

Artigo Técnico

Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T para monitoramento em água de abastecimento público

Development and validation of analytical method for analysis of 2,4-D, 2,4-DCP and 2,4,5-T for monitoring of public water supply

Edumar Ramos Cabral Coelho^{1*} , Waldiléia Pereira Leal¹ , Karoline Barros de Souza¹,
Andréia do Rozário² , Paulo Wagner Pereira Antunes¹ 

RESUMO

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é o segundo herbicida mais consumido no Brasil e seus efeitos na contaminação dos recursos hídricos e consequente risco sanitário para abastecimento público são conhecidos. O 2,4-D e seu principal produto de degradação, o 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), apresentam potencial de desregulação endócrina, e o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) é tóxico e persistente no meio ambiente. A inexistência de uma metodologia para quantificação simultânea desses compostos motivou o desenvolvimento e a validação do método de extração e concentração de amostras ambientais e a quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para análise de 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T em água filtrada produzida em estação de tratamento de água e água de manancial superficial. Os resultados de extração em fase sólida e a concentração da amostra demonstraram recuperação de 89 a 119%, e desvio padrão entre 0,9 e 11,4%. Para os ensaios de identificação e quantificação, os limites de detecção variaram entre 0,17 e 0,51 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e limite de quantificação de 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os resultados mostraram que é possível empregar esse método na quantificação do 2,4-D, do 2,4-DCP e do 2,4,5-T em monitoramento ambiental e em sistemas de abastecimento de água atendendo às legislações brasileiras.

Palavras-chave: cromatografia líquida de alta eficiência; ácido 2,4-diclorofenoxiacético; 2,4-diclorofenol; ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético; extração em fase sólida.

ABSTRACT

The 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is the second most consumed herbicide in Brazil and their effects in the contamination of the water resources and consequent sanitary risk for public supply are known. The 2,4-D and its main degradation product, 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), have the potential for endocrine disruption and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) is toxic and persistent in the environment. The absence of a methodology that simultaneously determines these compounds led to the development and validation of the solid phase extraction method, environmental samples concentrations, identification and quantification in HPLC-DAD for 2,4-D, 2,4-DCP and 2,4,5-T analysis in filtered water, produced at water treatment plants, and surface water. The extraction assay and samples concentration showed recovery from 85 to 119%, standard deviation between 0.9 and 11.4%. For identification and quantification essays, detection limits ranged between 0.17 and 0.51 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and the quantification limit was 1.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The results showed that it is possible to employ this method for the quantification of 2,4-D, 2,4-DCP and 2,4,5-T in environmental monitoring and in water supply systems taking account of Brazilian regulatory agencies

Keywords: high performance liquid chromatography; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 2,4-dichlorophenol; 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid; solid phase extraction.

INTRODUÇÃO

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida popular, seletivo e sistêmico, bem como um regulador de crescimento, que é amplamente utilizado em todo o mundo em plantas de folhas largas (NJOKU *et al.*, 2015). Os efeitos potenciais de toxicidade do 2,4-D e seus produtos de transformação, tal como o 2,4-diclorofenol (2,4-DCP),

têm sido documentados por vários pesquisadores, além do 2,4-DCP ter sido classificado pela União Europeia (UE) como uma substância de desregulação endócrina ou potencial de desregulação endócrina comprovada (CCE, 2001; XI; MALLAVARAPU; NAIDU, 2010). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) classificou o 2,4-D como extremamente tóxico (Classe I) para a saúde, e

¹Universidade Federal do Espírito Santo - Vitória (ES), Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, campus Cariacica - Cariacica (ES), Brasil.

*Autor correspondente: edumar.coelho@ufes.br

Recebido: 24/03/2016 - Aceito: 12/07/2017 - Reg. ABES: 161536

estudos recentes da Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (IARC), com a Organização Mundial de Saúde (OMS), classificaram o 2,4-D como possivelmente cancerígeno a humanos (LOOMIS *et al.*, 2015). Além disso, outras pesquisas têm avaliado a associação entre o 2,4-D e o linfoma não-Hodgkin (GOODMAN; LOFTUS; ZU, 2017; SMITH *et al.*, 2017). Já o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) foi utilizado mundialmente em grande escala na agricultura para controlar o crescimento de ervas daninhas de folhas largas e em aplicações pós-emergência. Durante a Guerra do Vietnã, o 2,4,5-T, associado ao 2,4-D e ao pentaclorofenol, deu origem ao famoso “agente laranja”, que foi utilizado pela força aérea americana como agente desfolhante (TU; HURD; RANDALL, 2001). Ao ser comparado com o 2,4-D, possui menor biodegradabilidade e maior resistência ao metabolismo microbiano, podendo ser detectado em águas superficiais e subterrâneas, não apenas durante a sua aplicação, mas também após um longo período (WANG & CHU, 2011).

As fórmulas estruturais dos compostos 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T são apresentadas na Figura 1.

O uso indiscriminado de ácidos fenoxiacéticos clorados, como herbicidas seletivos, tem levado ao aumento da poluição das águas, do solo e dos alimentos, além de terem sido identificados como alérgenos do sistema respiratório. Em razão da sua alta toxicidade em mamíferos, em organismos aquáticos e da sua persistência ambiental em longo prazo, as legislações colocam limites rigorosos sobre a presença desses agrotóxicos como resíduos, sujeito às análises de traços (BAGGIANI *et al.*, 2001; FUKUYAMA *et al.*, 2009).

Pesquisas direcionadas ao entendimento do destino ambiental dessas substâncias e dos efeitos adversos causados a organismos não alvos têm

evidenciado a ocorrência de resíduos de agrotóxicos no meio ambiente (SALVAGNI; TERNUS; FUENTEFRÍA, 2011), em águas superficiais e em águas subterrâneas (AZEVEDO; GERCHON; REIS, 2004; DE ARMAS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2013). A presença dos ácidos fenoxiacéticos nos corpos hídricos se dá em razão da sua solubilidade em água, do seu baixo valor de pKa, da sua baixa biodegradabilidade e por serem fracamente retidos pela maioria dos solos devido seu baixo coeficiente de adsorção no solo (NJOKU & HAMEED, 2011; XI; MALLAVARAPU; NAIDU, 2010; SOUZA *et al.*, 2017). Resultados indicativos da presença de 2,4-D em mananciais apresentaram valores abaixo de 30 µg.L⁻¹, porém foi detectado em até 26% do total das amostras analisadas (MARCHESAN *et al.*, 2010; MCKNIGHT *et al.*, 2015; PRIMEL *et al.*, 2005).

Estudos também evidenciaram a presença de agrotóxicos em águas utilizadas para consumo humano (DORES *et al.*, 2006; NAM *et al.*, 2014; RISSATO *et al.*, 2004), sendo que a contaminação de mananciais por agrotóxicos apresenta risco sanitário à saúde e devem ser monitorados também em sistemas de abastecimento de água. A Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 2.914/2011 estabelece o valor máximo permitido (VMP) de 30 µg.L⁻¹ para a soma do 2,4-D e do 2,4,5-T, não fazendo referência ao 2,4-DCP (BRASIL, 2011).

A separação e a quantificação desses herbicidas podem ser realizadas por técnicas analíticas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os métodos de análise do 2,4-D e do 2,4-DCP por CLAE costumam ser mais simples e rápidos, se comparados com sua determinação por cromatografia gasosa (CG) (AULAKH *et al.*, 2005). No entanto, apesar de o 2,4,5-T ter sido incluído na legislação de potabilidade brasileira, devido sua persistência ambiental, na literatura não foram encontradas referências acerca da determinação simultânea desses compostos por meio de métodos cromatográficos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método de separação e quantificação de 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T em água filtrada e em água de manancial superficial utilizando a CLAE.

METODOLOGIA

Reagentes

Os reagentes utilizados foram acetonitrila (ACN) grau CLAE (J.T. Baker), padrões analíticos de 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T grau CLAE com pureza ≥99% e formiato de amônio P.A (Sigma, Aldrich) com pureza ≥98%. A água ultrapura foi purificada no sistema de ultrapurificação (Millipore) e acidificada com ácido fosfórico P.A (Synth), com pureza de 85%.

Análises cromatográficas

As análises para detecção do 2,4-D, do 2,4-DCP e do 2,4,5-T foram realizadas em um sistema de cromatografia (Shimadzu), modelo CBM-20A, equipado com módulo desgaseificador de solventes (DGU-20AS), bomba

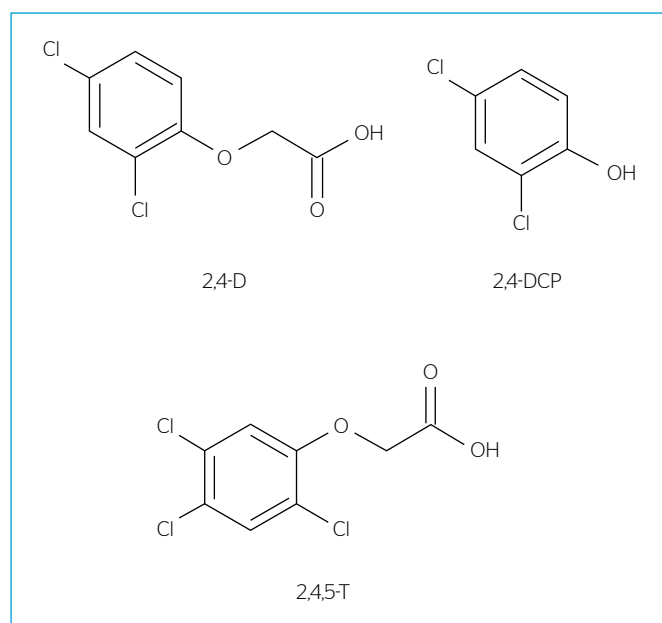


Figura 1 - Fórmula estrutural do 2,4-D, do 2,4-DCP e do 2,4,5-T.

quaternária de gradiente (LC-20AT), injetor automático de amostras (SIL-20AHT), detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M20A) e forno de coluna (CTO-20A). A coluna cromatográfica utilizada neste estudo foi a coluna analítica XTerra MS C18 (150 × 4,6 mm, 3,5 µm).

A fase móvel (FM) foi composta por uma solução de ACN e formiato de amônio 10,0 mM, acidificado com 0,10% de ácido fosfórico (ACN:NH₄COOH 47:53 v/v), com eluição isocrática, no fluxo de 1,2 mL min⁻¹. O volume de injeção de amostras para as análises foi de 50,0 µL, com temperatura de condicionamento da coluna de 30°C, e identificação e quantificação dos analitos em comprimentos de onda de 200 e 206 nm.

Todas as soluções preparadas para compor as FMs foram previamente filtradas em membrana de PTFE 0,45 µm (Millipore) e degaseificadas em banho de ultrassom (Limpsonic), por 15 minutos, sob vácuo.

Coleta e preparo de amostras

As soluções estoque dos analitos, 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T, foram preparadas individualmente em ACN na concentração 0,10 g.L⁻¹. A partir dessas soluções, foram preparadas as soluções padrão em água ultrapura para a validação do método.

Em amostras naturais, faz-se necessário a concentração e o isolamento do analito, além de eliminar possíveis interferentes da matriz. No presente trabalho, foi utilizada a extração em fase sólida (EFS).

Na EFS, volumes de 50 mL de cada amostra acidificada com ácido fosfórico (0,10%) foram passados por um sistema a vácuo para a concentração das amostras. As amostras foram percoladas em cartuchos C₁₈ (500 mg) da Agilent previamente condicionados com 10 mL de ACN e 10 mL de água ultrapura. Posteriormente, os cartuchos foram lavados com 5 mL de água ultrapura e o analito foi eluído em 1 mL de ACN. O eluído foi acrescido de 1 mL de água ultrapura e analisado em CLAE.

As amostras de água bruta e de água filtrada foram coletadas na estação de tratamento de água (ETA) de Carapina na Serra, Espírito Santo, cujo manancial abastecedor é o rio Santa Maria da Vitória, responsável pelo abastecimento público da região metropolitana de Vitória, Espírito Santo. As coletas foram realizadas semanalmente durante o mês de novembro de 2012. A caracterização físico-química foi realizada diariamente e é apresentada na Tabela 1. As amostras eram acondicionadas em bombonas de plástico de 20 L e encaminhadas ao Laboratório de Saneamento da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) para análise e permaneciam em ambiente refrigerado e sem exposição direta à luz. As amostras coletadas para realização da validação da metodologia eram mantidas em frascos âmbar a 4°C e filtradas em filtro de seringa PTFE Teflon 0,2 µm (M.Nagel) antes das análises cromatográficas.

Validação do método

Os parâmetros avaliados para a validação do método EFS-CLAE-DAD foram: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação, precisão, exatidão e robustez. Eles foram

determinados de acordo com a Resolução nº 899/2003 da Anvisa e recomendações da *Association of Official Analytical Chemistry* para análise de resíduos (ANVISA, 2003; AOAC, 1998; WOOD, 1999). O método foi desenvolvido por meio da otimização dos parâmetros seguindo as recomendações de Lanças (2012), e a etapa de EFS foi adaptada do método proposto por Faria (2004). Os dados foram processados utilizando o *software* LCSolutions (versão 2.1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação das condições cromatográficas

Para a seleção do comprimento de onda foram analisados os espectros de absorção na região do ultravioleta (UV) na faixa de 190 a 300 nm. No comprimento de onda de 200 nm, obteve-se máxima absorção para o 2,4-D e o 2,4-DCP, e em 206 nm foi obtida a máxima absorção de 2,4,5-T, conforme apresentado na Figura 2.

Foram testadas diferentes FMs com eluição isocrática (FM1, FM2, FM3, FM4) antes de chegar na FM do método. A primeira FM testada (FM1) foi a mistura de metanol e H₂O (50:50 v/v) acidificada com H₃PO₄ (0,10%) (FARIA, 2004), mas o resultado não foi eficiente, mesmo variando a concentração de metanol e o pH da solução. Para chegar à FM2 foram realizados vários testes variando a concentração de ACN, e o melhor resultado foi obtido utilizando ACN e H₂O (42:58 v/v) acidificada com H₃PO₄ (0,10%). Visando à otimização do método, foi testado o uso do tampão formiato de amônio na FM3, utilizando a mistura de metanol e 10 mM de formiato de amônio (50:50 v/v) acidificada com H₃PO₄ (0,10%); e na FM4, a FM era constituída de ACN e 10 mM de formiato de amônio (42:58 v/v) acidificada com H₃PO₄ (0,10%).

Tabela 1 - Caracterização das amostras de água.

Parâmetros (unidades)	Água do rio Santa Maria da Vitória	Água filtrada
	mínimo - máximo	mínimo - máximo
pH (adimensional)	7,3 - 7,6	6,3 - 7,1
Temperatura (°C)	21 - 25	20 - 23
Turbidez (uT)	231 - 370	0,19 - 0,57
Cor aparente (uH)	160 - 244	1 - 2
Cor real (uH)	16 - 23	nd
Alcalinidade (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	19 - 24	8,5 - 14,0
Condutividade (µS.cm ⁻²)	50 - 56	52 - 54
Absorbância UV (cm ⁻¹)	0,061 - 0,097	0,018 - 0,021
Cloro livre (mg.L ⁻¹)	-	0,12 - 1,05
COT (mg.L ⁻¹)	8,44 - 8,96	1,28 - 1,80
COD (mg.L ⁻¹)	7,10 - 8,50	-

UV: ultravioleta; COT: carbono orgânico total; COD: carbono orgânico dissolvido.

Foi avaliada também a variação na temperatura da coluna, o volume de injeção e o fluxo.

A FM otimizada foi composta por uma solução de ACN e formiato de amônio 10,0 mM acidificado com 0,10% de ácido fosfórico, ACN:10 mmol.L⁻¹ NH₄COOH (47:53 v/v), empregando eluição isocrática com volume de injeção de 50,0 µL da amostra com fluxo de 1,2 mL.min⁻¹ na temperatura de 30°C.

Os tempos de retenção (t_R) foram encontrados injetando soluções padrões (n=7) na concentração de 100 µg.L⁻¹, com os três analitos e com soluções individuais destes, no mesmo dia e em dias diferentes, com um coeficiente de variação (CV) menor que 5%. O t_R obtido foi de 3,92; 4,73 e 5,49 minutos para 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T, respectivamente.

Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de componentes que podem estar presentes na amostra de água natural, como impurezas. A seletividade do método foi determinada analisando

a possível presença de componentes que pudessem eluir no t_R dos analitos de interesse, interferindo nas análises. Dessa forma, foram analisadas três diferentes amostras do branco da matriz (n=3) e da matriz fortificada para verificar a possível presença de interferentes. O resultado foi comparado à amostra padrão e está apresentado na Figura 3. Na Figura 3A, é apresentado o cromatograma de uma amostra do branco da matriz-água do rio Santa Maria da Vitória, que demonstra a ausência de interferentes nos t_R dos analitos, indicando a seletividade da metodologia proposta. Na Figura 3B, tem-se o cromatograma obtido com a amostra de água do rio Santa Maria da Vitória fortificada com os três agrotóxicos em estudo; e na Figura 3C, observa-se o cromatograma da amostra padrão com a adição dos três compostos em água ultrapura. Em todas as amostras a concentração dos analitos foi de 100,0 µg.L⁻¹.

Linearidade

A linearidade do método foi determinada a partir das curvas analíticas obtidas pela injeção de soluções padrões (n=7) em 7 concentrações dos analitos — 20,0; 30,0; 50,0; 76,0; 100,0; 126,0; e 150,0 µg.L⁻¹ — em água

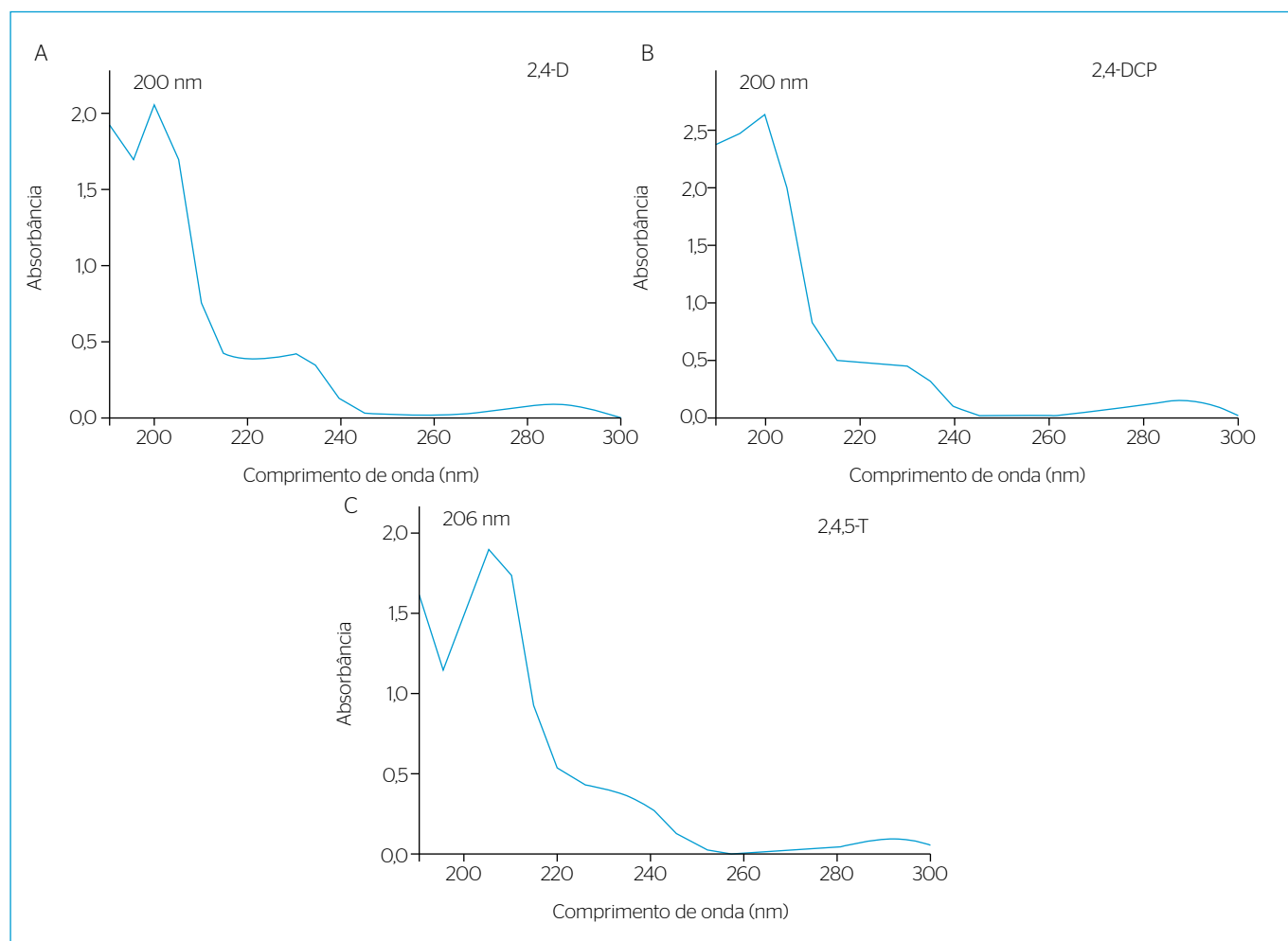


Figura 2 - Perfis cromatográficos de máxima absorção na região do ultravioleta dos analitos (A) 2,4-D; (B) 2,4-DCP e (C) 2,4,5-T determinados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.

ultrapura. A linearidade da resposta de detecção dos analitos pela técnica cromatográfica foi avaliada pela relação entre a concentração injetada e a área do pico de resposta. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Os resultados demonstraram a capacidade da técnica em correlacionar diretamente os valores da concentração dos analitos na amostra com a área do pico de resposta para todos os analitos avaliados. A resposta linear da técnica foi satisfatória, apresentando coeficientes de correlação (r) superiores a 0,99, estando de acordo com as normas exigidas pela Anvisa (2003).

Valores de coeficientes semelhantes também foram observados em diferentes estudos para determinação de 2,4-D e 2,4-DCP, utilizando técnica de CLAE. Em separações utilizando o sistema de detecção DAD, observou-se a linearidade no intervalo de concentração de 2,4-D de 40

a 140 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com (r) de 0,9984 (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007). Utilizando o sistema de detecção UV, observou-se a linearidade no intervalo de

Tabela 2 - Tempo de retenção, comprimento de onda, coeficiente de variação, equação da curva de calibração e coeficiente de correlação.

Analitos	t_r	λ (nm)	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	CV (%)	Dados da curva de calibração	
					Equação	r
2,4-D	3,9	200	20 a 150	1,3 - 5,1	$y=461,69x - 884$	0,9989
2,4-DCP	4,7	200	20 a 150	1,6 - 4,1	$y=629,06x - 2139$	0,9991
2,4,5-T	5,4	206	20 a 150	1,3 - 4,2	$y=425,05x - 1611$	0,9985

t_r : tempo de retenção; λ : comprimento de onda; CV: coeficiente de variação; r : coeficiente de correlação.

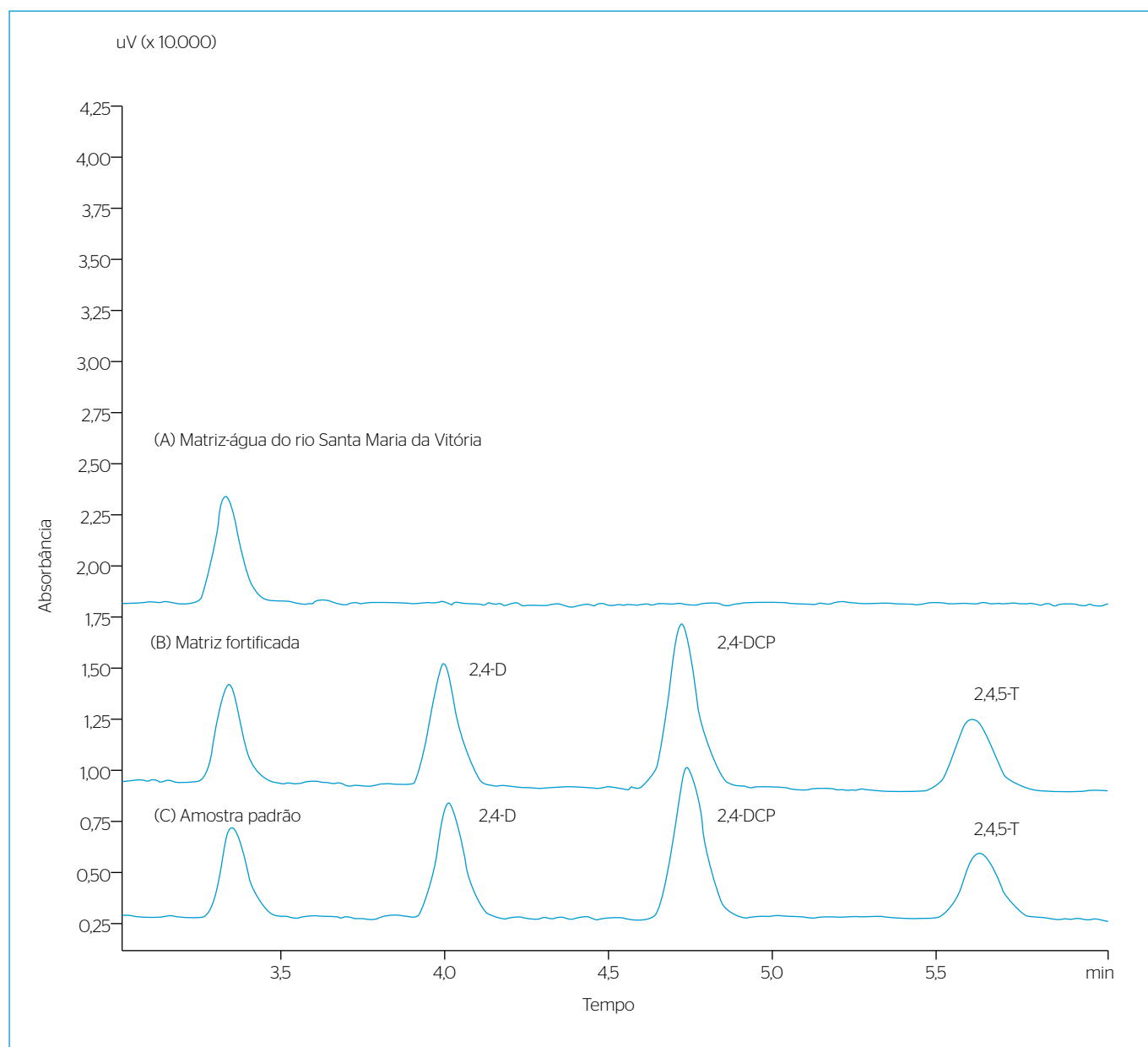


Figura 3 - Perfis cromatográficos (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos): (A) amostra do branco da matriz-água do rio Santa Maria da Vitória; (B) amostra da água do rio Santa Maria da Vitória fortificada com os analitos (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$); (C) amostra padrão (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

100 a 1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com (r) de 0,9989 para análise de 2,4-D (BRONDI & LANÇAS, 2005). Para a detecção de 2,4-DCP foi observado valor de (r) de 0,9982, para o intervalo de concentração de 2.000 a 10.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MACEDO NETO; FROEHNER; MACHADO, 2012), e de 0,9905, para linearidade de 100 a 10.500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (LOPES *et al.*, 2011).

Precisão e exatidão

Precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes e repetidos, de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas; e pode ser avaliada pelo CV (RIBANI *et al.*, 2004, ANVISA, 2003). A precisão do método foi avaliada por meio da repetitividade, em ensaios realizados no mesmo dia, das soluções preparadas em triplicata e em três níveis de fortificação — 1,0, 3,0 e 5,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ —, expressa por meio do CV, em água natural, conforme recomendações da Anvisa (ANVISA, 2003).

A exatidão do método foi avaliada por meio da EFS e medida pelas respectivas porcentagens de recuperação. O teste de recuperação foi realizado pela adição dos analitos em amostras de água filtrada da ETA e água bruta do rio Santa Maria da Vitória. Volumes de 50 mL da amostra de água foram coletados e fortificados com os analitos na concentração final de 1,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com análises em triplicata. Em seguida, foram concentrados em cartuchos de extração tipo C_{18} e analisados no sistema cromatográfico. As porcentagens de recuperação obtidas variaram entre 85 e 119% e a repetibilidade, expressa em CV, foi inferior a 12%, conforme apresentado na Tabela 3.

Esses resultados são considerados satisfatórios para análise de resíduos de agrotóxicos, cujo intervalo de recuperações entre 70 e 120% com precisão de até 20% é aceitável (AOAC, 1998; RIBANI *et al.*, 2004; WOOD, 1999). Estudos que avaliaram a recuperação de 2,4-D apresentaram valores que variaram entre 73 e 111% (MACEDO NETO; FROEHNER; MACHADO, 2012; LOPES *et al.*, 2011), com CV de até 11% (BRONDI & LANÇAS, 2005). Para o 2,4-DCP foi encontrado valores entre 73 e 88% de recuperação, com CV de 5% (LOPES *et al.*, 2011).

As porcentagens de recuperação obtidas demonstraram que o método está de acordo com o estabelecido pela Anvisa (ANVISA, 2003), que determina que as porcentagens de recuperação próximas de 100% são desejáveis, porém se admite valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

Limite de detecção e limite de quantificação

O LD e o LQ do método, EFS-CLAE-DAD, foram determinados a partir de soluções nas concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dos analitos de estudo. O LD foi calculado a partir dos parâmetros de três curvas de calibração construídas para cada nível de concentração. O LQ foi atribuído às menores concentrações dos analitos presentes nas soluções que puderam ser determinados com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, com CV dos picos medidos, inferiores

a 12% (ANVISA, 2003). Os valores de LD variam entre 0,17 e 0,51 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e o LQ obtido foi de 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, o que pode ser observado na Tabela 4.

A metodologia analítica para separação de agrotóxicos utilizando a técnica de CLAE com detector UV apresentou LD de 25,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e LQ de 85,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o 2,4-D (BRONDI & LANÇAS, 2005). O sistema de separação com o uso do DAD apresentou valores de LD de 0,02 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e de LQ de 0,07 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o herbicida 2,4-D (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007). Para o 2,4-DCP, os valores encontrados foram de 22,0 e 92,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para LD e LQ, respectivamente (OPEOLU; FATOKI; ODENDAAL, 2010). LD de 0,072 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e LQ de 0,22 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o 2,4-D e LD de 0,083 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e LQ de 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o 2,4-DCP também foram apresentados quando da utilização de CLAE/UV (LOPES *et al.*, 2011). Os valores de LD e LQ apresentados na Tabela 4 foram considerados satisfatórios para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de água natural, atendendo aos limites determinados pela legislação brasileira para presença de 2,4-D+2,4,5-T (30 $\mu\text{g.L}^{-1}$) em amostras de águas para abastecimento público.

Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade apresentada com pequenas variações dos parâmetros. Diz-se que um método é robusto

Tabela 3 - Exatidão (% recuperação) e repetibilidade (% CV) do método analítico em amostras de água filtrada e água bruta do rio Santa Maria da Vitória.

Analitos	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Água filtrada		Água do rio Santa Maria da Vitória	
		Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
2,4-D	1,0	85	4,3	97	3,3
	3,0	98	8,1	105	7,0
	5,0	101	0,9	102	3,4
2,4-DCP	1,0	93	5,4	119	4,6
	3,0	88	1,5	110	3,6
	5,0	110	2,1	108	2,4
2,4,5-T	1,0	110	5,8	109	1,4
	3,0	101	2,5	114	11,4
	5,0	109	3,0	107	2,4

CV: coeficiente de variação.

Tabela 4 - Limite de detecção e limite de quantificação dos analitos.

Analitos	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
	Água filtrada		Água do rio Santa Maria da Vitória	
2,4-D	0,17	1,00	0,42	1,00
2,4-DCP	0,28	1,00	0,20	1,00
2,4,5-T	0,28	1,00	0,51	1,00

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

quando não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, o pH e a temperatura (RIBANI *et al.*, 2004). A robustez do método foi avaliada por meio dos resultados obtidos de pequenas variações nas temperaturas de acondicionamento da coluna (30, 33 e 36°C), no fluxo da FM (0,80, 1,00 e 1,20 mL.min⁻¹), na composição da fase orgânica (45,0, 47,0 e 49,0% ACN) e na adição de ácido fosfórico na FM aquosa (0,05, 0,10 e 0,20% — v/v) em água ultrapura na concentração de 100,0 µg.L⁻¹. Os resultados demonstraram a robustez da técnica, e os perfis dos cromatogramas são apresentados na Figura 4.

Em relação à variação do fluxo, não foi observada variação na intensidade dos picos dos compostos, apenas variações no t_R dos analitos (Figura 4A), assim como na variação da porcentagem da fase orgânica (Figura 4B). Com base nos resultados, verificou-se que o método apresentou robustez com concentrações de ácido acético no intervalo de 0,05 a 2,0% (Figura 4C), pois nessa faixa de concentração não ocorreram diferenças significativas nas resoluções cromatográficas. Sem a adição do ácido fosfórico, os compostos 2,4-D e 2,4,5-T não foram detectados por serem compostos ionizáveis e pouco retidos em fase reversa. Nesse caso, o ideal é trabalhar com pH abaixo do pKa da substância, condição obtida com adição do ácido fosfórico, pois o pH influencia na ionização de ácidos, aumentando a retenção em fase

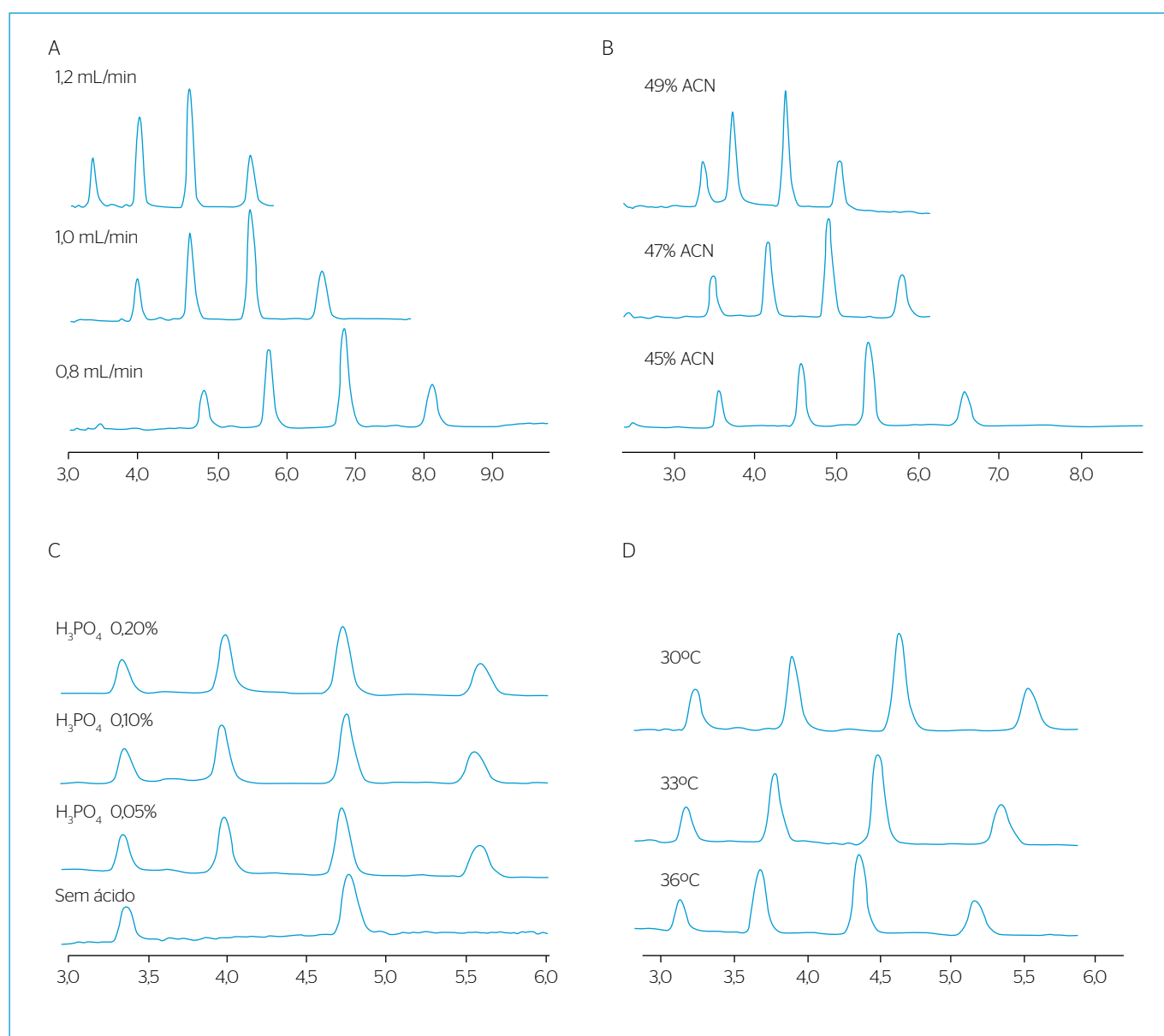


Figura 4 - Perfis cromatográficos referentes aos padrões de 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T em água ultrapura na concentração de 100,0 µg.L⁻¹. (A) Diferentes fluxos; (B) diferentes concentrações de acetonitrila; (C) diferentes concentrações de ácido fosfórico adicionado à fase móvel aquosa (v/v); (D) diferentes temperaturas de acondicionamento da coluna.

reversa (LANÇAS, 2009; BAGGIANI *et al.*, 2000). A resolução cromatográfica obtida com a FM contendo H_3PO_4 0,10% (pH 2,0±0,10) foi definida como condição ótima para os demais ensaios cromatográficos. Em relação à variação da temperatura de acondicionamento da coluna, as resoluções cromatográficas entre os analitos não apresentaram diferenças, além de pequenas variações nos t_R (Figura 4D), mostrando-se robusto.

A técnica cromatográfica se mostrou simples, rápida e satisfatória para a análise simultânea de 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T em amostras ambientais de água, podendo ser aplicada no controle e no monitoramento de mananciais e ETAs.

CONCLUSÕES

O método de análise de agrotóxicos em água utilizando EFS e CLAE-DAD demonstrou seletividade, linearidade ($r \geq 0,997$), precisão ($CV \leq 12\%$) e exatidão $\geq 85\%$ para separar e quantificar simultaneamente os compostos 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T em água filtrada e água de manancial superficial. Os valores de LD entre 0,17 e 0,51 $\mu g.L^{-1}$ e de LQ de 1,0 $\mu g.L^{-1}$ atendem aos limites estabelecidos pela Portaria MS nº 2.914/2011. Portanto, o método apresentado pode ser utilizado para a detecção e a quantificação concomitante de 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T em águas de abastecimento público e no controle e no monitoramento ambiental, atendendo os limites estabelecidos nas legislações brasileiras.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). (2003) Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a Publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". *Diário Oficial da União*, Brasília.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). (1998) *Peer verified method program: manual on policies and procedures*. Arlington: AOAC. 35 p.
- AULAKH, J.S.; MALIK, A.K.; KAUR, V.; SCHMITT-KOPPLIN, P. (2005) A Review on Solid Phase Micro Extraction – High Performance Liquid Chromatography (SPMEHPLC) Analysis of Pesticides. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 35, n. 1, p. 71-85. <https://doi.org/10.1080/10408340590947952>
- AZEVEDO, D.A.; GERCHON, E.; REIS, E.O. (2004) Monitoring of Pesticides and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water from Paraíba do Sul River, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, p. 299. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532004000200021>
- BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; ANFOSSI, L.; TOZZI, C. (2001) Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, v. 938, p. 35-44.
- BAGGIANI, C.; GIRAUDI, G.; GIOVANNOLI, G.; TROTTA, F.; VANNI, A.J. (2000) Chromatographic characterization of molecularly imprinted polymers binding the herbicide 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. *Journal of Chromatography A*, v. 883, p. 119-126.
- BRASIL. Ministério da Saúde. (2011) Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da União*, Brasília.
- BRONDI, S.H.G.; LANÇAS, F.M. (2005) Development and validation of a multi-residue analytical methodology to determine the presence of selected pesticides in water through liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, p. 650-653. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532005000400026>
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS (CCE). (2001) *Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos: substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais*. Bruxelas: COM 706. 49 p.
- D'ARCHIVIO, A.A.; FANELLI, M.F.; MAZZEO, P.; RUGGIERI, F. (2007) Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta*, v. 71, p. 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.016>
- DE ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; ANTUNES, P.M.; DOS SANTOS, M.A.P.F.; DE CAMARGO, P.B.; ABAKERLI, R.B. (2007) Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. *Química Nova*, v. 30, p. 1119-1127. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000500013>
- DORES, E.F.G.C.; NAVICKIENE, S.; CUNHA, M.L.F.; CARBO, L.; RIBEIRO, M.L.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. (2006) Multiresidue Determination of Herbicides in Environmental Waters from Primavera do Leste Region (Middle West of Brazil) by SPE-GC-NPD. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, p. 866-873. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532006000500008>
- FARIA, L.J.S. (2004) *Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia*. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 79 p.
- FUKUYAMA, T.; TAJIMA, Y.; UEDA, H.; HAYASHI, K.; SHUTOH, Y.; HARADA, T.; KOSAKA, T. (2009) Allergic reaction induced by dermal and/or respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides. *Toxicology*, v. 261, p. 152-161. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.05.014>
- GOODMAN, J.E.; LOFTUS, C.T.; ZU, K. (2017) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and non-Hodgkin's lymphoma: results from the Agricultural Health Study and an updated meta-analysis. *Annals of Epidemiology*, v. 27, p. 290-292. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2017.01.008>

LANÇAS, F.M. (2009) *Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE*. Campinas: Átomo. 382 p.

_____. (2012) *Disciplina: como desenvolver e otimizar um método em HPLC (teoria e prática)*. São Carlos: Instituto Internacional de Cromatografia.

LOOMIS, D.; GUYTON, K.; GROSSE, Y.; GHISSASI, F.E.; BOUVARD, V.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; MATTOCK, H.; STRAIF, K.; AGÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISAS DO CÂNCER (IARC). (2015) Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *The Lancet Oncology*, v. 16, p. 891-892. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00081-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00081-9)

LOPES, M.N.T.; TOLEDO NETTO, P.; LOURENCETTI, C.; MARCHI, M.R.R.; RIBEIRO, M.L. (2011) Validação e aplicação de método para análise de pesticidas em água para consumo humano de Dourados (MS) por CLAE/UV e CG/DTE. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 21, p. 103-116. <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v21i0.25914>

MACEDO NETO, D.; FROEHNER, S.; MACHADO, K.S. (2012) Avaliação do transporte do ácido 2,4-diclorofenoxiacético através de um lisímetro. *Química Nova*, v. 35, p. 1809-1813. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000900020>

MARCHESAN, E.; SARTORI, G.M.S.; AVILA, L.A.D.; MACHADO, S.L.D.O.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E.G.; MACEDO, V.R.M.; MARCHEZAN, M.G. (2010) Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, p. 1053-1059. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000078>

MCKNIGHT, U.S.; RASMUSSEN, J.J.; KRONVANG, B.; BINNING, P.J.; BJERG, P.L. (2015) Sources, occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. *Environmental Pollution*, v. 200, p. 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.02.015>

NAM, S.; JO, B.; YOON, Y.; ZOH, K.D. (2014) Occurrence and removal of selected micropollutants in a water treatment plant. *Chemosphere*, v. 95, p. 156-165. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.055>

NJOKU, V.O.; HAMEED, B.H. (2011) Preparation and characterization of activated carbon from corncob by chemical activation with H_3PO_4 for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid adsorption. *Chemical Engineering Journal*, v. 173, p. 391-399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.075>

NJOKU, V.O.; ISLAM, A.; ASIF, M.; HAMEED, B.H. (2015) Adsorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by mesoporous activated carbon prepared from H_3PO_4 activated langsat empty fruit bunch. *Journal of Environmental Management*, v. 154, p. 138-144. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.02.002>

OPEOLU, B.O.; FATOKI, O.S.; ODENDAAL, J. (2010) Development of a solid-phase extraction method followed by HPLC-UV detection for the determination of phenols in water. *International Journal of the Physical Sciences*, v. 5, p. 576-581.

PRIMEL, E.G.; ZANELLA, R.; KURZ, M.H.S.; GONÇALVES, F.F.; MACHADO, S.O.M.; MARCHEZAN, E. (2005) Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. *Química Nova*, v. 28, p. 605-609. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000400010>

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>

RIBEIRO, A.C.A.; DORES, E.F.G.C.; AMORIM, R.S.S.; LOURENCETTI, C. (2013) Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. *Química Nova*, v. 36, p. 284-290. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000200015>

RISSATO, S.R.; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS, G.P.; GERENUTTI, M. (2004) Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). *Química Nova*, v. 27, p. 739-743. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500012>

SALVAGNI, J.; TERNUS, R.Z.; FUENTEFRÍA, A.M. (2011) Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the country side of Santa Catarina State, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 34, p. 122-126. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572010005000104>

SMITH, A.M.; SMITH, M.T.; LA MERRILL, M.A.; LIAW, J.; STEINMAUS, C. (2017) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and risk of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis accounting for exposure levels. *Annals of Epidemiology*, v. 27, p. 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2017.03.003>

SOUZA, F.L.; SÁEZ, C.; LANZA, M.R.V.; CAÑIZARES, P.; RODRIGO, M.A. (2017) Removal of chlorsulfuron and 2,4-D from spiked soil using reversible electrokinetic adsorption barriers. *Separation and Purification Technology*, v. 178, p. 147-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.030>

TU, M.; HURD, C.; RANDALL, J.M. (2001) *Weed control methods handbook: tools & techniques for use in natural areas*. Logan: Utah State University, U.S. Government Documents. 220 p.

WANG, Y.R.; CHU, W. (2011) Degradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a novel Electro-Fe(II)/Oxone process using iron sheet as the sacrificial anode. *Water Research*, v. 45, p. 3883-3889. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.034>

WOOD, R. (1999) How to validate analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 18, p. 624-632.

XI, Y.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R. (2010) Adsorption of the herbicide 2,4-D on organo-palygorskite. *Applied Clay Science*, v. 49, p. 255-261.