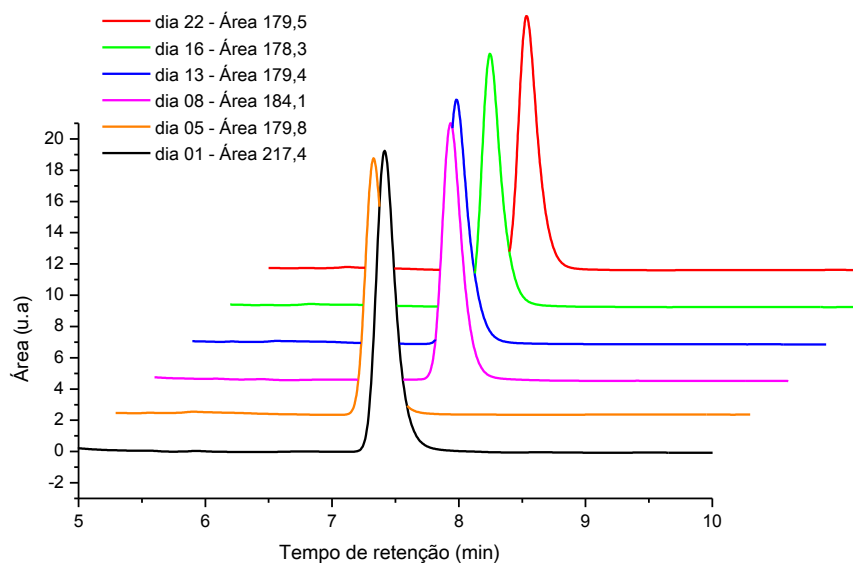


Figura 27: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de 3,5 mg L⁻¹ em água acidificada. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL

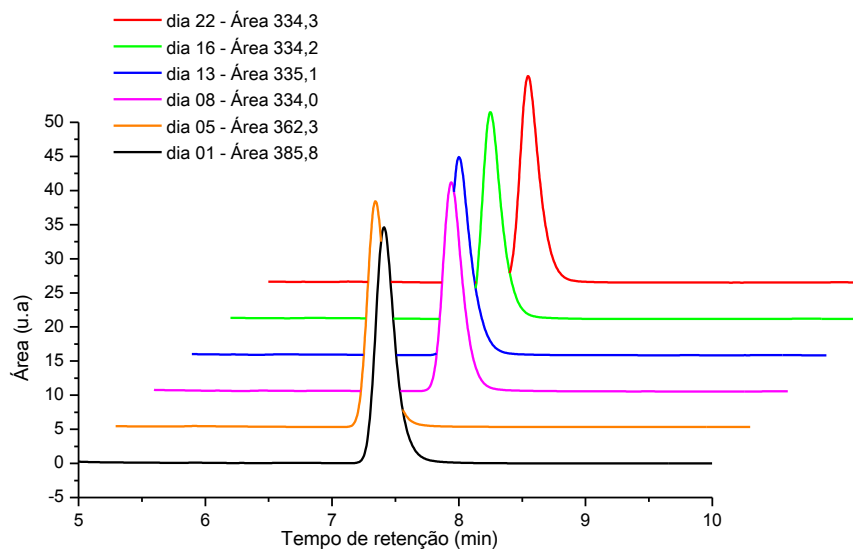


Figura 28: Teste de estabilidade do 2,4-D na concentração de 7,0 mg L⁻¹ em água acidificada. Eluição MeOH: Água acidificada 70:30, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL

Tabela 13: Porcentagem de variação da área cromatográfica do herbicida 2,4-D durante os testes de estabilidade em água acidificada (~pH 2,5)

Concentração (mg L ⁻¹)	Dia 01	Dia 05	Dia 08	Dia 13	Dia 16	Dia 22
	% de variação da área cromatográfica					
1,26	0,0	-7,4	0,5	-5,5	-7,2	-7,0
3,5	0,0	-17,3	-15,3	-17,5	-18,0	-17,4
7,0	0,0	-6,1	-10,8	-13,1	-13,4	-13,3

(-): redução da área cromatográfica.

Os resultados para o teste de estabilidade em água acidificada (~pH 2,5) mostram que o composto no vigésimo segundo dia apresentou uma degradação média próxima de 15%. Isto indica que quando dissolvido em água acidificada e armazenado em freezer, o composto apresenta um tempo de meia vida maior, quando comparado a Primel *et al.*, (2005). Porém, vale ressaltar que os valores de Primel *et al.* (2005) são referentes à amostras reais, ou seja, não foram armazenadas da mesma forma que neste trabalho.

6 CONCLUSÕES

A metodologia implementada para a detecção de 2,4-D em água ultrapura através de CLAE-DAD permite uma análise do composto em três comprimentos de onda, 200nm, 230nm e 280nm, utilizando as condições otimizadas para a coluna ZORBAX Eclipse Plus onde a composição da fase móvel é formada por metanol e água acidificada (70:30) (v/v), utilizando volume de injeção de 50 μL a uma vazão de 1 mL min^{-1} .

A partir das condições otimizadas foi possível analisar as figuras de mérito da metodologia. Desta forma, verificou-se que trata-se de um método linear, pois apresentou curvas analíticas com coeficiente de correlação superior a 0,9.

Nas condições otimizadas utilizadas determinou-se o limite de detecção(LD) e quantificação(LQ) do equipamento os quais são 0,2126 e 0,6443 mg L^{-1} , respectivamente. Pelo fato do LQ estimado do equipamento ser inferior ao menor ponto da curva, foi adotado como limite de quantificação, o primeiro ponto da curva analítica preparada, 0,84 mg L^{-1} .

Com relação à precisão e à exatidão, o método demonstrou-se preciso e exato, uma vez que seu coeficiente de variação não foi superior a 15%.

O composto mostrou-se estável em solvente orgânico e em água acidificada quando armazenados em freezer. Porém, em fase orgânica na concentração de 7,0ppm foi possível observar o aparecimento de um pico cromatográfico, o qual pode ser um subproduto do 2,4-D devido à similaridade do espectro de absorção. No entanto, não é possível afirmar, uma vez que há escassos dados da literatura para a comparação dos subprodutos formados durante a degradação do herbicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADORI, M. F.; CORDEIRO, G. A.; REBOUÇAS, C. C.; ZAMORA, P. G. P.; GRASSI, M. T.; ABATE, G.. **Extraction Method for Determination of Atrazine, Deethylatrzine, and Deisopropylatrazine in Agricultural Soil Using Factorial Desing.** *JournaulBrazilianChemicalSociety*, Vol. 24, N°. 3, p. 483-491, 2013

AMARANTE Jr, O.,P. de.; SANTOS, T. C. R dos.; NUNES, G. S. **Breve Revisão de Métodos de Determinação de Resíduos do Herbicida Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D).** *Química Nova*, Vol. 26, N° 2, p. 223-229, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos e Toxicologia. **Monografias de Agrotóxicos.** Monografia D27- 2,4-D. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bdea3b804745780e857bd53fbc4c6735/D27++24-D.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em maio de 2014.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cartilha sobre Agrotóxicos – Série Trilhas do Campo**, 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9e0b790048bc49b0a4f2af9a6e94f0d0/Cartilha.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em maio de 2014.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003** - “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”

ARAÚJO, R. M. dos S. C. G. de. **Validação de metodologia de análise de pesticidas agrícolas em águas por LC/MS.** 2008. (Mestrado Integrado em Engenharia Química) –Universidade do Porto – Faculdade de Engenharia. Porto – Portugal.

AULAKH, J. S.; MALIK, A. K.; KAUR, V.; SCHMITT-KOPPLIN, P. **A Review on Solid Phase Micro Extraction – High Performance Liquid Cheomatography (SPME-HPLC) Analysis of Pesticides.** *AnalyticalChemistry*, n° 35, p. 71-85, 2005.

BRASIL, **Lei nº 7.802, de 11 de julho de1989.** Que “Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.”

_____, **Decreton° 4.074 de 4 de janeiro de 2002.**Regulamenta a Lei n° 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins e dá outras providências.

CASTRO, F. D. de. **Degradação do Ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D) com Ozônio eletrogerado.** 2010. (Mestrado em Química) – Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n° 357, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia um breve ensaio.** Química Nova na Escola, n°07, maio 1998.

EPA – Environmental ProtectionAgency. AboutContaminatedSoilandSediments. Disponível em: http://www.epa.gov/nrmrl/lrpcd/contamin_ss.html. Acessado em junho de 2014.

FARIA, L. J. da S.;**Avaliação de Diferentes Sorventes na extração em Fase Sólida de Pesticidas em Água. Desenvolvimento e Validação de Metodologia.**2004. (Mestrado em Química) – UNICAMP.

FISPQ - Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico. Disponível em: http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=%C1ClDO%202,4%20-%20DICLOROFENOXIAC%C9TICO. Acesso em: outubro de 2015

FOSTER, S.; VENTURA,R.; **Determinación del riesgo de contaminación de águas subterráneas, uma metodologia basada em datosexistents.** Centro Panamericano de Ingenieria Sanitária y Ciências Del Ambiente – Cepis. Lima, 1991.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.**Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental.** Brasília, 2010.

_____ – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.**Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos – Boletim Anual de**

Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>. Acessado em outubro de 2015.

KASHYAP, S.M.; PANDYA, G. H.; KONDAWAR,V. K.; GABHANE, S. S.. **Rapid Analysis of 2,4-D in Soil Samples by Modified Soxhlet Apparatus Using HPLC with UV Detection.** JournalofChromatographic Science, Vol. 43, p. 81-86, February, 2005.

LANÇAS, F. M. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise. 1ª Edição. São Carlos: Editora Rima, 2004.

LANGENBACH, T.; SCHROLL, L.; SCHEUNERT, I.; **Fate of the herbicide ¹⁴C-terbuthylazine in Brazilian soils under various climatic conditions.**Chemosphere, vol.45, p. 387-398, 2001.

LEAL, W. P.; **Remoção do ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) por adsorção em carvão ativado pulverizado associado ao tratamento convencional de água para consumo humano.**2013 (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Informativo de Economia Agrícola.**Ano 06. Volume 01. Setembro de 2013 Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/INFORMATIVO%20DE%20ECONOMIA%20Agri_%20ano%206%20vol_%201.pdf. Acesso em junho 2014.

_____ – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas e Dados Básicos de Economia Agrícola.**Agosto de 2015.Disponível em:http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Pasta%20de%20Agosto%20-%202015.pdf. Acesso em setembro 2015.

_____ – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório de Produção por Ingrediente Ativo (Consolidado) - Semestre :02/2014.**Disponível em:http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em outubro 2015.

PINHEIRO, A.; SILVA, M. R. da ; JR., A. W.; MORAES, J. C. de S.; Jr, A. C. G. **Estudo da Presença de Pesticidas no Perfil do Solo,sob Diferentes Tipos de Culturas.** RBRH – Revista Brasileira de Recursos Hídricos, volume 14, n.3, p. 51-59, 2009.

PEIXOTO, S. C. **Estudo da Estabilidade a campo dos Pesticidas Carbofurano e Quincloraque em Água de Lavoura de Arroz Irrigado Empregando SPE e HPLC-DAD.** 2007 (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Naturais e Exatas, Santa Maria – RS.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R. ; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. de, O.; MARCHEZAN, E. **Poluição das águas por pesticidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição teórica e Monitoramento.** Química Nova, Vol. 28, N° 4, p. 605-609, 2005.

RESENDE, Juliana Dalia. **Degradação de 2,4-Diclorofenol em Solução Aquosa por Meio de Processo Fotoquímico Solar.** 2011 (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química, São Paulo.

RIBEIRO, M. L; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. **Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar.** Química Nova, 30, n. 3, p. 688-694, 2007.

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, 27, p. 771-780, 2004.

UCT. **Determination of Chlorophenoxyacetic Acid and Other Acidic Herbicides Using a QuEChERS Sample Preparation Approach and LC- MS/MS Analysis.** October, 2013.

W. Chu. **Modeling the quantum yields of herbicide 2,4-D decay in UV/H₂O₂ process.** Chemosphere, 44, p. 935-941, 2001.