

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

Lucas Victor Pereira de Freitas

Metodologias para determinação e avaliação da estabilidade do 2,4-D em amostras de água

Montes Claros

2020

Lucas Victor Pereira de Freitas

Metodologias para determinação e avaliação da estabilidade do 2,4-D em amostras de água

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Gevany Paulino de Pinho

Montes Claros

Março de 2020

Freitas, Lucas Victor Pereira de.

F866m Metodologias para determinação e avaliação da estabilidade do 2,4-D
2020 em amostras de água / Lucas Victor Pereira de Freitas. Montes Claros,
2020.
70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Área de concentração em Produção Vegetal,
Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério.

Banca examinadora: Prof. Dr. Douglas Lopes Cassimiro, Prof. Dr. Paulo
Henrique Fidêncio, Prof. Dr. Vico Mendes Pereira Lima.

Inclui referências: f. 27-40, 66-69.

1. Herbicidas. 2. Resíduos herbicidas. 3. Produtos químicos agrícolas.
I. Silvério, Flaviano Oliveira (Orientador). II. Universidade Federal de
Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 632.9



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 06 dias do mês de março de 2020, às 08:00 horas, sob a Presidência do Professor Flaviano Oliveira Silvério, D. Sc. (Orientador /ICA-UFMG) e com a participação dos Professores Douglas Lopes Cassimiro, D. Sc. (Unimontes), Vico Mendes Pereira Lima, D. Sc. (IFNMG-Campus Almenara), Paulo Henrique Fidêncio, D. Sc. (UFVJM), Lázaro Chaves Sicupira, D. Sc. (Suplente / IECT-UFVJM) e Giovana Ribeiro Ferreira, D. Sc. (Suplente / IECT-UFVJM), reuniu-se a Banca de defesa de dissertação de **LUCAS VICTOR PEREIRA DE FREITAS**, aluno do Curso de Mestrado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de dissertação intitulada:

“Metodologias para determinação e avaliação da estabilidade do 2,4-D em amostras de água”

sendo o aluno considerado (aprovado/reprovado) aprovado. E, para constar, eu, Professor Flaviano Oliveira Silvério, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 68 do regulamento do Curso de Mestrado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

Art. 68 Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, no mínimo 3 (três) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação ou, 4 (quatro) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da tese, no prazo de 60 (sessenta) dias.

Montes Claros, 06 de março de 2020.

Flaviano Oliveira Silvério
Orientador

Douglas Lopes Cassimiro
Membro

Vico Mendes Pereira Lima
Membro

Paulo Henrique Fidêncio
Membro

Lázaro Chaves Sicupira
Suplente

Giovana Ribeiro Ferreira
Suplente

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Cida e Gilberto,
por todo o incentivo, compreensão, exemplo de vida e
amor incondicional.*

Agradecimento

Agradeço, primeiramente, a Deus, por se fazer presente em minha vida em todos os momentos. Por ter me dado forças, saúde, sabedoria e por ter me capacitado dia após dia.

Agradeço aos meus pais, Cida e Gilberto, por serem minha base, meus exemplos e principais incentivadores. Muito obrigado pela compreensão e por serem apoiadores de todos os meus sonhos!

Agradeço aos meus orientadores, professor Dr. Flaviano Silvério e professora Dr.^a Gevany Pinho, por essa oportunidade de concretizar um sonho. Muito obrigado pelos ensinamentos, incentivos e conselhos. Agradeço pela confiança e me sinto honrado por ter sido orientado por pesquisadores tão competentes.

A todos os amigos do Laboratório de Pesquisas em Agroquímica (LPA), pela convivência, ensinamentos e amizade. Em especial, agradeço ao Lázaro Sicupira pelos conselhos, aprendizados e parceria no planejamento e desenvolvimento de todas as etapas desse estudo.

Agradeço aos meus irmãos, Alef, Bruna e Filipe, e demais familiares por todo o apoio e orações. À minha sobrinha, Maria Cecília, pelos momentos de alegria em meio às preocupações.

Aos meus amigos, por todos os conselhos, auxílio, motivação, torcida, e todos os momentos compartilhados. Vocês contribuíram demais nessa etapa!

Agradeço ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA-UFMG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela estrutura física, bolsa e recursos financeiros, que foram indispensáveis para realização desse mestrado. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Enfim... meu muito obrigado a todos que, de alguma forma, estiveram envolvidos no desenvolvimento desse estudo.

“Pois eu bem sei os planos que estou projetando para vós, diz o Senhor; planos de paz, e não de mal, para vos dar um futuro e uma esperança”.

(Jeremias 29:11)

METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO 2,4-D EM AMOSTRAS DE ÁGUA

RESUMO

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é amplamente empregado no controle de plantas daninhas em culturas de arroz, café, cana-de-açúcar, eucalipto, milho, pastagem, soja, trigo, dentre outras. Entretanto, esse pesticida pode provocar a contaminação de fontes de água, gerando problemas ambientais e de saúde pública. Por isso, é desejável o desenvolvimento de novas metodologias para extração desse composto em amostra de água. Este estudo objetivou otimizar e validar a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe* (QuEChERS) para a determinação e a avaliação da estabilidade do 2,4-D em amostras de água por cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). As porcentagens de recuperação foram próximas a $100\pm 3\%$, e os limites de quantificação (LQ) foram 2,00 e 3,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ELL-PBT e QuEChERS, respectivamente, sendo inferiores ao limite máximo de resíduo estabelecido pelas legislações brasileiras e internacionais. As metodologias foram seletivas, precisas, exatas, sem efeito de matriz e lineares na faixa de 2,00-26,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 3,10-40,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ELL-PBT e QuEChERS, respectivamente. Por isso, representam alternativas acessíveis e eficientes para o monitoramento do 2,4-D em água. A partir de análise comparativa, verificamos que a ELL-PBT apresentou menor quantidade de etapas, menor consumo de sais e amostra e menor valor de LQ, em relação ao método QuEChERS. A aplicação das metodologias em amostras reais não revelou nenhum episódio de contaminação ambiental pelo 2,4-D. Esse resultado pode estar associado a realmente não ter esse composto nas amostras ou os níveis de concentração estarem inferiores ao LQ da metodologia. Além disso, esse herbicida pode ter sido degradado nas amostras, pois, através do experimento de estabilidade, verificamos que, após 60 dias em condições ambientais, a concentração do 2,4-D nessa matriz não pode ser quantificada pela ELL-PBT acoplada à HPLC-DAD.

Palavras-chave: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; herbicida; ELL-PBT; QuEChERS; HPLC-DAD; validação.

METHODOLOGIES FOR DETERMINATION AND EVALUATION OF THE STABILITY OF 2,4-D IN WATER SAMPLES

ABSTRACT

The 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is widely used to weeds control in rice, coffee, sugar cane, eucalyptus, millet, corn, pasture, soy, wheat, among other crops. However, this pesticide may cause contamination of water resources, and generate environmental and public health problems. Therefore, it is desirable to develop new extraction methodologies for this compound in water samples. This study aimed to optimize and validate liquid-liquid extraction with low temperature partition (LLE-LTP) and Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) for determination and evaluation of 2,4-D stability in water samples by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). The recovery percentages of the two methodologies were close to $100\pm 3\%$, and the limits of quantification (LOQ) were 2.00 and 3.10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for LLE-LTP and QuEChERS, respectively, being below the maximum residue limit established by Brazilian and international legislations. The methodologies were selective, precise, accurate, without matrix effect, and presented linearity from 2.00 - 26.0 and 3.10 - 40.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ for LLE-LTP and QuEChERS, respectively. Therefore, they represent accessible and efficient alternatives for monitoring 2,4-D in water samples. From the comparative analysis, we found that the LLE-LTP had less number of steps, less consumption of salts and sample and lower LOQ, compared to the QuEChERS method. The real samples did not reveal any environmental contamination episodes by 2,4-D. This result may be associated with the absence of 2,4-D in the samples, or concentration levels are below the LOQ. Furthermore, this herbicide may have been degraded in the samples, because we found that after 60 days, in environmental conditions, the concentration of 2,4-D in this matrix cannot be quantified by LLE-LTP coupled to HPLC-DAD.

Keywords: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; herbicide; LLE-LTP; QuEChERS; HPLC-DAD; validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

3 REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Dados dos dez países que mais utilizaram pesticidas no mundo, período de 2007 e 2017..... 15

4 ARTIGO

4.1 Otimização e Validação das Metodologias ELL-PBT e QuEChERS para a Determinação de 2,4-D em Amostras de Água

Figura 1. Espectro de absorção na região ultravioleta da solução padrão de 2,4-D em acetonitrila na concentração de 1,00 mg L⁻¹..... 50

Figura 2. Cromatogramas da solução padrão de 2,4-D em acetonitrila na concentração de 1,00 mg L⁻¹ nos comprimentos de onda de (a) 200 nm, (b) 228 nm e (c) 284 nm..... 50

Figura 3. Cromatogramas da solução padrão de 2,4-D em acetonitrila na concentração de 1,00 mg L⁻¹, obtidos por HPLC-DAD empregando fase móvel composta por acetonitrila e água com pH = 3,00 ajustado com H₃PO₄ nas proporções de (a) 95/05, (b) 85/15, (c) 75/25, (d) 65/35 e (e) 55/45 (v/v)..... 51

Figura 4. Cromatogramas da solução padrão de 2,4-D em acetonitrila na concentração de 1,00 mg L⁻¹, obtidos por HPLC-DAD empregando fluxo de (a) 1,0 mL min⁻¹, (b) 0,80 mL min⁻¹ e (c) 0,50 mL min⁻¹.... 52

Figura 5. Cromatograma da solução padrão do 2,4-D em acetonitrila na concentração de 1,00 mg L⁻¹. 53

Figura 6. Porcentagens de recuperação do 2,4-D na otimização da metodologia ELL-PBT. 53

Figura 7. Cromatogramas do extrato fortificado com 2,4-D na concentração de 250 µg L⁻¹ na extração pela metodologia ELL-PBT, empregando a fase extratora composta por (a) acetonitrila 8,00 mL, (b) acetonitrila/acetato de etila 6,50/1,50 mL (v/v) e (c) acetonitrila com ácido acético 1% (v/v) 8,00 mL. 55

Figura 8. Porcentagens de recuperação do 2,4-D na otimização da metodologia QuEChERS..... 56

Figura 9. Cromatogramas do extrato fortificado com 2,4-D na concentração de 250 µg L⁻¹ na extração pela metodologia QuEChERS, empregando a fase extratora composta por (a) acetonitrila 5,00 mL, (b) acetonitrila com ácido acético 1% (v/v) 5,00 mL (v/v) e (c) acetonitrila/acetato de etila 4,00/1,00 mL. 57

Figura 10. Cromatogramas da matriz isenta do composto (a) e da matriz fortificada com o 2,4-D na concentração de 250 µg L⁻¹ (b) na ELL-PBT e cromatogramas da matriz isenta do composto (c) e da matriz fortificada com o 2,4-D na concentração de 250 µg L⁻¹ (d) na metodologia QuEChERS..... 58

Figura 11. Teste residual de Jackknife, com exclusão dos valores extremos, para as metodologias (a) ELL-PBT e (b) QuEChERS..... 60

Figura 12. Normalidade dos resíduos de regressão pelo teste Ryan-Joiner para as metodologias (a) ELL-PBT e (b) QuEChERS 61

Figura 13. Independência dos resíduos de regressão pelo teste de Durbin e Watson para as metodologias (a) ELL-PBT e (b) QuEChERS.....	61
Figura 14. Curvas analíticas obtidas das soluções de 2,4-D em (a) solvente acetonitrila e em (b) extratos da matriz pela metodologia ELL-PBT. Curvas analíticas obtidas das soluções de 2,4-D em (c) solvente acetonitrila e em (d) extratos da matriz pela metodologia QuEChERS.....	62
Figura 15. Concentração média do 2,4-D nas amostras de (a) água purificada e (b) subterrânea, em intervalos de 5 em 5 dias.....	66

LISTA DE TABELAS

3 REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Culturas em que o 2,4-D pode ser empregado e respectivo LMR.....	17
Tabela 2 – Estrutura química da molécula do 2,4-D e suas informações físico-químicas	18
Tabela 3 - Concentração do 2,4-D em diferentes fontes de água	19
Tabela 4 - Metodologias para extração e quantificação do 2,4-D em amostras de água	21
Tabela 5 – Aplicações da cromatografia em fase líquida para análise do 2,4-D.....	26

4 ARTIGO

4.1 Otimização e Validação das Metodologias ELL-PBT e QuEChERS para a Determinação de 2,4-D em Amostras de Água

Tabela 1. Parâmetros otimizados na análise cromatográfica do 2,4-D.....	46
Tabela 2. Resultados da validação da metodologia ELL-PBT.....	59
Tabela 3. Resultados da validação da metodologia QuEChERS.....	59
Tabela 4. Análise comparativa entre as metodologias ELL-PBT, QuEChERS, metodologias tradicionais e metodologias alternativas para preparo de uma única amostra.....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Pesticidas	15
3.2 Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético	16
3.3 Presença do 2,4-D em fontes de água.....	18
3.4 Riscos do 2,4-D e legislações aplicáveis	19
3.5 Metodologias para determinação do 2,4-D em amostras de água	20
3.5.1 ELL-PBT	22
3.5.2 QuEChERS	23
3.5.3 Técnicas de análise do 2,4-D.....	24
3.6 Referências	27
4 ARTIGO	41
4.1 Otimização e Validação das Metodologias ELL-PBT e QuEChERS para a Determinação de 2,4-D em Amostras de Água	42
Introdução.....	45
Experimental.....	46
Resultados e Discussão	49
Conclusão.....	66
Referências	67
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71

1 INTRODUÇÃO

A utilização de pesticidas é considerada uma das principais técnicas agrícolas empregadas em todo o mundo, a fim de aumentar a quantidade e a qualidade dos produtos e culturas (BRONDI; LANÇAS, 2005; RAKS; TURCHIN; ZAITSEV, 2015). Segundo dados divulgados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), em 2018 a comercialização de pesticidas no Brasil foi de, aproximadamente, 549 mil toneladas de ingrediente ativo. Desse total, 48.921 toneladas foram do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), se consolidando como o segundo pesticida mais comercializado no país desde o ano de 2013, ficando atrás apenas do herbicida glifosato (IBAMA, 2019).

O 2,4-D é amplamente empregado como herbicida para o controle de plantas daninhas de folha larga, devido ao seu reduzido custo, eficiência e amplo espectro de controle (JAAFARZADEH; GHANBARI; AHMADI, 2017; ISLAM *et al.*, 2018).

Esse composto apresenta elevada solubilidade em água e é fracamente retido pelos solos (NJOKU *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2017). Por isso, a contaminação de fontes de água pelo 2,4-D tem sido relatada em todo o mundo, podendo representar riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

Por essa razão, pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de metodologias para extração e quantificação do 2,4-D em água são altamente desejáveis. As metodologias de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe* (QuEChERS) representam alternativas promissoras para a extração de pesticidas em amostras aquosas, pois apresentam vantagens como a purificação dos extratos, o baixo consumo de solventes e o reduzido número de etapas (ARAÚJO *et al.* 2016; GARCIA; GOTAH, 2017).

Portanto, o objetivo deste estudo foi otimizar e validar as metodologias ELL-PBT e QuEChERS acopladas à cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) para a determinação do 2,4-D em amostras de água e avaliar a estabilidade desse composto nessa matriz. Cabe destacar que esse estudo é pioneiro, pois, até o momento, não foram encontrados, na literatura científica, estudos empregando essas metodologias com esse objetivo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimizar e validar as metodologias de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe* (QuEChERS), acopladas à cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), para a determinação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em amostras de água.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de análise do 2,4-D por HPLC-DAD;
- Otimizar as metodologias ELL-PBT e QuEChERS;
- Validar as metodologias ELL-PBT e QuEChERS em termos de seletividade, limite de quantificação, precisão, exatidão, linearidade e efeito de matriz;
- Realizar a análise comparativa entre as metodologias estudadas, metodologias tradicionais e metodologias alternativas;
- Aplicar as metodologias otimizadas e validadas em amostras reais de águas superficiais e subterrâneas, coletadas no município de Turmalina–MG;
- Avaliar a estabilidade do 2,4-D, sob condições ambientais, em amostras de água purificada e subterrânea.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pesticidas

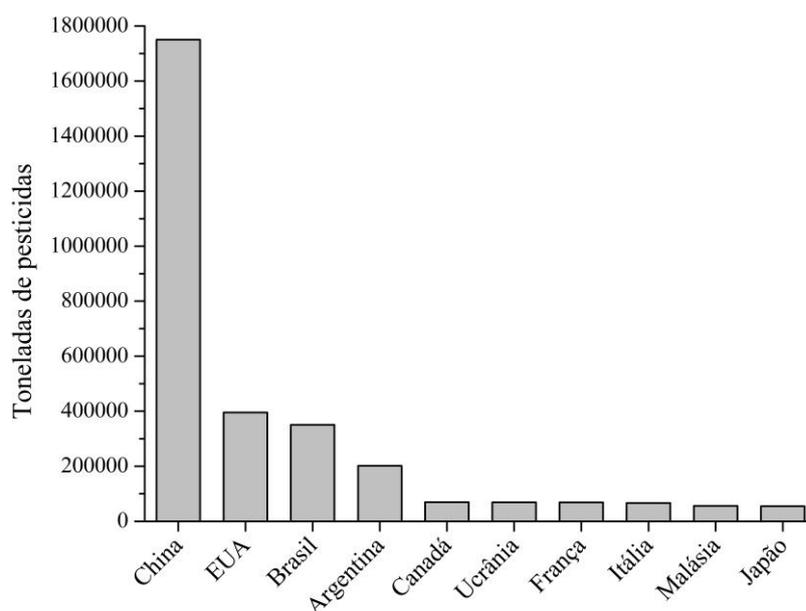
O crescimento populacional aliado à alta demanda por alimentos, consolidou o uso de pesticidas como uma das principais técnicas agrícolas empregadas em todo o mundo, a fim de aumentar a quantidade e a qualidade dos produtos e culturas (BRONDI; LANÇAS, 2005; RAKS; TURCHIN; ZAITSEV, 2015; CAI *et al.*, 2018). Estes são amplamente utilizados na agricultura para controlar e prevenir pragas e doenças (HERO, 2017), sendo usados antes e depois da colheita para proteger as lavouras (QUIJANO *et al.*, 2016).

Os pesticidas constituem um grupo extremamente heterogêneo de compostos químicos que são usados extensivamente para diversos fins, como inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, nematocidas e fumigantes, na agricultura, horticultura e cultivo de hortaliças (SHARMA *et al.*, 2018).

Dados divulgados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) indicam que em 2018 a comercialização¹ de pesticidas no Brasil foi de, aproximadamente, 549 mil toneladas de ingrediente ativo (IBAMA, 2019).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, do inglês “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*”) apresenta dados sobre o uso agrícola de pesticidas em todo o mundo (FAO, 2019). A Figura 1 apresenta os dez países que mais utilizaram pesticida entre 2007 e 2017 e média anual de uso, segundo os dados atualizados pela agência.

Figura 1 - Dados dos dez países que mais utilizaram pesticidas no mundo, período entre 2007 e 2017



EUA = Estados Unidos da América

Fonte: Adaptado de FAO, 2019.

¹ Corresponde à produção, importação, exportação e vendas de pesticidas, componentes e afins no Brasil. Tem como base os dados declarados pelas empresas titulares de registro desses produtos, conforme exigência do art. 41 do Decreto nº 4.074, de 4/1/2002 (IBAMA, 2019).

Como pode ser observado na Figura 1, o Brasil ocupou o terceiro lugar no ranking de países que mais utilizaram os pesticidas na agricultura entre 2007 e 2017, com média de, aproximadamente, 350.000 toneladas de ingrediente ativo por ano. China, em primeiro, e Estados Unidos, em segundo, foram os países que mais utilizaram pesticidas, com média anual de 1.750.288 e 395.491 toneladas, respectivamente (FAO, 2019).

Conforme discutido por Prestes *et al.* (2009), as perdas anuais devido à ação de pragas na agricultura em todo o mundo chegam a 1 bilhão de toneladas, correspondendo a uma redução de 20 a 30% na produção. Um componente importante dos custos de produção é o manejo das plantas daninhas, que reduzem o rendimento da colheita ou até destroem as culturas (COSTA *et al.*, 2015). Por isso, os herbicidas são considerados indispensáveis para a produtividade agrícola, através do controle de plantas daninhas (KOESUKWIWAT; SANGUANKAE; LEEPIPATPIBOON, 2008).

Herbicidas são pequenas moléculas orgânicas que inibem a função de uma ou mais proteínas essenciais à sobrevivência das plantas (DAYAN *et al.*, 2010; DUKE, 2012). No Brasil, a comercialização de herbicidas é responsável por mais do que todos os outros tipos de pesticidas combinados (fungicida, inseticida, acaricida, bactericida, formicida, moluscicida), representando 58,45% do total de vendas no país em 2017 (IBAMA, 2019).

Os pesticidas ácidos que contêm um grupo carboxílico, como os ácidos fenoxi, benzoico e ariloxialcanoico, são amplamente empregados na prática agrícola como herbicidas e reguladores de crescimento (SANTILIO *et al.*, 2011). Os herbicidas fenoxiácidos são utilizados para controlar o crescimento de diferentes espécies vegetais indesejadas na agricultura, jardinagem e silvicultura (WEN *et al.*, 2015). Em particular, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), tem sido amplamente utilizado para essa finalidade.

3.2 Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), pertencente ao grupo químico do ácido fenoxialcanoico, é uma auxina sintética² que atua como regulador de crescimento em plantas (NJOKU *et al.*, 2015; EYER *et al.*, 2016; ARCAUTE; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2016).

Em baixas concentrações, a principal função do 2,4-D é imitar as auxinas naturais para promover a divisão e o alongamento celular (ARCAUTE; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2016). Em altas concentrações, funciona como um herbicida para controle seletivo de plantas daninhas na agricultura, silvicultura, pastagens, gramados, florestas e controle de plantas aquáticas (AQUINO *et al.*, 2007; ARCAUTE; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2016; ISLAM *et al.*, 2018; CARVER *et al.*, 2018).

O 2,4-D foi o primeiro herbicida comercial a ser introduzido no mercado para o controle de plantas daninhas de folhas largas, na década de 1940 (ISLAM *et al.*, 2018). Atualmente, é amplamente empregado

² **Auxina sintética:** Substância com atividade de auxina, não produzida por plantas. Auxina é um composto com atividades biológicas semelhantes às do hormônio ácido indol-3-acético (AIA), sendo elas: induzir o alongamento celular em coleótipo isolado ou secções de caules, divisão celular em tecidos de calos na presença de citocinina, formação de raízes laterais em superfícies cortadas de caules, crescimento de frutos partenocárpicos e formação de etileno (TAIZ; ZEIGER, 2013).

como um herbicida sistêmico³ de pré e pós-emergência⁴, sendo um dos mais utilizados no mundo, devido ao seu reduzido custo, seletividade, fácil disponibilidade e amplo espectro de controle de plantas daninhas (DEOKAR; MANDAVGANE, 2015; JAAFARZADEH; GHANBARI; AHMADI, 2017; ISLAM *et al.*, 2018).

Outra razão é que as formulações comerciais de 2,4-D são facilmente solúveis em água e outros solventes polares, resultando em rápida penetração através das folhas e raízes, o que o torna o herbicida mais eficaz (ISLAM *et al.*, 2018).

No Brasil, a comercialização de ingrediente ativo do 2,4-D foi de 48.921 toneladas em 2018, representando 8,91% do total, sendo o segundo ingrediente ativo mais comercializado desde o ano de 2013, atrás apenas do herbicida glifosato e seus sais (IBAMA, 2019).

No país, o 2,4-D é registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso agrícola em diversas culturas, sendo estabelecido o respectivo Limite Máximo de Resíduo (LMR) para cada cultura, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Culturas em que o 2,4-D pode ser empregado e respectivo LMR

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR* (mg kg⁻¹)
Arroz	Pré/Pós-emergência	0,20
Aveia	Pré/Pós-emergência	0,20
Café	Pré/Pós-emergência	0,10
Cana-de-açúcar	Pré/Pós-emergência	0,10
Centeio	Pré/Pós-emergência	0,20
Cevada	Pré/Pós-emergência	0,20
Eucalipto	Erradicação da cultura	Uso não alimentar
Milheto	Pré/Pós-emergência	0,20
Milho	Pré/Pós-emergência	0,20
Pastagem	Pré/Pós-emergência	Uso não alimentar
Soja	Pré/Pós-emergência	0,10
Sorgo	Pré/Pós-emergência	0,20
Trigo	Pré/Pós-emergência	0,20

LMR = Limite máximo de resíduo

*LMR de culturas convencionais e de culturas geneticamente modificadas é definido como a soma de 2,4-D, seus sais, ésteres e conjugados, expressos como 2,4-D.

Fonte: ANVISA, 2019.

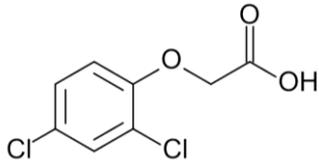
Para atividade não agrícola, o uso do 2,4-D é permitido para capinas químicas em áreas não agrícolas, não florestais e não urbanas, sendo aplicado ao longo de cercas, aceiros, rodovias, ferrovias, faixa sob

³ **Herbicida sistêmico:** Absorvido pela planta e translocado, via floema ou xilema, aos seus sítios de ação, que são, normalmente, as regiões de crescimento ativo, de reprodução ou de armazenamento (GWYNNE; MURRAY, 1985).

⁴ **Pré-emergência:** aplicações realizadas antes da emergência de plantas daninhas, juntamente ou logo após a semeadura; **Pós-emergência:** Aplicações realizadas após a emergência de plantas daninhas e antes que essas interfiram no desenvolvimento da cultura, devido à competição (EMBRAPA, 2006).

rede de alta tensão e passagens de oleoduto (ANVISA, 2019). A estrutura química da molécula do 2,4-D e suas informações físico-químicas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Estrutura química da molécula do 2,4-D e suas informações físico-químicas

Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)	
Fórmula Molecular	$C_8H_6Cl_2O_3$
Massa molar	$221,0 \text{ g mol}^{-1}$
Solubilidade em água a 25°C e $\text{pH}=7,0$	23.180 mg L^{-1}
PKa	2,80
Kd	1,24

Fonte: Adaptado de BOL'SHAKOV; AMELIN; TRET'YAKOV, 2014 e CALDAS *et al.*, 2016.

Conforme observado na Tabela 2, o 2,4-D é uma molécula polar com valor de $\text{pKa} = 2,80$ devido à presença do grupo ácido carboxílico (ISLAM *et al.*, 2018). Por isso, apresenta elevada solubilidade em água, sendo bastante móvel em sistemas aquosos (NJOKU *et al.*, 2015; ISLAM *et al.*, 2018).

O coeficiente de distribuição (Kd) representa a adsorção solo/água e mede a força da ligação do pesticida às partículas do solo, em que Kd maior que 5,0 indica forte adsorção no solo e na matéria orgânica e menor probabilidade de lixiviação (NJOKU *et al.*, 2015). Conforme observado na Tabela 2, o Kd do 2,4-D é 1,24, o que indica não persistência no solo e, portanto, pode ser encontrado no ambiente aquático (NJOKU *et al.*, 2015).

O 2,4-D é lixiviado em solo arenoso, bem como em solo com baixa matéria orgânica, sendo considerado um dos pesticidas mais móveis no solo (ALBANIS; TZIALLA; POMONIS, 1992). Por essas razões, o uso intensivo do 2,4-D tem levado ao aumento na contaminação de águas superficiais e subterrâneas.

3.3 Presença do 2,4-D em fontes de água

Com o aumento na utilização dos pesticidas em todo o mundo, vêm crescendo as preocupações com relação aos impactos à saúde humana e ao meio ambiente causados por eles (SACK *et al.*, 2015; HERO, 2017). A utilização de pesticidas que, por um lado, gera benefícios, por outro é responsável pela contaminação ambiental, acarretando a detecção de um número crescente desses compostos químicos no meio ambiente (PRESTES *et al.*, 2009; CAI *et al.*, 2018).

A aplicação de grande volume de 2,4-D em campos agrícolas induz a ocorrência desse composto em solo, alimentos e fontes de água (JAAFARZADEH; GHANBARI; AHMADI, 2017). Particularmente, a contaminação por pesticidas nos ecossistemas aquáticos emergiu como uma importante questão ambiental nas últimas décadas, sendo considerados um dos tipos mais prejudiciais de compostos que afetam as águas (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006; SACK *et al.*, 2015).

A contaminação por pesticidas ocorre por descarga de efluentes, escoamento, deposição atmosférica, deriva, drenagem e lixiviação (BOTTA *et al.*, 2009; POPP; PETO; NAGY, 2013). A contaminação das águas superficiais e subterrâneas pode ter efeitos ecotoxicológicos para a flora e a fauna aquáticas e para a saúde humana, se usada para consumo público (SHIN *et al.*, 2011).

O 2,4-D é uma molécula polar que apresenta elevada solubilidade em água e é fracamente retido pelos solos (NJOKU *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2017). Por isso, esse composto tem sido encontrado em fontes de água em todo o mundo, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração do 2,4-D em diferentes fontes de água

Amostras	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Localidade	Referência
Água de rios	2,00	Brasil	Primel <i>et al.</i> (2005)
	7,87	EUA	Serrano; De Lorenzo (2008)
	3,40	Brasil	Marchesan <i>et al.</i> (2010)
	0,050	Espanha	Rodil <i>et al.</i> (2012)
	12,0	EUA	Ensminger <i>et al.</i> (2013)
	1,12	Grécia	Tsaboula <i>et al.</i> (2016)
	45,0	México	Salvatierra-Stamp <i>et al.</i> (2018)
Água de lagos	2,95	EUA	Serrano; De Lorenzo (2008)
	60,0	México	Arévalo-Hernández <i>et al.</i> (2011)
	0,460	EUA	Wijnja <i>et al.</i> (2014)
Água potável	0,040	Espanha	Rodil <i>et al.</i> (2012)
Água subterrânea	0,100	Dinamarca	McKnight <i>et al.</i> (2015)
Efluentes de ETE	0,200	Espanha	Rodil <i>et al.</i> (2012)
	0,360	México	Salvatierra-Stamp <i>et al.</i> (2018)
Água de escoamento de plantações de arroz	2,00	Irã	Amani <i>et al.</i> (2011)
Água de escoamento de áreas residenciais	11,5	EUA	Ensminger <i>et al.</i> (2013)

ETE = Estação de tratamento de efluente; EUA = Estados Unidos da América.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

3.4 Riscos do 2,4-D e legislações aplicáveis

O uso intensivo do 2,4-D em práticas agrícolas pode provocar a contaminação de fontes de água, podendo representar riscos à saúde humana e ao meio ambiente (CAI *et al.*, 2018). Em 2015 a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou o 2,4-D como possivelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2B) (LOOMIS *et al.*, 2015).

Recentemente, pesquisas têm avaliado a associação entre o 2,4-D e o linfoma não-Hodgkin (LNH). Os LNHs são um grupo heterogêneo de cânceres decorrentes de linfócitos e seus precursores no sistema imunológico (SMITH *et al.*, 2017). Estudo desenvolvido a partir de revisão de literatura referente a dados epidemiológicos descritos em 24 estudos, sugeriu que a exposição ao 2,4-D está associada ao aumento dos riscos de LNH. Em contrapartida, outro estudo avaliou essa relação em mais de 55.000 aplicadores que tiveram exposições relativamente altas ao 2,4-D, e constataram que não foi possível atribuir relação entre esse pesticida e o desenvolvimento do LNH (GOODMAN; LOFTUS; ZU, 2017).

O 2,4-D é classificado como extremamente tóxico pela ANVISA, moderadamente tóxico pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e ligeiramente a moderadamente tóxico pela USEPA (USEPA, 2005; OMS, 2009; ANVISA, 2019).

Portanto, a exposição das águas superficiais e subterrâneas ao 2,4-D pode representar riscos ao ser humano e aos organismos aquáticos (NJOKU *et al.*, 2015). Por essas razões, agências reguladoras nacionais e internacionais estabeleceram o LMR permitido para o 2,4-D em água.

No Brasil, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução nº 357 de 2005, estabeleceu a concentração limite de 2,4-D em 4,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para águas de cursos hídricos enquadrados nas classes 1⁵ e 2⁶. Para os cursos hídricos enquadrados nas classes 3⁷ e 4⁸, o LMR estabelecido é de 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para águas salobras⁹ e salinas¹⁰, a concentração permitida é de 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (BRASIL, 2005).

Para água potável, o Ministério da Saúde por meio do anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5 de 2017, fixa a concentração máxima em 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2017). No âmbito internacional, a OMS e Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) estabelecem as concentrações de 30,0 e 70,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, como sendo o valor máximo permitido de 2,4-D em água potável (USEPA, 2009; OMS, 2011). Dessa forma, devido à importância ambiental do 2,4-D sob o ponto de vista toxicológico, pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de metodologias para extração e quantificação desse composto em água são altamente desejáveis.

3.5 Metodologias para determinação do 2,4-D em amostras de água

O monitoramento do 2,4-D em amostras de água tem sido relatado na literatura científica. A Tabela 4 apresenta as principais metodologias para extração e técnica de análise desse composto, além dos seus respectivos limites de quantificação (LQ).

⁵ **Classe 1:** águas que podem ser destinadas: ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.

⁶ **Classe 2:** águas que podem ser destinadas: ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e à aquicultura e à atividade de pesca.

⁷ **Classe 3:** águas que podem ser destinadas: ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário; e à dessedentação de animais.

⁸ **Classe 4:** águas que podem ser destinadas: à navegação; e à harmonia paisagística.

⁹ **Águas salobras:** águas com salinidade superior a 0,5% e inferior a 30%.

¹⁰ **Águas salinas:** águas com salinidade igual ou superior a 30% (BRASIL, 2005).

Tabela 4 - Metodologias para extração e quantificação do 2,4-D em amostras de água

Metodologia de extração	Técnica de análise	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referências
DLLME	HPLC-UV	3,10	Melwanki; Fuh (2008)
DLLME	HPLC-DAD	0,160	Farhadi; Matin; Hashemi (2009)
DLLME	UPLC-DAD	0,130	Tsai; Huang (2009)
DLLME	HPLC-UV	0,800	Tayyebi; Yamini; Moradi (2012)
DLLME	HPLC-UV	0,600	Behbahani <i>et al.</i> (2014)
DLLME	HPLC-UV	5,00	Pirsaheb <i>et al.</i> (2013)
DLLME	MEKC-DAD	5,50	Ma <i>et al.</i> (2013)
DLLME	LC-MS/MS	0,250	Caldas <i>et al.</i> (2016)
DLLME	GC-MS	1,00	Ebrahimi; Feizbakhsh; Es'haghi (2016)
SPE	HPLC-DAD	140	D'Archivio <i>et al.</i> (2007)
SPE	CMS-UV	190	Chávez-Moreno <i>et al.</i> (2012)
SPE	HPLC-DAD	5,00	Chaves <i>et al.</i> (2018)
SPE	HPLC-DAD	1,00	Coelho <i>et al.</i> (2018)
SPME	GC-MS	0,500	Scheyer <i>et al.</i> (2006)
MSPE	HPLC-UV	5,00	Moradi Shahrehabak <i>et al.</i> (2019)

LQ = limite de quantificação; DLLME = Microextração Líquido-Líquido Dispersiva / SPE = Extração em fase sólida / SPME = Microextração em fase sólida / MSPE = extração magnética em fase sólida / HPLC= Cromatografia em fase líquida de alta eficiência / GC = Cromatografia em fase gasosa / UV= Detector ultravioleta / DAD = Detector de arranjo de diodos / MS = Detector espectrômetro de massas / MEKC = Cromatografia eletrocínica micelar / CMS = Cromatografia Multisseriesa.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Conforme observado na Tabela 4, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a extração em fase sólida (SPE) são as principais metodologias empregadas para a extração do 2,4-D em água. As metodologias de microextração em fase sólida (SPME) e extração magnética em fase sólida também foram estudadas.

Conforme discutido por Kumar *et al.* (2018), cada método tem suas próprias limitações, como a ausência de seletividade, o grande volume de solvente requerido, o elevado tempo de preparo de amostras e os custos elevados para executar a análise. Por isso, a escolha da melhor opção deve ser feita conforme análise das vantagens e desvantagens de cada metodologia, bem como os recursos e equipamentos disponíveis.

A SPE é amplamente empregada para extração de pesticidas em água, devido a sua vantagem de pré-concentração dos analitos presentes na amostra, permitindo a análise de traços (CALDAS *et al.*, 2011). Entretanto, a SPE tem, como principais desvantagens, o alto volume de solvente orgânico requerido, bem como o uso de equipamentos e cartuchos que possuem elevado custo financeiro (BEDASSA; GURE; MEGERSA, 2017).

Conforme observado na Tabela 4, a DLLME corresponde à principal técnica de extração do 2,4-D em água. Essa metodologia apresenta como vantagens o alto fator de concentração, o reduzido tempo de extração e consumo de solvente (REZAEI *et al.*, 2010). Nessa metodologia, geralmente são usados solventes extratores clorados mais densos do que a água, como clorofórmio, clorobenzeno e tetracloreto de carbono (REZAEI *et al.*, 2006; KOZANI *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2012; SADEGHI *et al.*, 2016). Entretanto, o emprego desses solventes é criticado devido a sua elevada toxicidade (MARTINS *et al.*, 2012), sendo essa a principal desvantagem dessa metodologia.

As técnicas para a determinação de resíduos de pesticidas evoluíram significativamente em termos de simplificação, melhoria da extração e purificação de amostras, com os principais objetivos de minimizar o consumo de solventes e reagentes e otimizar a limpeza (MORAIS *et al.*, 2014). Considerando a importância do monitoramento do 2,4-D em amostras de água, é desejável o desenvolvimento e a otimização de novas metodologias para essa finalidade.

Estudos prévios empregaram as metodologias de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe* (QuEChERS) – em tradução livre, “Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro” – para a extração de pesticidas em amostras aquosas, sendo relatadas como simples, eficientes e práticas (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007; KONATU; BREITKREITZ; JARDIM, 2016; BARROS *et al.*, 2018). Essas metodologias apresentam vantagens como a purificação dos extratos, o baixo consumo de solventes e o reduzido número de etapas (ARAÚJO *et al.* 2016; GARCIA; GOTAH, 2017). Apesar dessas vantagens, não foram encontrados na literatura científica estudos empregando ELL-PBT e QuEChERS para a extração do 2,4-D em amostras de água.

3.5.1 ELL-PBT

A ELL-PBT consiste em uma metodologia de preparo de amostras, sendo relatada como inovadora, simples e versátil para a extração de diferentes analitos em matrizes aquosas (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007; BARROS *et al.*, 2018).

Essa metodologia apresenta vantagens em relação às demais devido ao reduzido número de etapas, praticidade, baixo custo, menor consumo de amostra e solventes orgânicos (SOUSA *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2016; DE PAULA *et al.*, 2018). Ao analisar amostras sólidas, essa técnica é denominada extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT).

A ELL-PBT baseia-se na adição de solvente orgânico à amostra aquosa, formando uma fase única. Estudos indicam que a proporção solvente orgânico/água 2/1 (v/v) apresenta melhores resultados de extração (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007; REZENDE *et al.*, 2017; MESQUITA *et al.*, 2017).

Posteriormente, a mistura é homogeneizada e submetida à redução de temperatura, permitindo que a água congele e o solvente orgânico permaneça líquido. Dessa forma ocorre a partição entre o solvente orgânico e a amostra aquosa, formando um sistema bifásico. A redução do volume líquido aumenta a concentração do analito, que é a força motriz para sua transferência para a fase orgânica não congelada (BARROS *et al.*, 2018). Dessa forma, os componentes da amostra são congelados com a fase aquosa, enquanto o analito alvo é extraído pela fase orgânica, não sendo necessária etapa adicional de limpeza do extrato obtido (PINHO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2015; DO REGO *et al.*, 2015).

O tempo de 1 h vêm sendo relatado como suficiente para congelamento da fase aquosa, atingindo porcentagens de recuperação próximas a 100% (RUDAKOV *et al.*, 2016; MESQUITA *et al.* 2017; SICUPIRA *et al.* 2019). Para a otimização da ELL-PBT, os parâmetros que geralmente são estudados são a composição da fase extratora e adição de sais ao sistema.

Com relação à fase extratora, a acetonitrila é o solvente orgânico mais empregado nesta metodologia (SILVÉRIO *et al.*, 2012), devido a sua propriedade de formar um sistema de duas fases com a água a temperaturas abaixo de -20 °C sem congelar (SAZONOV *et al.*, 2002). A adição de novos solventes orgânicos (metanol, acetato de etila e isopropanol, por exemplo) em diferentes proporções pode promover pequenas mudanças na polaridade da fase extratora, desde que a quantidade do novo solvente a ser adicionado não provoque o rompimento da fase única formada pela acetonitrila/água à temperatura ambiente de 25°C (PINHO *et al.*, 2010).

A eficiência desta metodologia pode ser aumentada pela adição de sais ao sistema de extração, como o cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de magnésio anidro (MgSO₄), que promovem o efeito *salting-out* (RUDAKOV *et al.*, 2016). O *salting out* promove o aumento da força iônica da solução aquosa à medida que a concentração de sal aumenta, acarretando, então, na redução da solubilidade dos compostos devido à falta de moléculas de água disponíveis para dissolução (ZHUO *et al.*, 2015).

Uma etapa de concentração do extrato obtido pode ser adicionada à metodologia, permitindo alcançar valores de limites de quantificação ainda mais inferiores. Em estudos prévios, os extratos foram concentrados sob fluxo de nitrogênio (N₂) (ANDRADE; SILVA; CALDAS, 2013; SOUSA *et al.*, 2014; DO REGO *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2017; BARROS *et al.*, 2018), fluxo de ar contínuo (SICUPIRA *et al.* 2019) e evaporador rotatório (COSTA *et al.*, 2015).

3.5.2 QuEChERS

QuEChERS é uma metodologia de extração e limpeza, originalmente desenvolvida por Anastassiades *et al.* (2003) para extração multiresíduo de pesticidas em frutas e vegetais, sendo posteriormente expandida para uma ampla variedade de analitos em diversas matrizes (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

O método QuEChERS é amplamente empregado devido as suas vantagens, como o reduzido consumo de solvente, reduzido custo, rapidez e amplo escopo de analito, incluindo pesticidas polares, apolares, ácidos e básicos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; KONATU; BREITKREITZ; JARDIM, 2016; GARCIA; GOTAH, 2017).

Estudos prévios empregaram essa metodologia para a extração do 2,4-D em diversas matrizes, incluindo arroz (KOESUKWIWAT; SANGUANKAE; LEEPIPATPIBOON, 2008), frutas (CARNEIRO *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2018a; LI; JENNINGS, 2017), leite (SACK *et al.*, 2015) e sedimentos (SALEM *et al.*, 2016). Entretanto, não foi encontrado na literatura científica a utilização do método QuEChERS para extração do 2,4-D em água.

O procedimento de preparo de amostras pelo método QuEChERS baseia-se na extração inicial com a adição de solvente orgânico à amostra de interesse, geralmente na proporção 1/1 (v/v) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). O sistema é homogeneizado e submetido à uma etapa de partição através da adição de uma mistura de sais, promovendo a separação entre as frações orgânica e aquosa.

Na etapa de partição, são frequentemente usados os sais cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de magnésio anidro (MgSO₄). A adição do NaCl promove o efeito de *salting-out*, levando ao aumento da extração do analito alvo pela fração orgânica. O MgSO₄ é utilizado devido à sua capacidade de remoção de água e, conseqüente, redução do volume da fase aquosa, permitindo obter maior porcentagem de recuperação de compostos polares. Além disso, a hidratação do MgSO₄ é uma reação exotérmica, fazendo com que o extrato atinja temperatura entre 40 a 45 °C durante esta etapa, favorecendo a extração, principalmente, de compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

No extrato obtido, uma etapa adicional de limpeza pode ser executada para remoção de substâncias interferentes e água residual (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; CABRERA *et al.*, 2012; NADAF; YADAV; KUMARI, 2015). Na abordagem original do método QuEChERS, essa etapa é realizada com a utilização do MgSO₄ anidro e do sorvente “amina primária secundária” (PSA, do inglês “*Primary Secondary Amine*”). O MgSO₄ promove a remoção de água presente no extrato e, possivelmente, outros componentes via quelação (LEHOTAY; MASTOVSKÁ; YUN, 2005). O sorvente PSA é um trocador aniônico, que interage fortemente com compostos ácidos previamente coextraídos, por exemplo, ácidos graxos e ácidos orgânicos, removendo-os da fase orgânica (BRUZZONITI *et al.*, 2014). Por isso, pesticidas ácidos, como o 2,4-D, tendem a ficar fortemente retidos no PSA, resultando em baixas recuperações de extração (KOESUKWIWAT; SANGUANKAE; LEEPIPATPIBOON, 2008; SAMPAIO *et al.*, 2013).

Outro sorvente que pode ser empregado nessa etapa é a sílica gel funcionalizada com octadecilsilano, conhecido como C18. Sua utilização é mais adequada para amostras contendo níveis de gordura ≥ 2%, a fim de eliminar compostos apolares, como substâncias graxas e lipídios (CABRERA *et al.*, 2012; HRYNKO; ŁOZOWICKA; KACZYŃSKI, 2018).

Estudos prévios eliminaram a etapa de limpeza do extrato obtido quando empregaram matrizes menos complexas, como a água por exemplo, reduzindo o número de etapas e o custo da análise (CARNEIRO *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013; SACK *et al.*, 2015; STEINBORN *et al.*, 2017).

Para otimização do método QuEChERS, geralmente, as variáveis estudadas são composição e proporção da fase extratora e aumento na quantidade de sais adicionados na etapa de partição. Com relação à fase extratora, a acetonitrila é o solvente mais empregado nesta metodologia, pois permite a extração de compostos de ampla faixa de polaridade (MELO *et al.*, 2013; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015). Para a extração do 2,4-D empregando essa metodologia, frequentemente é utilizada como fase extratora a acetonitrila acidificada com ácido acético ou ácido fosfórico (SHI *et al.*, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2013; SACK *et al.*, 2015; LI; JENNINGS, 2017).

A ausência de etapa de concentração do extrato tem sido relatada como a principal desvantagem do método QuEChERS (CUNHA, S. C; FERNANDES, 2011; GARCIA; GOTAH, 2017). Por isso, estudos recentes adicionaram uma etapa adicional de concentração do extrato obtido, promovendo a redução do LQ e, conseqüentemente, permitindo a análise de traços (SALEM *et al.*, 2016; AL-ALAM *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018a; LEI *et al.*, 2018).

3.5.3 Técnicas de análise do 2,4-D

As principais técnicas instrumentais para quantificação do 2,4-D são a cromatografia em fase gasosa (GC, do inglês “*Gas chromatography*”) e a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC,

do inglês “*High performance liquid chromatography*”). Estudos anteriores empregaram a GC acoplada à detecção por espectrometria de massas – GC-MS (EBRAHIMI; FEIZBAKHSI; ES’HAGHI, 2016; CARVER *et al.*, 2018), e HPLC acoplada a diferentes detectores, incluindo fluorescência – HPLC-FD (DICKOW *et al.*, 2001), espectrometria de massas – LC-MS/MS (SACK *et al.*, 2015; CALDAS *et al.*, 2016; SALVATIERRA-STAMP *et al.*, 2018), ultravioleta – HPLC-UV (CAI *et al.*, 2018; JAAFARZADEH; GHANBARI; AHMADI, 2017; MORADI SHAHREBABA *et al.*, 2019) e arranjo de diodos – HPLC-DAD (D’ARCHIVIO *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2018).

A análise do 2,4-D por GC requer etapa prévia de derivatização, devido à baixa volatilidade e à alta polaridade desse composto (BEHBAHANI *et al.*, 2014). A derivatização é um processo que consiste em transformar a substância de interesse em um derivado com características adequadas para ser analisado por GC (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Entretanto, esse procedimento é considerado como a principal desvantagem no procedimento de preparo de amostras, uma vez que aumenta o número de etapas, requer o uso de mais reagentes e pode causar perda de analito quando não houver eficiência da reação (PIMENTA *et al.*, 2019).

Em contrapartida, a análise por HPLC não requer etapa de derivatização do extrato obtido, permitindo a análise direta do 2,4-D (SANTILIO *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2013). Por essas razões, é considerada a técnica mais simples e adequada para a determinação desse composto. A Tabela 5 apresenta as aplicações da cromatografia em fase líquida para determinação do 2,4-D.

Tabela 5 – Aplicações da cromatografia em fase líquida para análise do 2,4-D

Técnica de análise	λ (nm)	Fase Móvel	Eluição e fluxo	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referências
HPLC-UV	238	Acetonitrila/Água (72/28 v/v)	Isocrático 1 mL min ⁻¹	85,0	Brondi e Lanças (2005)
HPLC-UV	280	Acetonitrila/Água/Ácido Acético (79,5/19,5/1,0 v/v/v)	Isocrático 1 mL min ⁻¹	0,600	Behbahani <i>et al.</i> (2014)
HPLC-UV	254	Acetonitrila/Água (70/30 v/v)	Isocrático 0,5 mL min ⁻¹	5,00	Pirsaheb <i>et al.</i> (2013)
HPLC-UV	280	Metanol/Água acidificada com 0,2% de ácido fosfórico (60/40 v/v)	Isocrático 1 mL min ⁻¹	-	Cai <i>et al.</i> (2018)
HPLC-UV	280	Acetonitrila (A)/Água acidificada com 0,5% de ácido acético (B)	Gradiente ^a	5,00	Moradi Shahrebabak <i>et al.</i> (2019)
HPLC-DAD	220	Acetonitrila/Água acidificada com 0,1 % de ácido fosfórico (50/50 v/v)	Isocrático 1 mL min ⁻¹	140	D'Archivio <i>et al.</i> (2007)
HPLC-DAD	230	Acetonitrila/Água com pH = 2,18 ajustado com ácido fórmico (45/55 v/v)	Isocrático 0,5 mL min ⁻¹	5,00	Chaves <i>et al.</i> (2018)
HPLC-DAD	206	Acetonitrila /Formiato de amônio 10,0 mM acidificado com 0,10% de ácido fosfórico (47/53 v/v)	Isocrático 1,2 mL min ⁻¹	1,00	Coelho <i>et al.</i> (2018)
HPLC-DAD	230	Acetonitrila (A)/Acetato de amônio 0,02M com ácido fórmico a 0,1% (v/v) (B)	Gradiente ^b	300	Chen <i>et al.</i> (2018 b)
LC-MS/MS	-	Água acidificada com 0,1% de ácido acético (A)/Metanol (B)	Gradiente ^c	0,250	Caldas <i>et al.</i> (2016)

λ = Comprimento de onda; LQ = Limite de quantificação; HPLC = Cromatografia em fase líquida de alta eficiência; LC = Cromatografia em fase líquida; UV = Detector ultravioleta; DAD = Detector de arranjo de diodos; MS/MS = Detector espectrômetro de massas.

^a 0-5 min, 70% A; 5-6 min, gradiente linear de 30 a 50% de B; 6-13 min, 50% de B; 13-14 min, gradiente linear de 50 a 70% A; 15-20 min, 70% A. Fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

^b 0 min, 70% de B; 5 min, 70% de B; 10 min, 40% de B; 12 min, 10% de B; 16 min, 7% de B; 10 min, 95% de B; 10,1 min, 1% de B; 12 min, 1% de B. Fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

^c 0-20 min, 20% de B; 20-23 min, gradiente linear de 20 a 90% de B; 23-30 min, 20% de B. Fluxo: 0-20 min, 0,2-0,4 mL min⁻¹; 20-23 min, 0,4 mL min⁻¹; 23-30 min, 0,2 mL min⁻¹.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

O 2,4-D é um composto ionizável, com pKa 2,80, devido a presença do grupo ácido carboxílico. Essas características estão associadas a baixa retenção desse composto em colunas de fase reversa (COELHO *et al.*, 2018). Por isso, a determinação do 2,4-D por HPLC, geralmente, é realizada empregando fases móveis acidificadas, conforme apresentado na Tabela 5. Condições ácidas influenciam na ionização de ácidos, como o 2,4-D, permitindo maior retenção na coluna analítica e, conseqüentemente, melhor resolução (SAMPAIO *et al.*, 2012; CHÁVEZ-MORENO *et al.*, 2012).

Como pode ser observado na Tabela 5, os detectores na região do ultravioleta e visível (UV-vis) são amplamente empregados para quantificação desse composto. A detecção baseada na absorção de UV é a versão mais comum de detecção, sendo confiáveis, sensíveis e resistentes a mudanças nas condições ambientais (BOL'SHAKOV; AMELIN, 2016).

O detector de UV é um detector de propriedades específicas do analito, respondendo a compostos com grupo cromóforo¹¹ que absorve a luz UV em comprimento de onda específico (SWARTZ *et al.*, 2010). A molécula do 2,4-D apresenta essa propriedade, permitindo a utilização desse tipo de detector. Conforme apresentado na Tabela 5, os comprimentos de onda empregados em estudos anteriores para a detecção do 2,4-D foram de 206, 220, 230, 238, 254 e 280 nm.

O detector de arranjo de diodos (DAD), também conhecido como arranjo de fotodiodos (PDA, do inglês “*Photometric Diode Array*”) é um tipo de detector UV. O detector DAD possui alta resolução espectral e permite maior qualidade da análise, apresentando vantagens como versatilidade, alta seletividade e resolução espectral dos compostos (RIAL-OTERO *et al.*, 2007; CALDAS *et al.*, 2011).

Além disso, é possível realizar o monitoramento de diferentes comprimentos de onda em uma única análise (RIORDON, 2000), sendo ideal para a determinação simultânea de analitos que absorvem radiação em diferentes comprimentos de onda.

3.6 Referências

AL-ALAM, J.; FAJLOUN, Z.; CHBANI, A.; MILLET, M. A multiresidue method for the analysis of 90 pesticides, 16 PAHs, and 22 PCBs in honey using QuEChERS–SPME. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 21, p. 5157–5169, 2017.

ALBANIS, T. A.; TZIALLA, C.; POMONIS, P. J. The influence of fly ash on 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid persistence in corn cultivation and soil. **Science of The Total Environment**, v. 123–124, p. 481–489, 1992.

AMANI, V.; ROSHAN, S.; ASGHARINEZHAD, A. A.; NAJAFI, E.; ABEDI, H.; TAVASSOLI, N.; ZHAD, H. R. L. Z. Determination of 2,4-D in environmental samples by three phases directly suspended LPME combined with HPLC-UV. **Analytical Methods**, v. 3, n. 10, p. 2261, 2011.

¹¹ **Cromóforo:** Grupo funcional que tem absorção característica na região do ultravioleta ou do visível. Estes grupos têm invariavelmente ligações duplas ou triplas e incluem a ligação C=C (e, portanto, o anel de benzeno), a ligação C≡C, os grupos nitro e nitroso, o grupo azo e os grupos carbonila e tiocarbonila (VOGEL; MENDHAM, 2000).

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.

ANDRADE, P. D.; SILVA, J. L. G.; CALDAS, E. D. Simultaneous analysis of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and ochratoxin A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid–liquid extraction with low temperature purification (LLE–LTP). **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 61–68, 2013.

ANDRADE, V. F.; DURÃES, A. F. S.; CASSIMIRO, D. L.; PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O. Fast extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxin and polychlorinated dibenzofuran in sewage sludge and soil samples. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 4, p. 267–273, 2017.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico 2,4-D**. 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D27%2B%2B24-D.pdf/8548d5b3-f306-49df-ac49-4498bc5768d8>. Acesso em: 15 dez. 2019.

AQUINO, A. J. A.; TUNEGA, D.; HABERHAUER, G.; GERZABEK, M. H.; LISCHKA, H. Interaction of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide with soil organic matter moieties: a theoretical study. **European Journal of Soil Science**, v. 58, n. 4, p. 889–899, 2007.

ARAÚJO, E. A.; LARA, M. C. R.; DOS REIS, M. R.; VIRIATO, R. L. S.; ROCHA, R. A. R.; GONÇALVES, R. G. L.; HELENO, F. F.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; TRONTO, J.; PINTO, F. G. Determination of Haloxyfop-Methyl, Linuron, and Procymidone Pesticides in Carrot Using SLE-LTP Extraction and GC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 5, p. 1344–1352, 2016.

ARCAUTE, C. R.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 222–229, 2016.

ARÉVALO-HERNÁNDEZ, A.; SILVA, M. R.; MOYA, C. Á. Compuestos organo-persistentes y daño genético en núcleos hepáticos de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala. **Scientia CUCBA**, v. 13, n. 1–2, p. 1–8, 2011.

BARROS, A. L. C.; SCHMIDT, F. F.; DE AQUINO, S. F.; AFONSO, R. J. DE C. F. Determination of nine pharmaceutical active compounds in surface waters from Paraopeba River Basin in Brazil by LTPE-HPLC-ESI-MS/MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 20, p. 19962–19974, 2018.

BEDASSA, T.; GURE, A.; MEGERSA, N. The QuEChERS analytical method combined with low density solvent based dispersive liquid–liquid microextraction for quantitative extraction of multiclass pesticide residues in cereals. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 31, n. 1, p. 1, 2017.

BEHBAHANI, M.; NAJAFI, F.; BAGHERI, S.; BOJDI, M. K.; HASSANLOU, P. G.; BAGHERI, A. Coupling of solvent-based de-emulsification dispersive liquid–liquid microextraction with high performance liquid chromatography for simultaneous simple and rapid trace monitoring of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 4, p. 2609–2618, 2014.

BOL'SHAKOV, D. S.; AMELIN, V. G.; TRET'YAKOV, A. V. Determination of polar pesticides in soil by micellar electrokinetic chromatography using QuEChERS sample preparation. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 89–97, 2014.

BOL'SHAKOV, D. S.; AMELIN, V. G. Determination of pesticides in environmental materials and food products by capillary electrophoresis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 71, n. 10, p. 965–1013, 2016.

BOTTA, F.; LAVISON, G.; COUTURIER, G.; ALLIOT, F.; MOREAU-GUIGON, E.; FAUCHON, N.; GUERY, B.; CHEVREUIL, M.; BLANCHOU, H. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. **Chemosphere**, v. 77, n. 2, p. 133–139, 2009.

BRASIL. Conselho Nacional Do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 18 de março de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Brasil, n. 053, de 18 de março de 2005, p. 58-63.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria de consolidação Nº 5, de 03 de outubro de 2017. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Brasil, n. 190, Seção 1, 03 de outubro de 2017, p. 360.

BRONDI, S. H. G.; LANÇAS, F. M. 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, n. 3b, p. 650–653, 2005.

BRUZZONITI, M. C.; CHECCHINI, L.; DE CARLO, R. M.; ORLANDINI, S.; RIVOIRA, L.; DEL BUBBA, M. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 17, p. 4089–4116, 2014.

CABRERA, L. DA C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227–240, 2012.

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

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CALDAS, S. S.; ROMBALDI, C.; DE OLIVEIRA ARIAS, J. L.; MARUBE, L. C.; PRIMEL, E. G. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 146, p. 676–688, 2016.

CARNEIRO, R. P.; OLIVEIRA, F. A. S.; MADUREIRA, F. D.; SILVA, G.; DE SOUZA, W. R.; LOPES, R. P. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 413–423, 2013.

CARVER, Z. A.; HAN, A. A.; TIMCHALK, C.; WEBER, T. J.; TYRRELL, K. J.; SONTAG, R. L.; LUDERS, T.; CHRISLER, W. B.; WEITZ, K. K.; SMITH, J. N. Evaluation of non-invasive biomonitoring of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in saliva. **Toxicology**, v. 410, p. 171–181, 2018.

CHAVES, M. J. S. ; T. VERBINNEN, R.; DOS S. DINIZ, M.; LUCAS M. VIANA, J.; DE J. S. MENDONÇA, C.; R. S. FRANCO, T. C. Successful and Robustness of 2,4-D Analysis in Surface Waters. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1474–1484, 2018.

CHÁVEZ-MORENO, C. A.; GUZMÁN-MAR, J. L.; HINOJOSA-REYES, L.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, A.; FERRER, L.; CERDÀ, V. Applicability of multisyringe chromatography coupled to on-line solid-phase extraction to the simultaneous determination of dicamba, 2,4-D, and atrazine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 9, p. 2705–2714, 2012.

CHEN, Y.; WU, X.; LI, Y.; YANG, Y.; YANG, D.; YIN, S.; LIU, L.; SUN, C. Simultaneous Determination of Seven Plant Growth Regulators in Melons and Fruits by Modified QuEChERS Coupled with Capillary Electrophoresis. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 10, p. 2788–2798, 2018a.

CHEN, X.; ZHANG, H.; WAN, Y.; CHEN, X.; LI, Y. Determination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rat serum for pharmacokinetic studies with a simple HPLC method. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0191149, 2018b.

- COELHO, E. R. C.; LEAL, W. P.; SOUZA, K. B. DE; ROZÁRIO, A. DO; ANTUNES, P. W. P. 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. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, n. 6, p. 1043–1051, 2018.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. I.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editorada Unicamp, 2006.
- COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; DE ASSIS, R. C.; DOS SOARES, C. E. S.; DA SILVA, A. A.; D'ANTONINO, L.; DE OLIVEIRA, A. F.; BELLATO, C. R. Mobility and persistence of the herbicide fomesafen in soils cultivated with bean plants using SLE/LTP and HPLC/DAD. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3457–3466, 2015.
- CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 43, p. 7748–7757, 2011.
- D'ARCHIVIO, A. A.; FANELLI, M.; MAZZEO, P.; RUGGIERI, F. Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 25–30, 2007.
- DAYAN, F. E.; DUKE, S. O.; GROSSMANN, K. Herbicides as Probes in Plant Biology. **Weed Science**, v. 58, n. 3, p. 340–350, 2010.
- DE PAULA, C.; JURISCH, M.; PICCIN, E.; AUGUSTI, R. Recognizing drug-facilitated crimes: Detection and quantification of benzodiazepines in beverages using fast liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and paper spray mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 10, n. 9, p. 1348–1357, 2018.
- DEOKAR, S. K.; MANDAVGANE, S. A. Rice Husk Ash for Fast Removal of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid from Aqueous Solution. **Adsorption Science & Technology**, v. 33, n. 5, p. 429–440, 2015.
- DICKOW, L. M.; GERKEN, D. F.; SAMS, R. A.; ASHCRAFT, S. M. Simultaneous determination of 2,4-D and MCPA in canine plasma and urine by HPLC with fluorescence detection using 9-anthryldiazomethane (ADAM). **Journal of Analytical Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 35–39, 2001.
- DO REGO, E. C. P.; GUIMARÃES, E. DE F.; DOS SANTOS, A. L. M.; MOTHÉ, E. DE S. M.; RODRIGUES, J. M.; PEREIRA NETTO, A. D. The validation of a new high throughput method for determination of chloramphenicol in milk using liquid–liquid extraction with low temperature partitioning (LLE-LTP) and isotope-dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry (ID-LC-MS/MS). **Analytical Methods**, v. 7, n. 11, p. 4699–4707, 2015.

DUKE, S. O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? **Pest Management Science**, v. 68, n. 4, p. 505–512, abr. 2012.

EBRAHIMI, R.; FEIZBAKHS, A.; ES'HAGHI, A. Extraction and Derivatization of Chlorophenoxy Acid Pesticides: Performing Two DLLME with One Extracting Phase. **Chromatographia**, v. 79, n. 7–8, p. 515–520, 2016.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Época de aplicação dos herbicidas**. 2006. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do62_11.htm>. Acesso em: 27 dez. 2019.

ENSMINGER, M. P.; BUDD, R.; KELLEY, K. C.; GOH, K. S. Pesticide occurrence and aquatic benchmark exceedances in urban surface waters and sediments in three urban areas of California, USA, 2008–2011. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 5, p. 3697–3710, 2013.

EYER, L.; VAIN, T.; PAŘÍZKOVÁ, B.; OKLESTKOVA, J.; BARBEZ, E.; KOZUBÍKOVÁ, H.; POSPÍŠIL, T.; WIERZBICKA, R.; KLEINE-VEHN, J.; FRÁNEK, M.; STRNAD, M.; ROBERT, S.; NOVAK, O. 2,4-D and IAA Amino Acid Conjugates Show Distinct Metabolism in Arabidopsis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0159269, 2016.

FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. **Pesticides use**. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>>. Acesso em: 05 jan. 2020.

FARHADI, K.; MATIN, A. A.; HASHEMI, P. LC Determination of Trace Amounts of Phenoxyacetic Acid Herbicides in Water after Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. **Chromatographia**, v. 69, n. 1–2, p. 45–49, 2009.

GARCIA, C. V.; GOTAH, A. Application of QuEChERS for Determining Xenobiotics in Foods of Animal Origin. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERRERA-HERRERA, A. V.; GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Evolution and applications of the QuEChERS method. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169–185, set. 2015.

GOODMAN, J. E.; LOFTUS, C. T.; ZU, K. 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, n. 4, p.290-292, abr. 2017.

GWYNNE, D. C.; MURRAY, R. B. **Weed biology and control in agriculture and horticulture**. Londres: Batsford Academic and educational, 1985, 258 p.

HERO, M. Dietary risk assessment of pesticide residues in bananas. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, v. 17, p. 61–65, 2017.

HRYNKO, I.; ŁOZOWICKA, B.; KACZYŃSKI, P. Liquid Chromatographic MS/MS Analysis of a Large Group of Insecticides in Honey by Modified QuEChERS. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 8, p. 2307–2319, 2018.

IBAMA, Instituto Brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos: Boletim de 2018**. 2019. Disponível em: <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#>. Acesso em: 15 dez. 2019.

ISLAM, F.; WANG, J.; FAROOQ, M. A.; KHAN, M. S. S.; XU, L.; ZHU, J.; ZHAO, M.; MUÑOS, S.; LI, Q. X.; ZHOU, W. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, v. 111, p. 332–351, 2018.

JAAFARZADEH, N.; GHANBARI, F.; AHMADI, M. Efficient degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by peroxy monosulfate/magnetic copper ferrite nanoparticles/ozone: A novel combination of advanced oxidation processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 320, p. 436–447, 2017.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, n. 1, p. 10–20, 2008.

KONATU, F. R. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F. Revisiting quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe parameters for sample preparation in pesticide residue analysis of lettuce by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1482, p. 11–22, 2017.

KOZANI, R.; ASSADI, Y.; SHEMIRANI, F.; HOSSEINI, M.; JAMALI, M. Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid–liquid microextraction combined gas chromatography–electron capture detection. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 387–393, 2007.

KUMAR, A.; GILL, J. P. S.; BEDI, J. S.; KUMAR, A. Pesticide residues in Indian raw honeys, an indicator of environmental pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 34, p. 34005–34016, 2018.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 630–638, 2005.

LEI, H.; GUO, J.; LV, Z.; ZHU, X.; XUE, X.; WU, L.; CAO, W. Simultaneous Determination of Nitroimidazoles and Quinolones in Honey by Modified QuEChERS and LC-MS/MS Analysis. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2018, p. 1–12, 2018.

LI, Z.; JENNINGS, A. Worldwide Regulations of Standard Values of Pesticides for Human Health Risk Control: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 7, p. 826, 2017.

LOOMIS, D.; GUYTON, K.; GROSSE, Y.; EL GHISSASI, F.; BOUVARD, V.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; MATTOCK, H.; STRAIF, K. Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 8, p. 891–892, 2015.

MA, Y.; WEN, Y.; LI, J.; WANG, H.; DING, Y.; CHEN, L. Determination of three phenoxyacid herbicides in environmental water samples by the application of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with micellar electrokinetic chromatography. **Open Chemistry**, v. 11, n. 3, 2013.

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

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 29–45, 2012.

MCKNIGHT, U. S.; RASMUSSEN, J. J.; KRONVANG, B.; BINNING, P. J.; BJERG, P. L. Sources, occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. **Environmental Pollution**, v. 200, p. 64–76, 2015.

MELO, A.; MANSILHA, C.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Analysis of Pesticides in Tomato Combining QuEChERS and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 2, p. 559–568, 2013.

MELWANKI, M. B.; FUH, M.-R. Partitioned dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1207, n. 1–2, p. 24–28, 2008.

MESQUITA, T. C. R.; SANTOS, R. R.; CACIQUE, A. P.; DE SÁ, L. J.; SILVÉRIO, F. O.; PINHO, G. P. Easy and fast extraction methods to determine organochlorine pesticides in sewage sludge, soil, and water samples based at low temperature. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 53, n. 3, p. 199–206, 2018.

MORADI SHAHREBABA, S.; SABER-TEHRANI, M.; FARAJI, M.; SHABANIAN, M.; ABEROORMAND-AZAR, P. Simultaneous magnetic solid phase extraction of acidic and basic pesticides using triazine-based polymeric network modified magnetic nanoparticles/graphene oxide nanocomposite in water and food samples. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 630–639, 2019.

MORAIS, E. H. DA C.; RODRIGUES, A. A. Z.; QUEIROZ, M. E. L. R. DE; NEVES, A. A.; MORAIS, P. H. D. Determination of thiamethoxam, triadimenol and deltamethrin in pineapple using SLE-LTP extraction and gas chromatography. **Food Control**, v. 42, p. 9–17, 2014.

NADAF, H. A.; YADAV, G. S.; KUMARI, B. Validation and monitoring of pesticide residues in honey using QuEChERS and gas chromatographic analysis. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 3, p. 260–266, 2015.

NJOKU, V. O.; ISLAM, M. D. A.; ASIF, M.; HAMEED, B. H. Adsorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by mesoporous activated carbon prepared from H₃PO₄-activated langsat empty fruit bunch. **Journal of Environmental Management**, v. 154, p. 138–144, 2015.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009**. 2009. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44271/9789241547963_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 28 Jul. 2019.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Guidelines for drinking-water quality, fourth edition**. 2011. Disponível em: https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/. Acesso em: 5 set. 2019.

PIMENTA, E.; DA SILVA, F.; BARBOSA, É.; CACIQUE, A.; CASSIMIRO, D.; PINHO, G.; SILVÉRIO, F. Quantification of Glyphosate and AMPA by HPLC-ICP-MS/MS and HPLC-DAD: A Comparative Study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, n. 10, p. 1307–1311, 2010.

PIRSAHEB, M.; FATTAHI, N.; SHAMSIPUR, M.; KHODADADI, T. Application of dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for simultaneous determination of alachlor and atrazine in aqueous samples: Liquid Chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 4, p. 684–689, 2013.

POPP, J.; PETŐ, K.; NAGY, J. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 1, p. 243–255, 2013.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. DE O.; MARCHEZAN, E. 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, n. 4, p. 605–609, 2005.

QUIJANO, L.; YUSÀ, V.; FONT, G.; PARDO, O. Chronic cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus, carbamate and pyrethroid and pyrethrin pesticides through fruit and vegetables consumption in the region of Valencia (Spain). **Food and Chemical Toxicology**, v. 89, p. 39–46, 2016.

RAKS, V. A.; TURCHIN, V. A.; ZAITSEV, V. N. Chromatographic determination of pesticide 2,4-D in water bodies. **Journal of Water Chemistry and Technology**, v. 37, n. 6, p. 295–298, 2015.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.-R.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342–2357, 2010.

REZENDE, F. B. F.; SOUZA, A. M. S. C.; PEREIRA NETTO, A. D.; MARQUES, F. F. C. Determination of formaldehyde in bovine milk using a high sensitivity HPLC-UV method. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 383–389, 2017.

RIAL-OTERO, R.; GASPAR, E. M.; MOURA, I.; CAPELO, J. L. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 503–514, 2007.

RIORDON, James R. Product Review: Diode array detectors for HPLC. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 13, p. 483 A–487 A, 2000.

RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; CONCHA-GRAÑA, E.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v. 86, n. 10, p. 1040–1049, 2012.

RUDAKOV, O. B.; KHOROKHORDINA, E. A.; PREOBRAZHENSII, M. A.; RUDAKOVA, L. V. Low-temperature liquid–liquid extraction of phenols from aqueous solutions with hydrophilic mixtures of extractants. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, v. 90, n. 8, p. 1665–1668, 2016.

SACK, C.; VONDERBRINK, J.; SMOKER, M.; SMITH, R. E. Determination of Acid Herbicides Using Modified QuEChERS with Fast Switching ESI + /ESI – LC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 43, p. 9657–9665, 2015.

SADEGHI, R.; KOBARFARD, F.; YAZDANPANA, H.; ESLAMIZAD, S.; BAYAT, M. Validation of an analytical method for determination of 13 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in mineral water using dispersive liquid-liquid microextraction and GC-MS. **Iranian journal of pharmaceutical research**, v. 15, n. 1, p. 157–168, 2016.

SALEM, F. B.; SAID, O. B.; AISSA, P.; MAHMOUDI, E.; MONPERRUS, M.; GRUNBERGER, O.; DURAN, R. Pesticides in Ichkeul Lake–Bizerta Lagoon Watershed in Tunisia: use, occurrence, and effects on bacteria and free-living marine nematodes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 1, p. 36–48, 2016.

SALVATIERRA-STAMP, V.; MUÑIZ-VALENCIA, R.; JURADO, J. M.; CEBALLOS-MAGAÑA, S. G. Hollow fiber liquid phase microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of emerging contaminants in water samples. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 87–95, 2018.

SAMPAIO, M. R. F.; TOMASINI, D.; CARDOSO, L. V.; CALDAS, S.; PRIMEL, E. G.; V. Determination of pesticide residues in sugarcane honey by QuEChERS, and liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 197–205, 2012.

SAMPAIO, M. R. F.; TOMASINI, D.; CARDOSO, L. V.; CALDAS, S. S.; DUARTE, F. A.; PRIMEL, E. G. A method for the determination of multiclass pesticides in sugarcane juice employing QuEChERS and LC-ESI-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 5, n. 8, p. 2028-2033, 2013.

SANTILIO, A.; STEFANELLI, P.; GIROLIMETTI, S.; DOMMARCO, R. Determination of acidic herbicides in cereals by QuEChERS extraction and LC/MS/MS. **Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 46, n. 6, p. 535–543, 2011.

SAZONOV, V. P.; SHAW, D. G.; MARSH, K. N.; SAZONOV, V. P.; SAZONOV, N. V.; LISOV, N. I. IUPAC-NIST Solubility Data Series. 77. C2+ Nitroalkanes With Water or Organic Solvents: Binary and Multicomponent Systems. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 31, n. 1, p. 1–121, 2002.

SCHEYER, A.; BRIAND, O.; MORVILLE, S.; MIRABEL, P.; MILLET, M. Analysis of trace levels of pesticides in rainwater by SPME and GC-tandem mass spectrometry after derivatisation with PFFBr. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 1, p. 359–368, 2006.

SCHWARZENBACH, R. P.; ESCHER, B. I.; FENNER, K.; HOFSTETTER, T. B.; JOHNSON, C. A.; GUNTEN, U. VON; WEHRLI, B. The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1072–1077, 2006.

SERRANO, L.; DE LORENZO, M. E. Water quality and restoration in a coastal subdivision stormwater pond. **Journal of Environmental Management**, v. 88, n. 1, p. 43–52, jul. 2008.

SHARMA, A.; MAHAJAN, V. K.; MEHTA, K. S.; CHAUHAN, P. S.; SHARMA, V.; SHARMA, A.; WADHWA, D.; CHAUHAN, S. Pesticide contact dermatitis in agricultural workers of Himachal Pradesh (India). **Contact Dermatitis**, v. 79, n. 4, p. 213–217, out. 2018.

SHI, X.; JIN, F.; HUANG, Y.; DU, X.; LI, C.; WANG, M.; SHAO, H.; JIN, M.; WANG, J. Simultaneous Determination of Five Plant Growth Regulators in Fruits by Modified Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) Extraction and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 60–65, 11 jan. 2012.

SHIN, E.-H.; CHOI, J.-H.; ABD EL-ATY, A. M.; KHAY, S.; KIM, S.J.; IM, M. H.; KWON, C.H.; SHIM, J. H. Simultaneous determination of three acidic herbicide residues in food crops using HPLC and confirmation via LC-MS/MS. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 1–2, p. 124–135, jan. 2011.

SICUPIRA, L.; TIAGO, J.; PINHO, G.; SILVÉRIO, F. Simultaneous Determination of 2,3,7,8-TCDD and 2,3,7,8-TCDF in Water Samples by LLE-LTP and HPLC-DAD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; PINHO, G. P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2052–2056, 2012.

SMITH, A.; SMITH, M. T.; LA MERRIL, M. A.; LIAW, J.; STEINMAUS, C. 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, n. 4, p.281-289, 2017.

SOUSA, D. A.; GONÇALVES, R. M.; HELENO, F. F.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; MARCHI, M. R. R. Chemometric optimization of solid–liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in *Caiman yacare* eggs. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 266–272, 2014.

SOUZA, F. L.; SÁEZ, C.; LANZA, M. R. V.; CAÑIZARES, P.; RODRIGO, M. A. Removal of chlorsulfuron and 2,4-D from spiked soil using reversible electrokinetic adsorption barriers. **Separation and Purification Technology**, v. 178, p. 147–153, 2017.

STEINBORN, A.; ALDER, L.; SPITZKE, M.; DÖRK, D.; ANASTASSIADES, M. Development of a QuEChERS-Based Method for the Simultaneous Determination of Acidic Pesticides, Their Esters, and Conjugates Following Alkaline Hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 6, p. 1296–1305, 2017.

SWARTZ, M. HPLC Detectors: A brief review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, n. 9–12, p. 1130–1150, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TAYYEBI, M.; YAMINI, Y.; MORADI, M. Reverse micelle-mediated dispersive liquid-liquid microextraction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid: Sample Preparation. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 18, p. 2491–2498, 2012.

TSABOULA, A.; PAPADAKIS, E.-N.; VRYZAS, Z.; KOTOPOULOU, A.; KINTZIKOGLU, K.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Environmental and human risk hierarchy of pesticides: A prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. **Environment International**, v. 91, p. 78–93, 2016.

TSAI, W.-C.; HUANG, S.-D. Dispersive liquid–liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography for the determination of chlorophenoxy acid herbicides in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7846–7850, 2009.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. **Reregistration Eligibility Decision 2,4-D; EPA 738-R-05-002**. 2005. Disponível em: https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/24d_red.pdf. Acesso em: 15 nov. 2019.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. **National Primary Drinking Water Regulations**. 2009. Disponível em: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>. Acesso em: 13 nov. 2019.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. DE. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535–540, 2007.

VOGEL, A. I.; MENDHAM, J. **Vogel's textbook of quantitative chemical analysis**. 6. ed. Harlow: Prentice Hall, 2000.

WEN, Y.; YU, C.; ZHANG, J.; ZHU, C.; LI, X.; ZHANG, T.; NIU, Z. Determination of 2, 4-D in Water Samples by Salting-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction-UV-Vis. **International Journal of Advanced Research in Chemical Science**, v. 2, n. 3, p. 8–13, 2015.

WIJNJA, H.; DOHERTY, J. J.; SAFIE, S. A. Changes in Pesticide Occurrence in Suburban Surface Waters in Massachusetts, USA, 1999–2010. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 2, p. 228–232, 2014.

WU, X.; XU, J.; LIU, X.; DONG, F.; WU, Y.; ZHANG, Y.; ZHENG, Y. Determination of Herbicide Propisochlor in Soil, Water and Rice by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Method Using by UPLC-ESI-MS/MS. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 3, p. 917–921, 2013.

ZHUO, Q.; ZHANG, Y.; DU, Q.; YAN, C. Facile reduction of graphene oxide at room temperature by ammonia borane via salting out effect. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 457, p. 243–247, 2015.

4 ARTIGO

Otimização e validação das metodologias ELL-PBT e QuEChERS para a determinação de 2,4-D em amostras de água

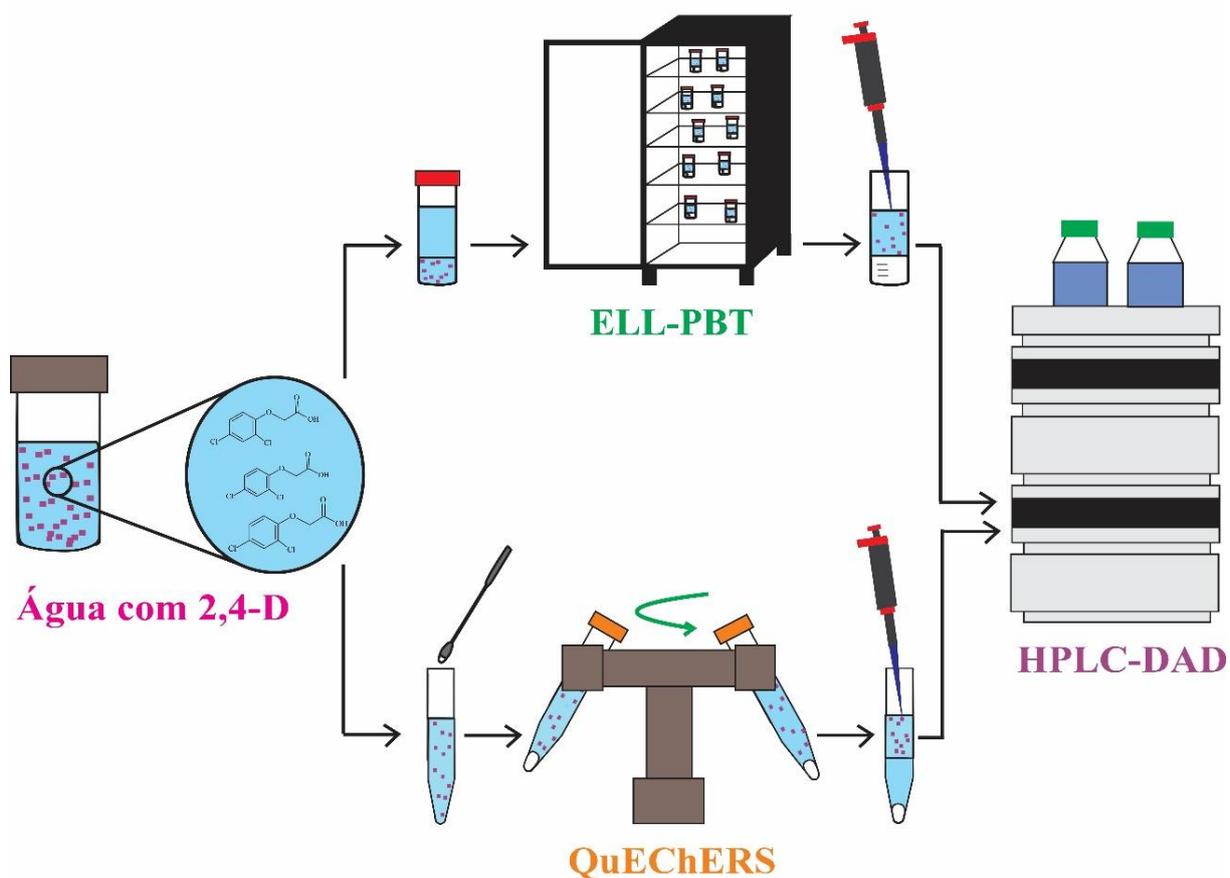
Este artigo foi elaborado conforme as normas do periódico "*Journal of the Brazilian Chemical Society*" e submetido em 23 de dezembro de 2019.

4.1 Otimização e Validação das Metodologias ELL-PBT e QuEChERS para a Determinação de 2,4-D em Amostras de Água

Lucas V. P. Freitas,^a Lázaro C. Sicupira,^b Gevany P. Pinho^a e Flaviano O. Silvério^{a*}

^aInstituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, 39404-547, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

^bInstituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 39447-790, Janaúba, Minas Gerais, Brasil



Resumo gráfico representa as metodologias ELL-PBT E QuEChERS acopladas à HPLC-DAD, empregadas no presente estudo.

Resumo

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) tem sido um dos principais herbicidas utilizados no controle de plantas daninhas, porém, devido ao seu alto uso, pode promover episódios de contaminação ambiental. Portanto, este estudo teve como objetivo otimizar e validar a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe* (QuEChERS) para a determinação e avaliação da estabilidade do 2,4-D em amostras de água por cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. As porcentagens de recuperação foram próximas a $100\pm 3\%$, e os limites de quantificação (LQ) foram 2,00 e 3,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ELL-PBT e QuEChERS, respectivamente, sendo inferiores ao limite máximo de resíduo estabelecido pelas legislações brasileiras e internacionais. As metodologias foram seletivas, precisas, exatas, sem efeito de matriz e lineares na faixa de 2,00-26,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 3,10-40,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ELL-PBT e QuEChERS, respectivamente. Por isso, representam alternativas acessíveis e eficientes para o monitoramento do 2,4-D em água. A partir de análise comparativa, verificamos que a ELL-PBT apresentou menor quantidade de etapas, menor consumo de sais e amostra e menor valor de LQ, em relação ao método QuEChERS. A aplicação das metodologias em amostras reais não revelou nenhum episódio de contaminação ambiental pelo 2,4-D. Esse resultado pode estar associado a realmente não ter esse composto nas amostras ou os níveis de concentração estarem inferiores ao LQ da metodologia. Além disso, esse herbicida pode ter sido degradado nas amostras, pois, através do experimento de estabilidade, verificamos que, após 60 dias em condições ambientais, a concentração do 2,4-D nessa matriz não pode ser quantificada pela ELL-PBT acoplada à HPLC-DAD.

Palavras-chave: herbicida; ácido 2,4-diclorofenoxiacético; HPLC-DAD; métodos de extração; partição em baixa temperatura; validação.

Optimization and Validation of LLE-LTP and QuEChERS Methodologies for Determining 2,4-D in Water Samples

Abstract

2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) has been one of the main herbicides used to control weeds, however due to its high use it can promote episodes of environmental contamination. Therefore, this study aimed to optimize and validate liquid-liquid extraction with low temperature partition (LLE-LTP) and Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) for determination and evaluation of 2,4-D stability in water samples by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). The recovery percentages of the two methodologies were close to $100\pm 3\%$, and the limits of quantification (LOQ) were 2.00 and $3.10 \mu\text{g L}^{-1}$ for LLE-LTP and QuEChERS, respectively, being below the maximum residue limit established by Brazilian and international legislations. The methodologies were selective, precise, accurate, without matrix effect, and presented linearity from $2.00 - 26.0$ and $3.10 - 40.6 \mu\text{g L}^{-1}$ for LLE-LTP and QuEChERS, respectively. Therefore, they represent accessible and efficient alternatives for monitoring 2,4-D in water samples. From the comparative analysis, we found that the LLE-LTP had less number of steps, less consumption of salts and sample and lower LOQ, compared to the QuEChERS method. The real samples did not reveal any environmental contamination episodes by 2,4-D. This result may be associated with the absence of 2,4-D in the samples, or concentration levels are below the LOQ. Furthermore, this herbicide may have been degraded in the samples, because we found that after 60 days, in environmental conditions, the concentration of 2,4-D in this matrix cannot be quantified by LLE-LTP coupled to HPLC-DAD.

Keywords: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; herbicide; HPLC-DAD; LLE-LTP; QuEChERS; partition at low temperature, validation.

Introdução

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), pertencente ao grupo químico do ácido fenoxialcanoico, é amplamente empregado como um herbicida sistêmico de pré e pós-emergência para controlar ervas daninhas de folhas largas.¹ No Brasil, o 2,4-D é registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)² para uso agrícola nas culturas de arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, eucalipto, milho, sorgo e trigo. O uso desse herbicida também é permitido para capinas químicas em áreas não agrícolas, não florestais e não urbanas, sendo aplicado ao longo de cercas, aceiros, rodovias, ferrovias, faixa sob rede de alta tensão e passagens de oleoduto.²

O 2,4-D é um dos pesticidas mais utilizados no mundo devido ao seu reduzido custo, seletividade, fácil disponibilidade e amplo espectro de controle de plantas daninhas.^{3,4} Esse herbicida é fracamente retido pela maioria dos solos e apresenta elevada solubilidade em água.^{5,6} Estudos têm evidenciado a presença do 2,4-D em fontes de água,^{7,8} podendo representar riscos à saúde humana e ao meio ambiente.⁹

Por isso, agências reguladoras nacionais e internacionais estabeleceram o limite máximo de resíduo (LMR) permitido para o 2,4-D em água potável. No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da resolução consolidada nº 5 de 2017,¹⁰ estabelece a concentração limite de 30,0 µg L⁻¹. A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) definiram o LMR em 30,0 µg L⁻¹ e 70,0 µg L⁻¹, respectivamente.^{11,12}

O 2,4-D é classificado como um produto extremamente tóxico pela ANVISA,² moderadamente tóxico pela OMS¹³ e ligeiramente a moderadamente tóxico pela USEPA.¹⁴ Em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou o 2,4-D como um produto possivelmente carcinogênico para humanos, pertencente ao Grupo 2B.¹⁵ Por isso, pesquisas relacionadas ao monitoramento e ao desenvolvimento de métodos de extração desse composto em água vêm sendo empregadas, incluindo extração em fase sólida,^{16,17} extração líquido-líquido,^{18,19} microextração líquido-líquido dispersiva,^{20,21} e extração magnética em fase sólida.²²

As metodologias de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe* (QuEChERS) – em tradução livre, “Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro” – vêm sendo empregadas para a extração de pesticidas em amostras aquosas e são relatadas como simples, eficientes e práticas.²³⁻²⁶ Essas metodologias apresentam vantagens como a purificação dos extratos, o baixo consumo de solventes e o reduzido número de etapas.^{27,28} Entretanto, não foram encontrados na literatura científica estudos empregando ELL-PBT e QuEChERS para a extração do 2,4-D em amostras de água.

A quantificação do 2,4-D é realizada através de técnicas analíticas, incluindo cromatografia em fase gasosa acoplada à detecção por espectrometria de massas (GC-MS)^{20,29} e cromatografia em fase líquida acoplada a diferentes detectores, como espectrometria de massas (LC-MS/MS),^{7,20,30} ultravioleta (HPLC-UV),^{3,7,9} fluorescência (HPLC-FD)³¹ e arranjo de diodos (HPLC-DAD).^{32,33} A análise do 2,4-D por cromatografia em fase gasosa requer etapa prévia de derivatização, aumentando o tempo e o custo da análise.^{34,35} Sendo assim, a cromatografia em fase líquida é considerada a técnica mais adequada para determinação desse composto.

O objetivo deste estudo foi otimizar e validar as metodologias ELL-PBT e QuEChERS, acopladas à HPLC-DAD, para a determinação e a avaliação da estabilidade do 2,4-D em amostras de água.

Experimental

Reagentes e soluções

O padrão analítico do 2,4-D, certificado com grau de pureza de 99,9% (m/m), foi obtido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os solventes Grau-HPLC acetonitrila, ácido acético e acetato de etila foram adquiridos da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), Dinâmica (Diadema, SP, Brasil) e Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), respectivamente. Ácido fosfórico (H_3PO_4) foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), cloreto de sódio ($NaCl$) foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e o sulfato de magnésio ($MgSO_4$) da Synth (Diadema, SP, Brasil), ambos com pureza superior a 99,0% (m/m). As soluções estoque e de trabalho do 2,4-D foram preparadas em acetonitrila nas concentrações de $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,00 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Equipamentos

O preparo de amostras foi realizado usando balança analítica da Shimadzu (São Paulo, SP, Brasil), centrífuga da Kindly (São Paulo, SP, Brasil), pHmetro da Quimis (São Paulo, SP, Brasil), bomba a vácuo da Primatec (Itu, SP, Brasil) e vórtex da Scilogex (Rocky Hill, NJ, EUA).

Análises cromatográficas

Os extratos obtidos foram analisados usando um cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD, modelo 1290, Agilent Technologies, Alemanha) equipado com amostrador automático e bomba quaternária. Na separação do 2,4-D foi empregada coluna analítica em fase reversa Kinetex C18 100A ($150 \text{ mm} \times 4,60 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Phenomenex, Milford, MA, EUA). A temperatura da coluna analítica foi mantida em $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e o volume de injeção da amostra foi de $20,0 \mu\text{L}$. A composição da fase móvel, o comprimento de onda e o fluxo foram otimizados, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros otimizados na análise cromatográfica do 2,4-D

Parâmetro	
Proporção da fase móvel ^a (v/v)	95/05
	85/15
	75/25
	65/35
	55/45
Comprimento de onda (nm)	200
	228
	284
Fluxo (mL min^{-1})	1,0
	0,80
	0,50

^a Fase móvel constituída por acetonitrila/água com $\text{pH} = 3,00$ ajustado com H_3PO_4

ELL-PBT

Para otimização das melhores condições de extração do 2,4-D pela metodologia ELL-PBT, foram avaliadas três composições de fases extratoras: 8,00 mL de acetonitrila, 8,00 mL de acetonitrila/acetato de etila (6,50/1,50 mL) e 8,00 mL de acetonitrila acidificada com ácido acético 1% (v/v). As porcentagens de extração obtidas em cada condição foram analisadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

No procedimento de preparo de amostras pela ELL-PBT, 4,00 mL da amostra de água foram adicionados em um frasco de vidro transparente de 22,0 mL, fortificados com 81,0 µL da solução de trabalho do 2,4-D na concentração de 2,00 mg L⁻¹ e mantidos em repouso por 1 h. Posteriormente, foram adicionados ao frasco 8,00 mL da fase extratora avaliada e agitados em vórtex por 1 min. O sistema foi mantido a - 20 °C por 1 h. para congelamento completo da fase aquosa e, conseqüente, separação das fases. A fase orgânica líquida foi transferida para um tubo de polipropileno de 15,0 mL contendo 0,375 g de Na₂SO₄ anidro, agitada em vórtex por 1 min. e centrifugada a 4000 rpm por 5 min. 5,00 mL do extrato obtido foram completamente evaporados usando fluxo de ar contínuo e, em seguida, ressuspendido em 400 µL de acetonitrila. A amostra obtida foi filtrada em membrana de nylon de 0,45µm, transferida para *vial* e analisada por HPLC-DAD.

QuEChERS

Para otimização das melhores condições de extração do 2,4-D pela metodologia QuEChERS, foram avaliadas três composições de fases extratoras: 5,00 mL de acetonitrila, 5,00 mL de acetonitrila/acetato de etila (4,00/1,00 mL) e 5,00 mL de acetonitrila acidificada com ácido acético 1% (v/v). As porcentagens de extração obtidas em cada condição foram analisadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

No procedimento de preparo de amostras pela metodologia QuEChERS, 5,00 mL da amostra de água foram adicionados em um tubo de polipropileno de 50,0 mL e fortificados com 85 µL da solução de trabalho do 2,4-D na concentração de 2,00 mg L⁻¹ e mantidos em repouso por 1 h. Posteriormente, 5,00 mL da fase extratora avaliada foram adicionados e o sistema foi agitado em vórtex por 1 min. Em seguida, foram adicionados 2,00 g de MgSO₄ anidro e 0,500 g de NaCl. A mistura foi imediatamente agitada em vórtex por 1 min. e centrifugada a 4000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno de 15,0 mL contendo 1,00 g de MgSO₄ anidro. A mistura foi agitada em vórtex por 1 min. e centrifugada a 4000 rpm por 5 min. 3,20 mL do extrato obtido foram completamente evaporados usando fluxo de ar contínuo e ressuspendido em 400 µL de acetonitrila. A amostra obtida foi filtrada em membrana de nylon de 0,45µm, transferida para *vial* e analisada por HPLC-DAD.

Validação das metodologias

Após a otimização, as metodologias ELL-PBT e QuEChERS foram validadas em termos de seletividade, limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão, linearidade e efeito de matriz.³⁶

Seletividade

A seletividade foi determinada pela análise comparativa entre os cromatogramas dos extratos da matriz isenta do 2,4-D (branco) e dos extratos da matriz fortificada, verificando a presença de sinais atribuídos a interferentes no mesmo tempo de retenção do 2,4-D.³⁶

Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi avaliado fortificando as amostras com concentrações mínimas do 2,4-D que podem ser quantificadas com precisão e exatidão.³⁶ O LQ foi obtido considerando a concentração que produziu um sinal 10 vezes maior que o ruído de linha de base do cromatograma da matriz isenta do 2,4-D (branco), no mesmo tempo de retenção do analito.

Precisão e Exatidão

A precisão em termos de repetitividade e exatidão em termos de recuperação foram determinadas em experimentos de fortificação/recuperação. A matriz foi fortificada em três níveis de concentração, 2,00, 11,6 e 21,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ELL-PBT e 3,10, 18,1 e 33,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS. A precisão foi analisada em sete repetições para o segundo nível, avaliando o desvio padrão relativo (DPR) obtido, sendo $\text{DPR} \leq 20\%$ considerado como o nível de aceitabilidade. A exatidão foi avaliada em três repetições para o primeiro e terceiro níveis, sendo estabelecido como aceitáveis os valores de recuperação entre 70 e 120%.³⁶

Linearidade

A linearidade foi investigada pela curva analítica das amostras do extrato da matriz fortificadas em seis níveis de concentração equidistantes, 2,00, 6,80, 11,6, 16,4, 21,2 e 26,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ELL-PBT e 3,10, 10,6, 18,1, 25,6, 33,1 e 40,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS, com três replicatas independentes para cada nível. O método dos mínimos quadrados ordinários foi utilizado para estimar os parâmetros de regressão linear. O teste de Jackknife, com número máximo de valores extremos removidos de 22,2% dos dados originais, foi empregado para tratar e confirmar os *outliers*. A análise de regressão foi avaliada pelos parâmetros de normalidade (teste de Ryan e Joiner), independência (teste de Durbin e Watson) e homocedasticidade (teste de Brown e Forsythe). A análise de variância (ANOVA) foi aplicada às curvas analíticas para testar a falta de ajuste de linearidade e significância da regressão.

Efeito de matriz

O efeito de matriz foi determinado a partir da preparação de curvas analíticas do 2,4-D em acetonitrila e em extratos de matriz, em seis níveis de concentração equidistantes, 2,00, 6,8, 11,6, 16,4, 21,2 e 26,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ELL-PBT e 3,10, 10,6, 18,1, 25,6, 33,1, 40,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS, sendo três repetições independentes para cada nível. A análise dos dados obtidos foi desenvolvida de acordo com o procedimento descrito para a linearidade. O efeito de matriz foi investigado pelo cálculo da razão entre os

coeficientes angulares obtidos na curva analítica do extrato da matriz e da curva analítica em acetonitrila, multiplicado por 100, de acordo com a Eq. (1).

$$EM (\%) = \frac{a_{\text{matriz}}}{a_{\text{solvente}}} \times 100 \quad (1)$$

onde: EM: efeito de matriz, a_{matriz} : coeficiente angular da curva analítica em extrato da matriz; a_{solvente} : coeficiente angular da curva analítica em solvente.

Para a interpretação do resultado, foi considerado que o valor equivalente a 100% indica ausência de efeito de matriz. Se o valor for inferior a 100% significa supressão da área do analito, promovida pela matriz. Se o resultado for superior a 100%, indica incremento da resposta do analito, provocada pela matriz.³⁷

Amostras reais

Após serem otimizadas e validadas, as metodologias ELL-PPBT e QuEChERS foram aplicadas em oito amostras de águas superficiais e duas amostras de águas subterrâneas coletadas no município de Turmalina, Minas Gerais, Brasil. Nós escolhemos essa região devido à presença de extensas plantações de eucalipto e, conseqüentemente, provável uso intensivo do 2,4-D. Considerando que esse herbicida é fracamente retido pela maioria dos solos e apresenta elevada solubilidade em água,^{6,9} as fontes de água localizadas próximas às plantações de eucaliptos têm alto potencial de serem contaminadas pelo 2,4-D.

Estabilidade do 2,4-D em água

Foi desenvolvido um experimento para avaliar a estabilidade do 2,4-D em água, simulando condições ambientais. Foram adicionados 700 mL de água purificada em frasco de vidro de 1 L. O mesmo procedimento foi realizado utilizando amostras de água subterrânea da cidade de Montes Claros, isentas de 2,4-D. Posteriormente, ambas as amostras foram fortificadas com o 2,4-D, obtendo a concentração inicial de 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os frascos foram hermeticamente fechados, a fim de evitar a evaporação da água, e mantidos em ambiente com recebimento da luz solar durante todo o dia.

O experimento foi desenvolvido por 60 dias e, em intervalos de 5 dias, foram coletadas alíquotas das amostras de água para a determinação do 2,4-D através da extração pela metodologia ELL-PBT e quantificação por HPLC-DAD. Posteriormente, os frascos foram homogeneizados para manter o ambiente sob condição aeróbica. O experimento foi realizado em triplicata e foi calculada a concentração média do 2,4-D.

Resultados e Discussão

Otimização das condições cromatográficas

Para a otimização das condições de análise do 2,4-D por HPLC-DAD, o comprimento de onda foi o primeiro parâmetro avaliado. Estudos anteriores para detecção do 2,4-D já empregaram 200 nm,³³ 220

nm,^{17,38} 228 nm,³⁹ 280 nm,^{5,35} e 284 nm.⁴⁰ O espectro de absorção na região do ultravioleta mostrou que a solução do 2,4-D na concentração de 1,00 mg L⁻¹ apresentou bandas de absorção em 200, 228 e 284 nm, como pode ser observado na Figura 1.

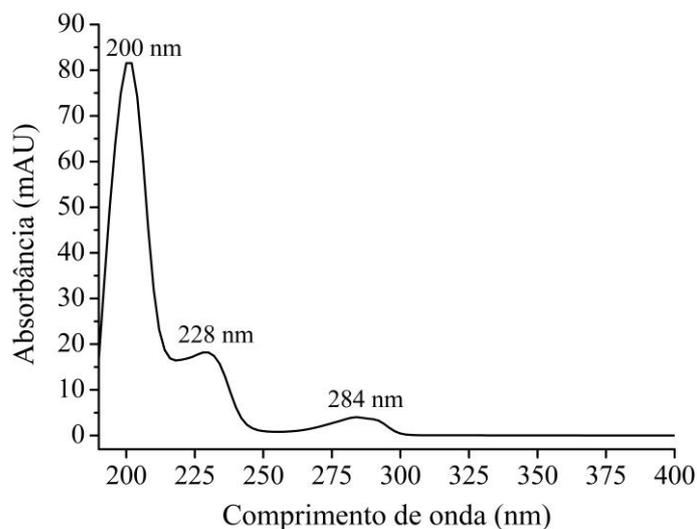


Figura 1. Espectro de absorção na região ultravioleta da solução padrão de 2,4-D em acetonitrila na concentração de 1,00 mg L⁻¹.

Nós observamos que o monitoramento do 2,4-D em 200 e 228 nm apresentou picos com maiores intensidades e áreas cromatográficas. Entretanto, os cromatogramas obtidos apresentaram maior quantidade de picos interferentes, como pode ser visto na Figura 2 a e b.

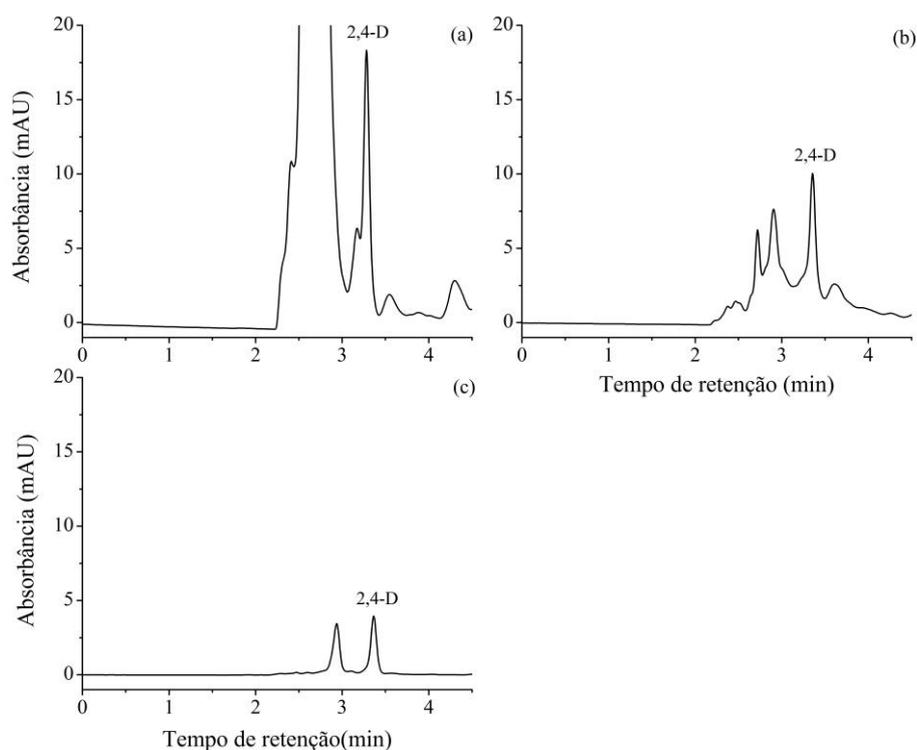


Figura 2. Cromatogramas da solução padrão de 2,4-D em acetonitrila na concentração de 1,00 mg L⁻¹ nos comprimentos de onda de (a) 200 nm, (b) 228 nm e (c) 284 nm.

Apesar de ter apresentado pico com menor intensidade se comparado aos demais comprimentos de onda, o monitoramento do analito alvo em 284 nm permitiu obter melhor seletividade e menor quantidade de picos interferentes no cromatograma obtido, conforme Figura 2 c. Dessa forma, 284 nm foi escolhido para a quantificação do 2,4-D.

O segundo parâmetro que analisamos para a otimização das condições cromatográficas foi a proporção da fase móvel no modo isocrático. Fases móveis com características ácidas são amplamente utilizadas para detecção do 2,4-D.^{33,35,40-43} Por ser um composto ionizável com pKa 2,80, devido a presença do grupo ácido carboxílico em sua molécula,⁴ o 2,4-D tende a ser pouco retido em coluna de fase reversa.³³ Nesse caso, o ideal é que a fase móvel empregada tenha reduzido valor de pH, pois essa condição influencia na ionização de ácidos, aumentando a retenção em coluna de fase reversa.^{16,33,44} Conseqüentemente, a forma molecular do 2,4-D passa a ter melhor interação com a coluna, promovendo melhor resolução.⁴²

Por essas razões, nós decidimos utilizar a fase móvel constituída por acetonitrila/água com pH = 3,00 ajustado com H₃PO₄. O 2,4-D foi detectado em todas as proporções estudadas, como pode ser observado nos cromatogramas apresentados na Figura 3.

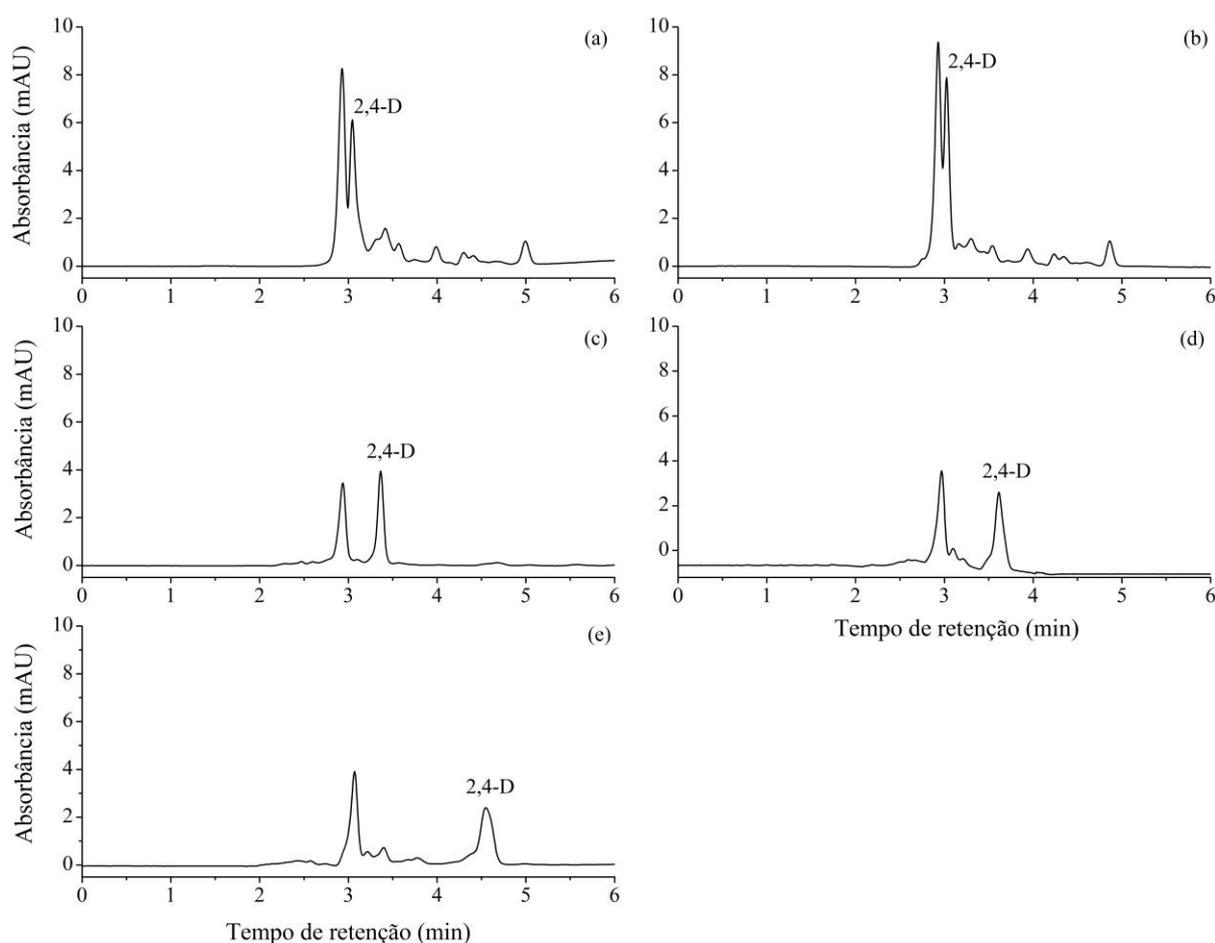


Figura 3. Cromatogramas da solução padrão de 2,4-D em acetonitrila na concentração de 1,00 mg L⁻¹, obtidos por HPLC-DAD empregando fase móvel composta por acetonitrila e água com pH = 3,00 ajustado com H₃PO₄ nas proporções de (a) 95/05, (b) 85/15, (c) 75/25, (d) 65/35 e (e) 55/45 (v/v).

Empregando as proporções 95/05 e 85/15 (v/v), nós observamos baixa resolução cromatográfica. Nas proporções, 65/35 e 55/45 (v/v) o sinal cromatográfico do 2,4-D apresentou base alargada e menor intensidade. Conforme apresentado na Figura 3 c, empregando a proporção 75/25 (v/v) foi a que observamos melhor resolução para o monitoramento do 2,4-D, sendo escolhida essa proporção da fase móvel.

O terceiro parâmetro estudado para a otimização das condições cromatográficas foi o melhor fluxo para a fase móvel, sendo avaliados os fluxos de 1,0, 0,80 e 0,50 mL min⁻¹. Nós observamos que o cromatograma obtido utilizando o fluxo de 0,50 mL min⁻¹ apresentou maior resolução, intensidade e área cromatográfica correspondente ao 2,4-D, como pode ser observado na Figura 4 c, sendo escolhido esse fluxo.

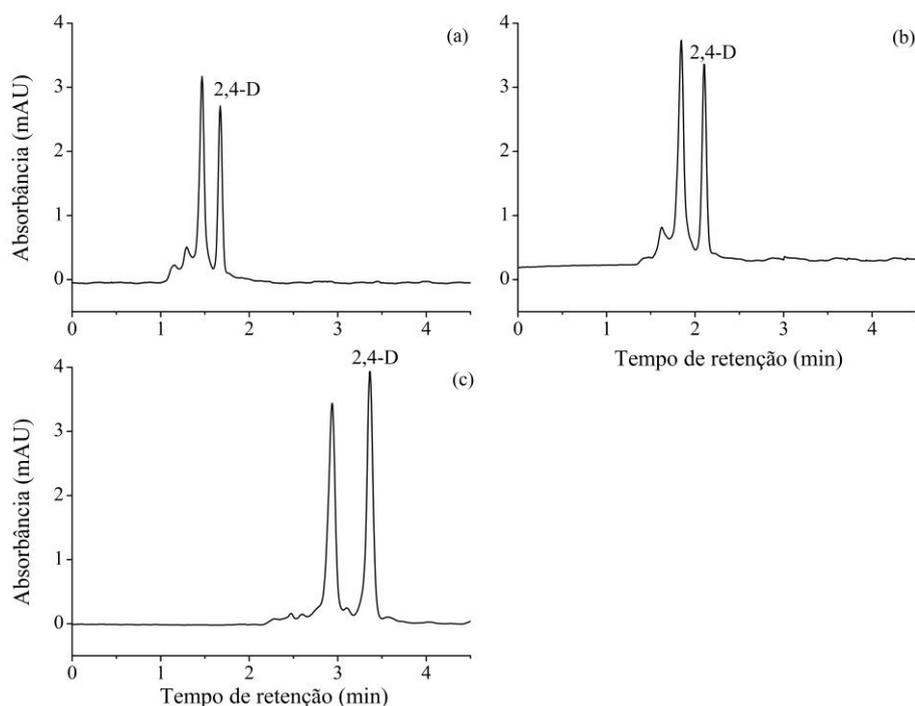


Figura 4. Cromatogramas da solução padrão de 2,4-D em acetonitrila na concentração de 1,00 mg L⁻¹, obtidos por HPLC-DAD empregando fluxo de (a) 1,0 mL min⁻¹, (b) 0,80 mL min⁻¹ e (c) 0,50 mL min⁻¹.

O cromatograma obtido após a otimização das condições cromatográficas para a detecção do 2,4-D por HPLC-DAD é apresentado na Figura 5.

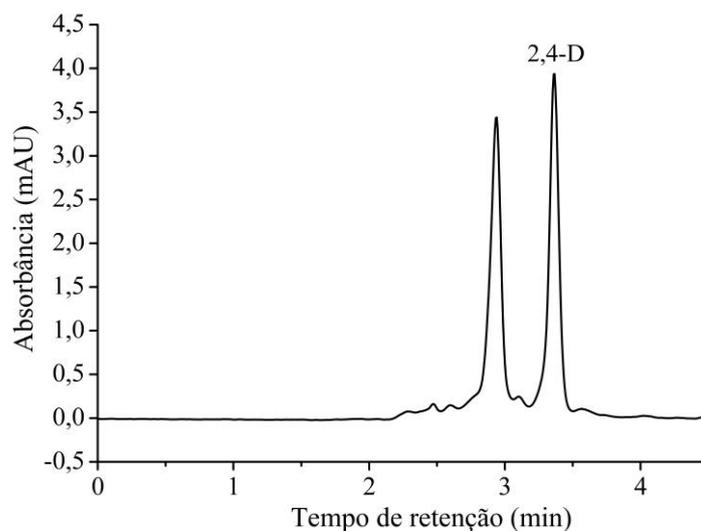


Figura 5. Cromatograma da solução padrão do 2,4-D em acetonitrila na concentração de 1,00 mg L⁻¹.

ELL-PBT

A ELL-PBT baseia-se na adição de solvente orgânico à amostra aquosa, usualmente na proporção 2/1 (v/v).²⁴ Posteriormente, a mistura é homogeneizada e submetida à redução de temperatura a - 20 °C, para congelamento da fase aquosa e formação de um sistema bifásico. O tempo de 1 h. tem sido relatado como adequado para o congelamento da fase aquosa.^{45,46} Dessa forma, a fração aquosa e seus componentes são congelados e o analito de interesse é extraído pela fração orgânica líquida, não sendo necessária etapa de limpeza.^{47,48}

As porcentagens de extração obtidas para as três fases extratoras avaliadas na otimização da metodologia ELL-PBT são apresentadas na Figura 6.

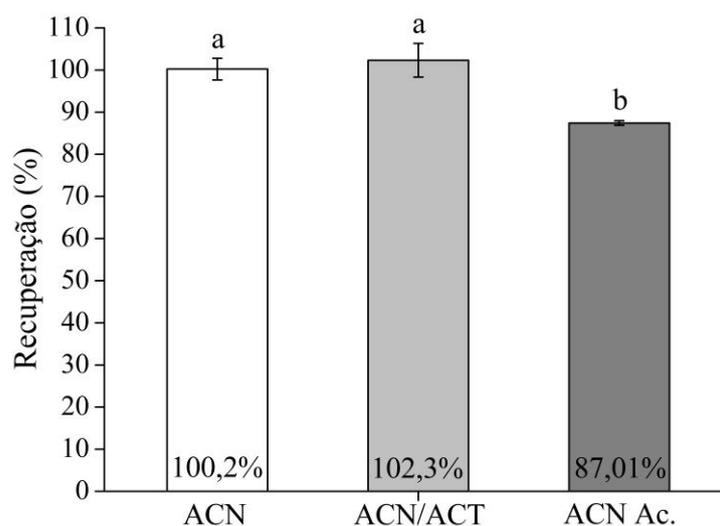


Figura 6. Porcentagens de recuperação do 2,4-D na otimização da metodologia ELL-PBT. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. ACN = acetonitrila; ACN/ACT = acetonitrila/acetato de etila; ACN Ac. = acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético.

Nós avaliamos a fase extratora mais polar constituída por acetonitrila acidificada com ácido acético 1% (v/v), pois o 2,4-D é um composto ionizável que apresenta elevada solubilidade em água. Por isso, estudos indicam que condições ácidas influenciam na forma de ionização desse composto e, conseqüentemente, em sua solubilidade em água, permitindo a sua extração pelo solvente orgânico.⁴⁹ Entretanto, como pode ser observado na Figura 6, essa condição apresentou menor porcentagem de recuperação.

Esse resultado pode ser atribuído ao fato de a fase extratora não ter congelado completamente no período de 1 h. Similarmente, estudos prévios relataram que o aumento da polaridade da mistura extratora dificultou o congelamento da fase aquosa e, conseqüentemente, a eficiência da extração foi reduzida.²⁴ A porcentagem de recuperação é reduzida quando uma quantidade relevante de água permanece na fração orgânica.⁴⁶

Conforme apresentado na Figura 6, as demais fases extratoras avaliadas apresentaram porcentagens de recuperação próximas a 100%. Por isso, nós decidimos não avaliar o tempo de congelamento para a fase extratora constituída por acetonitrila acidificada com ácido acético 1% (v/v), pois haveria a desvantagem do incremento no tempo de preparo de amostra por essa metodologia.

Nós relacionamos as maiores porcentagens de recuperação obtidas empregando as fases extratoras constituídas por acetonitrila e por acetonitrila/acetato de etila ao congelamento completo da fração aquosa no período de 1 h. O congelamento da fração aquosa reduz o volume de líquido e aumenta a concentração do analito, sendo essa a força motriz para sua transferência para a fase orgânica não congelada.²⁶

A análise dos dados indicou que a média das porcentagens de recuperação obtidas nessas duas condições não diferiram estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Por isso, a escolha da melhor fase extratora para essa metodologia foi definida a partir da análise dos cromatogramas obtidos em cada condição, sendo apresentados na Figura 7.

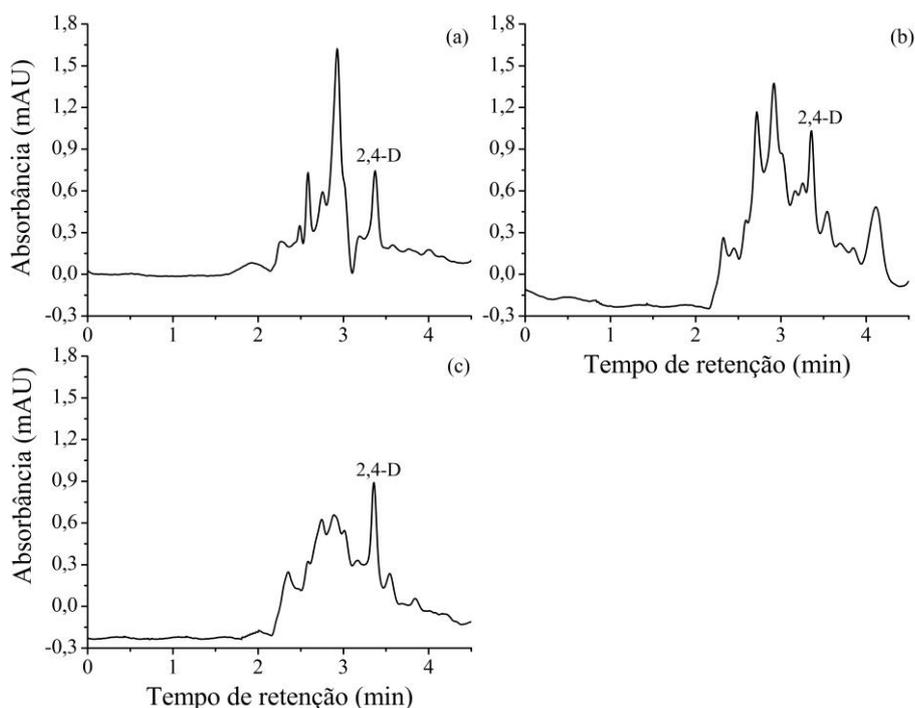


Figura 7. Cromatogramas do extrato fortificado com 2,4-D na concentração de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ na extração pela metodologia ELL-PBT, empregando a fase extratora composta por (a) acetonitrila 8,00 mL, (b) acetonitrila/acetato de etila 6,50/1,50 mL (v/v) e (c) acetonitrila com ácido acético 1% (v/v) 8,00 mL.

Nós observamos que o cromatograma obtido empregando a fase extratora constituída por acetonitrila/acetato de etila apresentou, em relação às demais condições avaliadas, maior quantidade de sinais atribuídos a interferentes, conforme Figura 7 b. Resultados semelhantes empregando essa mesma condição também foram relatados em estudos prévios.^{46,50} Por essas razões, nós escolhemos a fase extratora constituída por acetonitrila para a extração do 2,4-D pela metodologia ELL-PBT. A utilização dessa mesma fase extratora com porcentagem de recuperação próxima a 100% também foi relatada em estudos empregando essa mesma metodologia para determinação de diferentes analitos.^{48,51,52}

Neste estudo, nós adicionamos à ELL-PBT uma etapa adicional de concentração do extrato. Após a extração, 5,00 mL da fração orgânica foram completamente evaporados e ressuspendido em 400 μL de acetonitrila, resultando em um fator de concentração de 12,5 vezes. Essa etapa apresentou como vantagem a redução do LQ para $2,00 \mu\text{g L}^{-1}$. Após a otimização da ELL-PBT, iniciou-se a etapa de validação dessa metodologia.

QuEChERS

QuEChERS é uma metodologia de preparo de amostras proposta por Anastassiades *et al.*²³ Essa metodologia baseia-se na extração em fase única, com a adição de solvente orgânico à amostra aquosa. O sistema é homogeneizado e submetido à etapa de partição através da adição de uma mistura de sais. No extrato obtido, uma etapa adicional de limpeza é executada para remoção de substâncias interferentes e água residual.^{23,53,54} O extrato orgânico final é diretamente passível de análise instrumental, por exemplo, por cromatografia líquida.²⁵

Na abordagem original da metodologia QuEChERS, a etapa de limpeza é realizada com a utilização de MgSO_4 anidro e do sorvente “amina primária secundária” (PSA, do inglês “*Primary Secondary Amine*”). O MgSO_4 promove a remoção de água presente no extrato e, possivelmente, outros componentes via quelação.⁵⁵ O sorvente PSA é um trocador aniônico, que interage fortemente com compostos ácidos, como por exemplo, ácidos graxos e ácidos orgânicos, removendo-os da fase orgânica.⁵⁶ Entretanto, pesticidas ácidos, como o 2,4-D, tendem a ficar fortemente retidos no PSA, resultando em baixas recuperações.^{57,58}

Uma alternativa é utilizar outro sorvente nessa etapa, como a sílica gel funcionalizada com octadecilsilano, conhecido como C18. Porém, a utilização do C18 é mais adequada para amostras contendo níveis de gordura $\geq 2\%$, a fim de eliminar compostos apolares, como substâncias graxas e lipídios,^{53,59} não sendo o caso da matriz avaliada nesse estudo. Dessa forma, pelo fato da água ser uma matriz menos complexa, nós optamos por utilizar nesta etapa apenas 1,00 g de MgSO_4 anidro, visando promover a remoção de água no extrato obtido.

As porcentagens de extração obtidas para as três fases extratoras avaliadas na otimização do método QuEChERS são apresentadas na Figura 8.

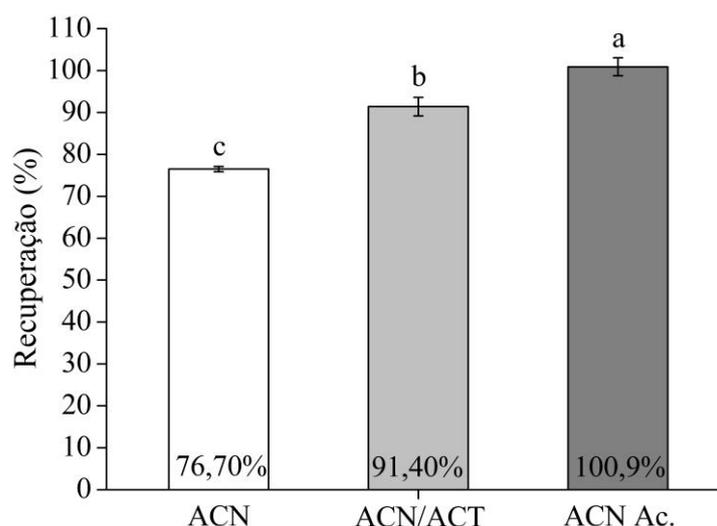


Figura 8. Porcentagens de recuperação do 2,4-D na otimização da metodologia QuEChERS. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. ACN = acetonitrila; ACN/ACT = acetonitrila/acetato de etila; ACN Ac. = acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético.

Como pode ser observado na Figura 8, a maior porcentagem de recuperação do 2,4-D foi obtida empregando a fase extratora constituída por acetonitrila com ácido acético 1% (v/v). Além disso, a análise dos dados indicou que a média das porcentagens de recuperação obtidas em ambas as condições diferiram estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Os cromatogramas obtidos na otimização da metodologia QuEChERS são apresentados na Figura 9.

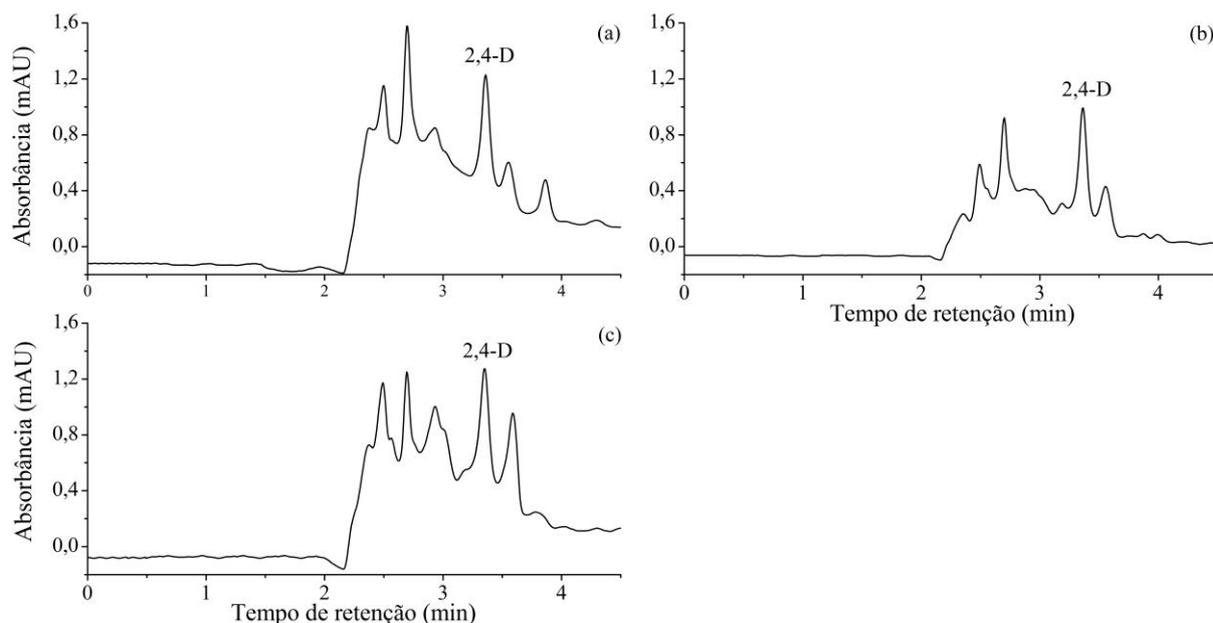


Figura 9. Cromatogramas do extrato fortificado com 2,4-D na concentração de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ na extração pela metodologia QuEChERS, empregando a fase extratora composta por (a) acetonitrila 5,00 mL, (b) acetonitrila com ácido acético 1% (v/v) 5,00 mL (v/v) e (c) acetonitrila/acetato de etila 4,00/1,00 mL.

Nós observamos que, além da elevada porcentagem de recuperação, o cromatograma obtido na condição da fase extratora constituída por acetonitrila com ácido acético 1% (v/v) apresentou menor quantidade de sinais atribuídos a interferentes, se comparado às demais fases extratoras avaliadas, conforme Figura 9 b. Por essas razões, essa fase extratora foi escolhida para a extração do 2,4-D pela metodologia QuEChERS.

Por ser um composto ionizável, o pH é um fator que influencia na extração do 2,4-D, uma vez que espécies carregadas têm menor afinidade por solventes orgânicos.⁶⁰ Estudos prévios demonstram que em condições ácidas, há um aumento na porcentagem de extração desse composto,^{42,61} pois em baixos valores de pH, o 2,4-D apresenta reduzida solubilidade em água e pode ser extraído por solventes orgânicos.¹⁹ Por isso, a fase extratora constituída por acetonitrila acidificada com ácido acético apresentou maior porcentagem de recuperação em relação às demais. Estudos de extração do 2,4-D em arroz, leite, frutas e vegetais empregando o método QuEChERS também utilizaram acetonitrila acidificada como fase extratora.^{30,43,61,62}

A ausência de etapa de concentração do extrato tem sido relatada como a principal desvantagem do método QuEChERS, podendo resultar em LQ mais alto, quando comparado a outras técnicas de preparo de amostras.^{28,63} Por isso, neste estudo nós introduzimos uma etapa adicional de concentração do extrato obtido. Após os procedimentos de extração, 3,20 mL da fração orgânica foram completamente evaporados usando fluxo de ar e ressuspensado em 400 μL de acetonitrila. A adição dessa etapa resultou em um fator de concentração de 8,0 vezes, promovendo a redução do LQ para $3,10 \mu\text{g L}^{-1}$. Após a otimização do método QuEChERS, nós iniciamos a etapa de validação dessa metodologia.

Validação das metodologias

Neste estudo, os parâmetros avaliados para a validação das metodologias ELL-PBT e QuEChERS foram seletividade, LQ, exatidão, precisão, linearidade e efeito de matriz.

Seletividade

A seletividade das metodologias propostas foi determinada a partir da comparação entre cromatogramas da matriz isenta do analito alvo (branco) e da matriz fortificada com o 2,4-D. Verificou-se que ambas as metodologias foram seletivas para o monitoramento do analito de interesse, pois, nos cromatogramas das amostras do branco da matriz, não foram detectados sinais de interferentes no mesmo tempo de retenção do 2,4-D, conforme apresentado na Figura 10.

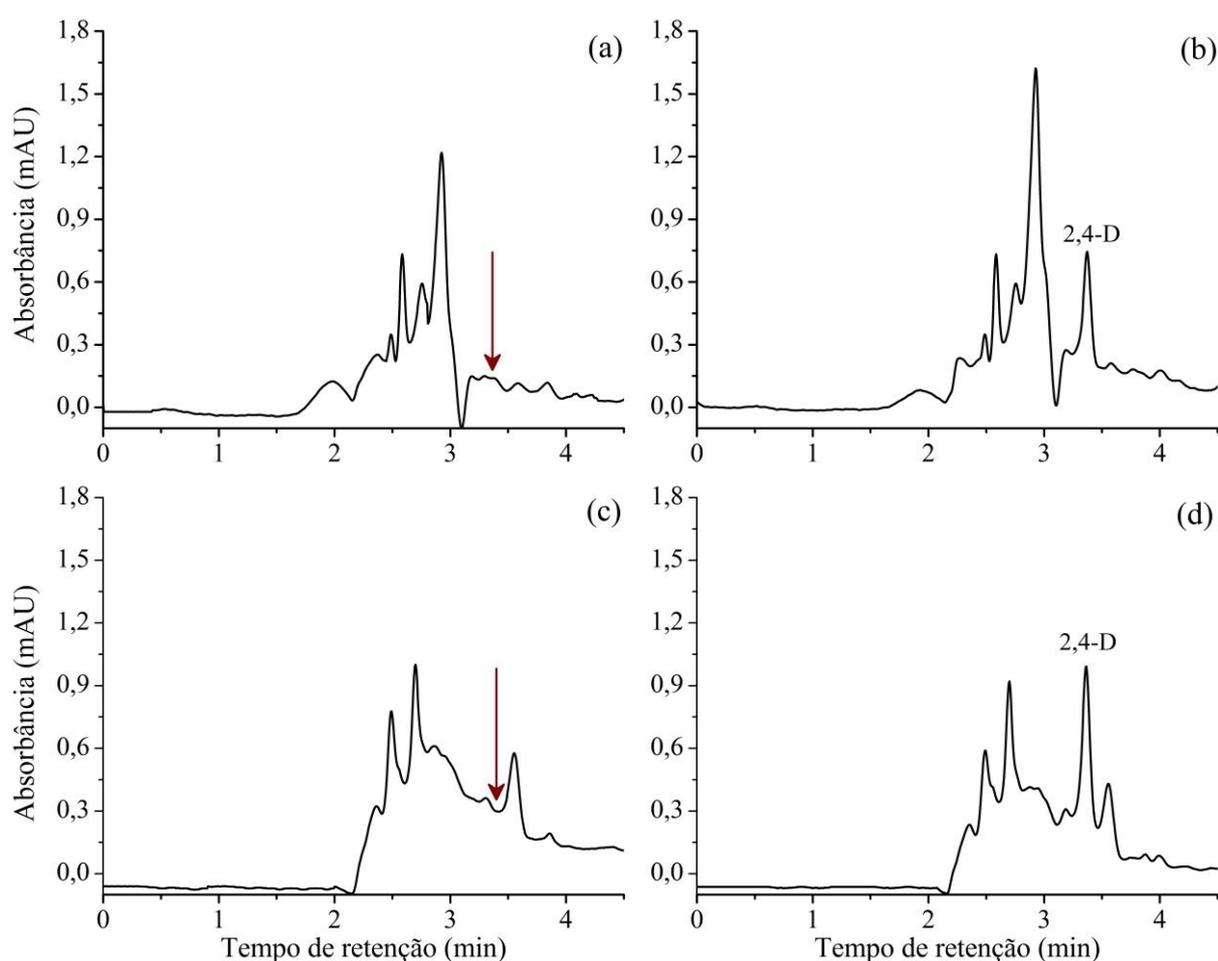


Figura 10. Cromatogramas da matriz isenta do composto (a) e da matriz fortificada com o 2,4-D na concentração de 250 µg L⁻¹ (b) na ELL-PBT e cromatogramas da matriz isenta do composto (c) e da matriz fortificada com o 2,4-D na concentração de 250 µg L⁻¹ (d) na metodologia QuEChERS.

Limite de Quantificação

O LQ foi determinado considerando a concentração do 2,4-D na matriz submetida aos procedimentos de extração, que resultou em um pico 10 vezes maior do que o ruído da linha de base obtida no cromatograma da extração da matriz isenta do analito de interesse. O LQ obtido nas metodologias ELL-PBT e QuEChERS é apresentado na Tabela 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Resultados da validação da metodologia ELL-PBT

Metodologia	Faixa de linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	Recuperação média \pm DPR (%)			LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
			2,0 $\mu\text{g L}^{-1a}$	11,6 $\mu\text{g L}^{-1b}$	21,2 $\mu\text{g L}^{-1a}$	
ELL-PBT	2,00-26,0	0,99996	97,90 \pm 0,8	100,4 \pm 9,5	100,1 \pm 1,5	2,00

^a Média de três repetições ^b Média de 7 repetições

Tabela 3. Resultados da validação da metodologia QuEChERS

Metodologia	Faixa de linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	Recuperação média \pm DPR (%)			LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
			3,1 $\mu\text{g L}^{-1a}$	18,1 $\mu\text{g L}^{-1b}$	33,1 $\mu\text{g L}^{-1a}$	
QuEChERS	3,10-40,6	0,99990	94,4 \pm 4,6	97,8 \pm 7,9	97,3 \pm 9,3	3,10

^a Média de três repetições ^b Média de 7 repetições

Os valores de LQ alcançados na ELL-PBT e QuEChERS foram inferiores ao LMR do 2,4-D em água, recomendados pelas legislações brasileiras, através da Resolução nº 357 de 2005 do CONAMA⁶⁴ e da Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde de 2017,¹⁰ que estipulam os limites de 4,00 e 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os valores de LQ obtidos também foram inferiores aos estabelecidos pelas agências internacionais, OMS¹³ e USEPA,¹² que estabelecem limites correspondentes a 30,0 e 70,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Dessa forma, esses resultados demonstram eficiência das metodologias propostas para o monitoramento do 2,4-D nessa matriz, mesmo em baixas concentrações.

Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão das metodologias propostas foram determinadas simultaneamente. Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os resultados da média das porcentagens de recuperação e DPR obtidos na ELL-PBT e QuEChERS, respectivamente.

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade, expressa como DPR. Os valores de DPR obtidos na ELL-PBT e QuEChERS foram inferiores a 20%, confirmando a precisão das metodologias propostas.³⁶

A exatidão de ambas as metodologias foi determinada em termos de recuperação e apresentou resultados adequados ao estabelecido pela União Europeia, que define como aceitável a porcentagem de recuperação compreendida entre 70 a 120%.³⁶

Linearidade

A linearidade das metodologias ELL-PBT e QuEChERS foi analisada pelas curvas analíticas das amostras do extrato da matriz fortificadas em seis níveis equidistantes de concentração, em três repetições independentes. Todos os procedimentos de avaliação da linearidade das metodologias estudadas foram desenvolvidos de acordo com os procedimentos descritos por Souza e Junqueira⁶⁵ e Bazílio *et al.*⁶⁶

Os parâmetros da regressão linear foram analisados através do método dos mínimos quadrados ordinários. Todos os *outliers* foram tratados e confirmados pelo teste de Jackknife, apresentado na Figura 11. Na metodologia ELL-PBT foram removidos um total de quatro valores extremos, correspondendo ao limite máximo de exclusão dos dados (22,2%). A metodologia QuEChERS não apresentou valores extremos.

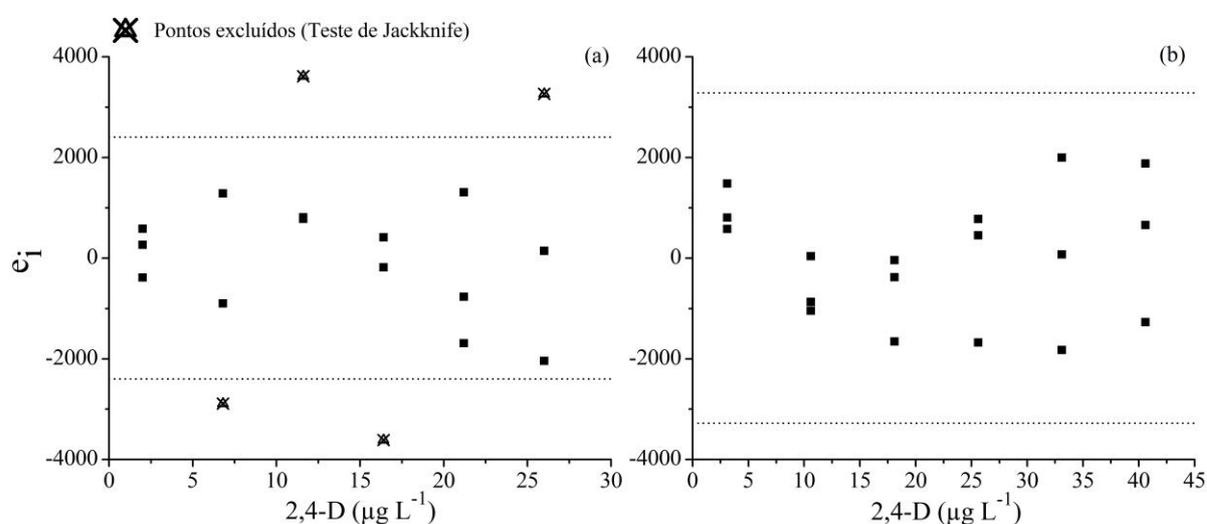


Figura 11. Teste residual de Jackknife, com exclusão dos valores extremos, para as metodologias (a) ELL-PBT e (b) QuEChERS. e_i = resíduo da regressão.

O teste de Ryan-Joiner indicou distribuição normal dos resíduos de regressão das metodologias propostas, obtendo coeficientes de correlação superiores ao coeficiente de correlação crítico, conforme apresentado na Figura 12.

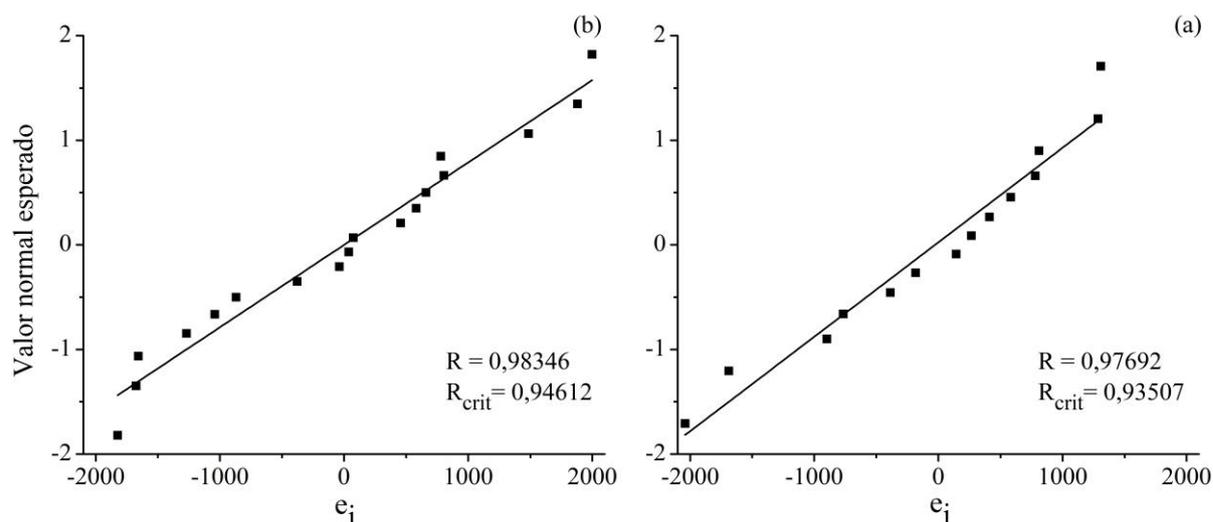


Figura 12. Normalidade dos resíduos de regressão pelo teste Ryan-Joiner para as metodologias (a) ELL-PBT e (b) QuEChERS. R: coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner.

A homocedasticidade dos resíduos de regressão foi confirmada através do teste de Brown e Forsythe e da distribuição homogênea dos resíduos ao longo dos níveis de concentração. O teste de Durbin e Watson e a distribuição aleatória dos resíduos nos quatro quadrantes, conforme observado na Figura 13, demonstraram a independência dos resíduos de regressão.

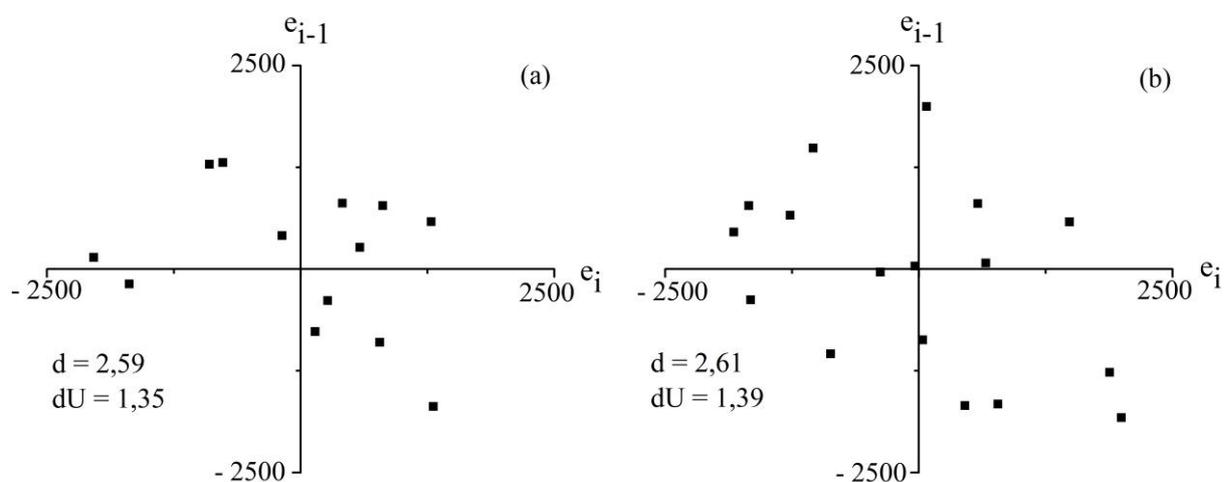


Figura 13. Independência dos resíduos de regressão pelo teste de Durbin e Watson para as metodologias (a) ELL-PBT e (b) QuEChERS. d: estatísticas de Durbin-Watson.

A ANOVA indicou regressão significativa e desvio de linearidade não significativo, indicando ajuste dos dados ao modelo linear na faixa de 2,00 – 26,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 3,10 – 40,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as metodologias ELL-PBT e QuEChERS, respectivamente. Portanto, através do método dos mínimos quadrados ordinários e ANOVA, nós constatamos que as metodologias ELL-PBT e QuEChERS acopladas à HPLC-DAD foram lineares para a determinação do 2,4-D.

Efeito de Matriz

O efeito de matriz das metodologias ELL-PBT e QuEChERS foi avaliado a partir da análise de curvas analíticas do 2,4-D preparadas em acetonitrila e em extratos da matriz. A análise dos dados obtidos foi realizada de acordo com o procedimento descrito para a linearidade, obtendo-se a equação de regressão ajustada para cada curva analítica das metodologias propostas, apresentadas na Figura 14.

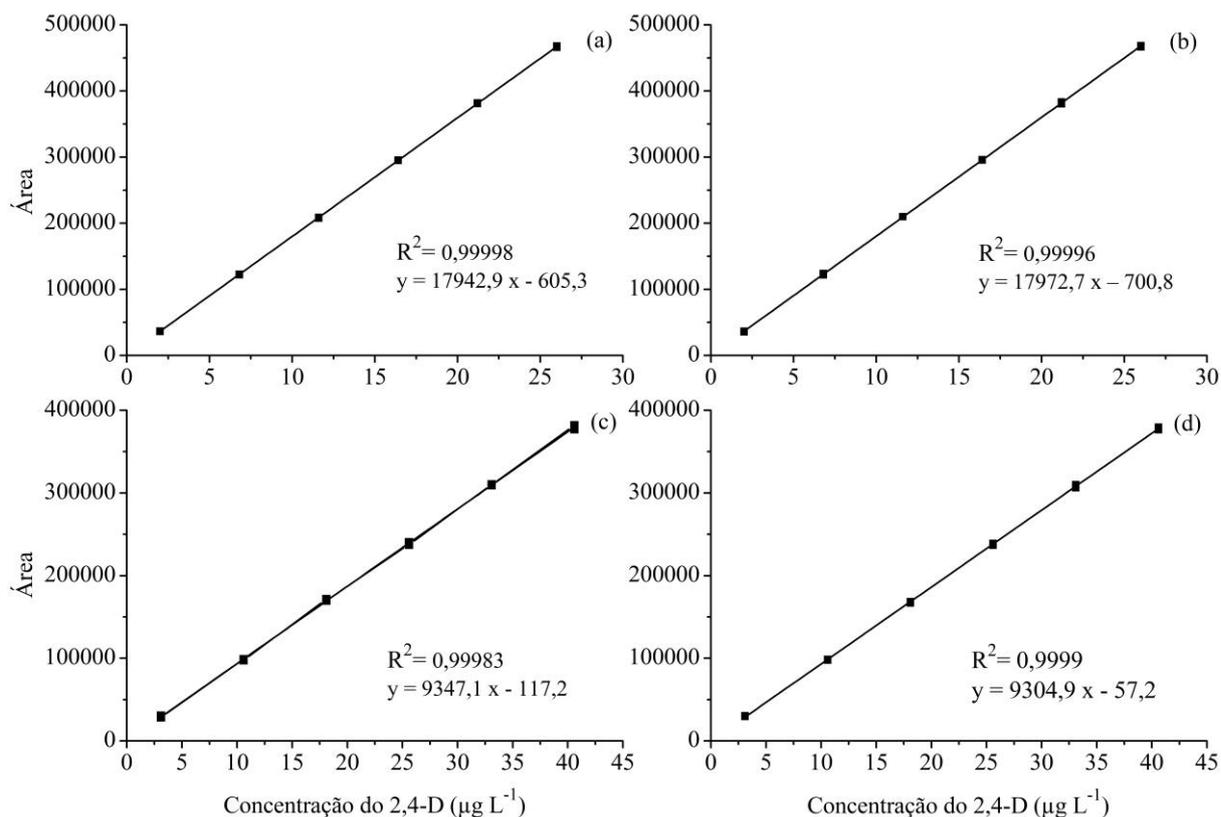


Figura 14. Curvas analíticas obtidas das soluções de 2,4-D em (a) solvente acetonitrila e em (b) extratos da matriz pela metodologia ELL-PBT. Curvas analíticas obtidas das soluções de 2,4-D em (c) solvente acetonitrila e em (d) extratos da matriz pela metodologia QuEChERS. Respectivas equações da reta e coeficientes de determinação (R^2).

Após ser calculada a razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas, e multiplicado esse valor por 100, foram obtidos os valores de 100,2% e 99,60% para as metodologias ELL-PBT e QuEChERS, respectivamente. Esse resultado, equivalente a 100%, indica ausência do efeito de matriz nas metodologias estudadas.³⁷

O efeito de matriz na determinação do 2,4-D em água foi observado em estudos empregando LC-MS-MS²⁰ e UHPLC-MS-MS.⁸ Entretanto, similarmente aos resultados obtidos, a maioria dos estudos para quantificação do 2,4-D em água indicou ausência do efeito de matriz.^{16,21,35} O efeito da matriz é considerado como uma supressão ou aprimoramento da resposta do analito devido à coeluição dos constituintes da matriz.⁶⁷ Por isso, a variação da resposta cromatográfica tende a ser mais significativa em matrizes mais complexas e menos significativa ou inexistente em matrizes mais simples, como a água.

Comparação entre as metodologias

As metodologias tradicionais, SPE e LLE são amplamente utilizadas para a extração de pesticidas em amostras aquosas, incluindo o 2,4-D, devido à eficiência, concentração dos analitos e por atingirem reduzidos limites de quantificação, sendo aceitas como metodologias de referência. Entretanto, o alto volume de solvente orgânico e amostra requerido, bem como o uso de vidrarias, equipamentos, e cartuchos que possuem elevado custo financeiro limitam o uso das metodologias SPE e LLE.⁶⁸

Por isso, a extração do 2,4-D em amostras de água por metodologias alternativas tem sido relatada na literatura científica, incluindo a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), microextração líquido-líquido dispersiva particionada (PDLLME) e a extração magnética em fase sólida (MSPE).

Nesse estudo, as metodologias ELL-PBT e QuEChERS foram otimizadas e validadas para a extração do 2,4-D em amostras de água. Esses dois métodos são considerados mais simples, práticos e acessíveis em relação à SPE e LLE, devido ao consumo reduzido de solventes orgânicos e amostras, além de não exigir cartuchos, vidrarias ou equipamentos especiais.^{52,69}

Foi realizada a análise comparativa entre as metodologias otimizadas e validadas nesse estudo, metodologias tradicionais e metodologias alternativas, para o preparo de uma única amostra. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Análise comparativa entre as metodologias ELL-PBT, QuEChERS, metodologias tradicionais e metodologias alternativas para preparo de uma única amostra

Parâmetro	Metodologias validadas		Metodologias tradicionais		Metodologias alternativas		
	ELL-PBT	QuEChERS	SPE ³³	LLE ¹⁸	DLLME ³⁵	PDLLME ⁷⁰	MSPE ²²
Técnica de análise	HPLC-DAD	HPLC-DAD	HPLC-DAD	HPLC-UV	HPLC-UV	HPLC-UV	HPLC-UV
Etapa de derivatização	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Etapa de limpeza	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Recuperação (%)	100,2	100,9	101,0	73,0	98,1	100,6	95,30
DPR (%)	2,58	2,15	8,10	6,00	5,10	3,00	9,3
Número de etapas	9	11	8	9	5	6	5
Quantidade de sais (g)	0,375	3,50	0	200	0	0	0
Volume de solvente orgânico (mL)	8,00	5,00	11,0	100	1,57	2,00	0,22
Volume de amostra (mL)	4,00	5,00	50,0	50,0	7,00	5,00	50,0
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,00	3,10	1,00	0,300	0,600	3,10	5,00

ELL-PBT = Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura; QuEChERS = *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe* / SPE = Extração em fase sólida / LLE = Extração Líquido-Líquido / DLLME = Microextração Líquido-Líquido Dispersiva / PDLLME = Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Particionada / MSPE = extração magnética em fase sólida / HPLC= Cromatografia em fase líquida de alta eficiência / DAD = Detector de arranjo de diodos / UV= Detector ultravioleta / DPR = Desvio Padrão Relativo / LQ = Limite de Quantificação

Conforme observado na Tabela 4, a cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada aos detectores ultravioleta e arranjo de diodos, corresponde às principais técnicas de análise do 2,4-D, pois não requerem etapa de derivatização do extrato obtido. A análise comparativa indicou que todas metodologias avaliadas foram eficientes para a determinação do 2,4-D em água, com porcentagens de recuperação próximas a 100% (com exceção da LLE que obteve 73% de recuperação), DPR inferior a 10% e ausência da etapa de limpeza.

Como pode ser observado na Tabela 4, o volume de solvente orgânico e amostra requerido foi maior nas metodologias tradicionais LLE e SPE. O LQ das metodologias em estudo, foi superior ao das metodologias SPE, LLE e DLLME, e inferior ao LQ das metodologias PDLLME e MSPE.

As metodologias ELL-PBT e QuEChERS, otimizadas e validadas nesse estudo, apresentaram similaridade em seus procedimentos de extração e possuem princípios de extração do analito baseado na partição com a formação de um sistema bifásico. Enquanto na ELL-PBT a partição ocorre por meio da redução da temperatura,²⁴ no método QuEChERS é promovida a partir da adição de sais que promovem o efeito *salting-out*.²³

As metodologias em estudo apresentaram resultados semelhantes e, através da análise comparativa, nós verificamos que a ELL-PBT apresentou, menor quantidade de etapas, reduzido consumo de sais e amostra e menor LQ, em relação a metodologia QuEChERS.

Amostras reais

Após a validação das metodologias ELL-PBT e QuEChERS, nós analisamos dez amostras reais, sendo oito de águas superficiais e duas de águas subterrâneas, e os resultados indicaram que o 2,4-D não foi quantificado em nenhuma das amostras. Resultados semelhantes também foram obtidos em estudos similares empregando HPLC-UV^{35,41}, LC-MS/MS²¹ e cromatografia por multisseringa acoplada à detecção ultravioleta (MSC-UV).¹⁶

A não quantificação do 2,4-D nas amostras reais analisadas pode estar relacionada às amostras não estarem contaminadas com esse herbicida, ou o resíduo desse composto estar abaixo do LQ atingido, ou pode estar relacionada ao período de degradação desse composto na água. Por isso, nós avaliamos a estabilidade do 2,4-D em água sob condições ambientais.

Estabilidade do 2,4-D em água

Nesse experimento, a concentração inicial de 2,4-D nas amostras de água foi de 25,0 µg L⁻¹, pois se encontra dentro da faixa de linearidade da ELL-PBT. Nós escolhemos essa metodologia de extração para realização desse estudo, pois, através da análise comparativa, observamos que a ELL-PBT apresentou menor quantidade de etapas, reduzido consumo de sais e amostra e menor LQ, em relação à metodologia QuEChERS. Considerando que, geralmente, a contaminação da água pelo 2,4-D ocorre em baixas concentrações, nós avaliamos que o LQ foi o principal parâmetro que influenciou essa escolha. Os resultados obtidos no estudo de estabilidade do 2,4-D em água são apresentados na Figura 15.

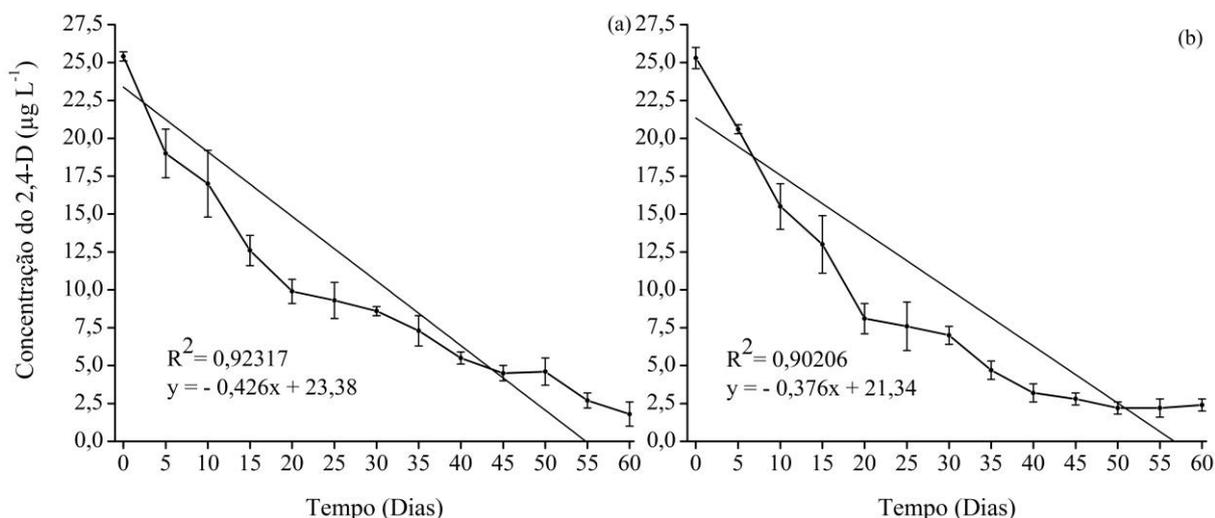


Figura 15. Concentração média do 2,4-D nas amostras de (a) água purificada e (b) subterrânea, em intervalos de 5 em 5 dias.

Nós observamos que os valores de concentração do 2,4-D foram equivalentes nas amostras de água purificada e de água subterrânea. Verificamos que a estabilidade desse composto nas diferentes amostras apresentou similaridade entre si, como pode ser visto na Figura 15.

O tempo de meia-vida corresponde ao tempo necessário para que 50% da concentração inicial da substância química desapareçam.⁷¹ Esse parâmetro pode indicar se o pesticida persistirá ou não no ambiente ao longo do tempo.⁷¹ Conforme pode ser visualizado na Figura 7, o tempo de meia-vida do 2,4-D foi de aproximadamente 15 dias. Nesse período, a concentração média do 2,4-D foi de 12,6 e 13,0 µg L⁻¹, nas amostras de água purificada e subterrânea, respectivamente, sendo similar ao reportado pela USEPA.¹⁴ De acordo com a agência, o 2,4-D é degradado rapidamente em ambientes aquáticos aeróbicos, com tempo de meia-vida de 15 dias, e é relativamente persistente em ambientes aquáticos anaeróbicos, com tempo de meia-vida entre 41 a 333 dias.¹⁴

Como pode ser observado na Figura 15, após 60 dias do início do experimento, a concentração do 2,4-D foi de 1,90 e 2,30 µg L⁻¹, para as amostras de água purificada e subterrânea, respectivamente. Esses valores de concentração são equivalentes ao LQ da metodologia ELL-PBT, que foi de 2,00 µg L⁻¹.

Esse resultado indica que, após 60 dias de contaminação da água, essa metodologia não consegue quantificar o 2,4-D em amostras de água. Esse período de tempo pode ser um dos fatores atribuídos a não quantificação de nenhum resíduo desse herbicida nas amostras reais.

Conclusão

As metodologias ELL-PBT e QuEChERS acopladas ao HPLC-DAD foram otimizadas e validadas neste estudo para determinação de 2,4-D em amostras de água. Ambas as metodologias foram seletivas, precisas, exatas, lineares, sem efeito de matriz e os limites de quantificação atingidos atenderam às legislações nacionais e internacionais. Por isso, essas metodologias representam alternativas eficientes para o monitoramento do 2,4-D nessa matriz. Verificamos que a ELL-PBT apresentou, em relação ao método QuEChERS, menor quantidade de etapas, menor consumo de sais e amostra e menor limite de quantificação. A aplicação em amostras reais não revelou nenhuma amostra contaminada por 2,4-D. Esse

resultado pode estar associado a realmente não ter esse composto nas amostras, ou os níveis de concentração estarem inferiores ao limite de quantificação. Além disso, esse herbicida pode ter sido degradado, pois verificamos que, após 60 dias em condições ambientais, a concentração do 2,4-D nessa matriz não pode ser quantificada pela ELL-PBT acoplada à HPLC-DAD.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (420637 / 2016-8 e 308480/2019-8), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-01429-16) e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Referências

1. Ruiz de Arcaute, C.; Soloneski, S.; Larramendy, M. L.; *Ecotox. Environ. Safe.* **2016**, *128*, 222.
2. https://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D27%2B%2B24-D.pdf/8548_d5b3-f306-49df-ac49-4498bc5768d8, accessed in September 2019.
3. Jaafarzadeh, N.; Ghanbari, F.; Ahmadi, M.; *Chem. Eng. J.* **2017**, *320*, 436.
4. Islam, F.; Wang, J.; Farooq, M. A.; Khan, M. S. S.; Xu, L.; Zhu, J.; Zhao, M.; Muños, S.; Li, Q. X.; Zhou, W.; *Environ. Int.* **2018**, *111*, 332.
5. Njoku, V. O.; Islam, Md. A.; Asif, M.; Hameed, B. H.; *J. Environ. Manage.* **2015**, *154*, 138.
6. Souza, F. L.; Sáez, C.; Lanza, M. R. V.; Cañizares, P.; Rodrigo, M. A.; *Sep. Purif. Technol.* **2017**, *178*, 147.
7. Salvatierra-stamp, V.; Muñiz-Valencia, R.; Jurado, J. M.; Ceballos-Magaña, S. G.; *Microchem. J.* **2018**, *140*, 87.
8. Ji, Z.; Cheng, J.; Song, C.; Hu, N.; Zhou, W.; Suo, Y.; Sun, Z.; You, J.; *Talanta* **2019**, *191*, 313.
9. Cai, J.; Zhou, M.; Yang, W.; Pan, Y.; Lu, X.; Serrano, K. G.; *Chemosphere* **2018**, *212*, 784.
10. Portaria de Consolidação nº 5/2017; *Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde.* available at: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html, accessed in November, 2019.
11. WHO; *Guidelines for drinking-water quality, fourth edition*, available at: https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/, accessed in June 2019.
12. USEPA; *O. National Primary Drinking Water Regulations.* available at: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>, accessed August, 2019.
13. WHO; *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*, available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44271/9789241547963_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y, accessed in July, 2019.

14. USEPA, *Reregistration Eligibility Decision (RED) 2,4-D*; EPA 738-R-05-002; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2005. available at: https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/24d_red.pdf, accessed in November, 2019.
15. Loomis, D.; Guyton, K.; Grosse, Y.; El Ghissasi, F.; Bouvard, V.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Mattock, H.; Straif, K.; *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 891.
16. Chávez-Moreno, C. A.; Guzmán-Mar, J. L.; Hinojosa-Reyes, L.; Hernández-Ramírez, A.; Ferrer, L.; Cerdà, V.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 2705.
17. Raks, V. A.; Turchin, V. A.; Zaitsev, V. N.; *J. Water Chem. Technol.* **2015**, *37*, 295.
18. Tran, A. T. K.; Hyne, R. V.; Doble, P.; *Chemosphere* **2007**, *67*, 944.
19. Wen, Y.; Yu, C.; Zhang, J.; Zhu, C.; Li, X.; Zhang, T.; Niu, Z.; *Int. J. Adv. Res. Chem. Sci.* **2015**, *2*, 8.
20. Caldas, S. S.; Rombaldi, C.; de Oliveira Arias, J. L.; Marube, L. C.; Primel, E. G.; *Talanta* **2016**, *146*, 676.
21. Ebrahimi, R.; Feizbakhsh, A.; Es'haghi, A.; *Chromatographia* **2016**, *79*, 515.
22. Moradi Shahrehabak, S.; Saber-Tehrani, M.; Faraji, M.; Shabani, M.; Aberoomand-Azar, P.; *Microchem. J.* **2019**, *146*, 630.
23. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J.; *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412.
24. Vieira, H. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; *Quím. Nova* **2007**, *30*, 535.
25. Ribeiro Begnini Konatu, F.; Breitreitz, M. C.; Sales Fontes Jardim, I. C.; *J. Chromatogr. A* **2017**, *1482*, 11.
26. Barros, A. L. C.; Schmidt, F. F.; de Aquino, S. F.; Afonso, R. J. de C. F.; *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 19962.
27. Araújo, E. A.; Lara, M. C. R.; dos Reis, M. R.; Viriato, R. L. S.; Rocha, R. A. R.; Gonçalves, R. G. L.; Heleno, F. F.; de Queiroz, M. E. L. R.; Tronto, J.; Pinto, F. G.; *Food Anal. Methods* **2016**, *9*, 1344.
28. Garcia, C. V.; Gotah, A.; *J Anal. Methods Chem.* **2017**, *2017*, 1.
29. Carver, Z. A.; Han, A. A.; Timchalk, C.; Weber, T. J.; Tyrrell, K. J.; Sontag, R. L.; Luders, T.; Chrisler, W. B.; Weitz, K. K.; Smith, J. N.; *Toxicology* **2018**, *410*, 171.
30. Sack, C.; Vonderbrink, J.; Smoker, M.; Smith, R. E.; *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9657.
31. Dickow, L. M.; Gerken, D. F.; Sams, R. A.; Ashcraft, S. M.; *J. Anal. Toxicol.* **2001**, *25*, 35.
32. D'Archivio, A. A.; Fanelli, M.; Mazzeo, P.; Ruggieri, F.; *Talanta* **2007**, *71*, 25.
33. Coelho, E. R. C.; Leal, W. P.; Souza, K. B. de; Rozário, A. do; Antunes, P. W. P.; *Eng. Sanit. Ambient.* **2018**, *23*, 1043.
34. Yang, F.; Bian, Z.; Chen, X.; Liu, S. S.; Liu, Y.; Tang, G.; *J. AOAC Int.* **2013**, *96*, 1134.
35. Behbahani, M.; Najafi, F.; Bagheri, S.; Bojdi, M. K.; Hassanlou, P. G.; Bagheri, A.; *Environ. Monit. Assess.* **2014**, *186*, 2609.
36. SANTE/11813/2017; *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed*. Implemented by 01/01/2018, available at: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf, accessed in November, 2019.
37. Chamkasem, N.; Harmon, T.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 4995.
38. Shamsipur, M.; Fattahi, N.; Pirsahab, M.; Sharafi, K.; *J. Sep. Science* **2012**, *35*, 2718.

39. Kashyap, S. M.; Pandya, G. H.; Kondawar, V. K.; Gabhane, S. S.; *J. Chromatogr. Sci.* **2005**, *43*, 81.
40. Tsai, W.-C.; Huang, S.-D.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7846.
41. Amani, V.; Roshan, S.; Asgharinezhad, A. A.; Najafi, E.; Abedi, H.; Tavassoli, N.; Lotfi Zadeh Zhad, H. R.; *Anal. Methods* **2011**, *3*, 2261.
42. Sampaio, M. R. F.; Tomasini, D.; Cardoso, L. V.; Caldas, S. S.; Primel, E. G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 197.
43. Shi, X.; Jin, F.; Huang, Y.; Du, X.; Li, C.; Wang, M.; Shao, H.; Jin, M.; Wang, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 60.
44. Baggiani, C.; Giraudi, G.; Giovannoli, C.; Trotta, F.; Vanni, A.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *883*, 119.
45. Rudakov, O. B.; Khorokhordina, E. A.; Preobrazhenskii, M. A.; Rudakova, L. V.; *Russ. J. Phys. Chem.* **2016**, *90*, 1665.
46. Sicupira, L.; Tiago, J.; de Pinho, G.; Silvério, F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, *30*, 1284.
47. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; de Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O.; *Food Control* **2010**, *21*, 1307.
48. Rego, E. C. P.; Guimarães, E. de F.; dos Santos, A. L. M.; Mothé, E. de S. M.; Rodrigues, J. M.; Pereira Netto, A. D.; *Anal. Methods* **2015**, *7*, 4699.
49. Melo, A.; Mansilha, C.; Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L.V. O.; *Food Anal. Methods* **2013**, *6*, 559.
50. Silvério, F. O.; Silva, J. G. S.; Aguiar, M. C. S.; Cacique, A. P.; Pinho, G. P.; *Quím. Nova* **2012**, *35*, 2052.
51. Mesquita, T. C. R.; Santos, R. R.; Cacique, A. P.; De SÁ, L. J.; Silvério, F. O.; Pinho, G. P.; *J. Environ. Sci. Health B.* **2018**, *53*, 199.
52. Paula, C.; Jurisch, M.; Piccin, E.; Augusti, R.; *Drug Test. Anal.* **2018**, *10*, 1348.
53. Cabrera, L. C.; Martins, M. L.; Primel, E. G.; Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; *S.C.* **2012**, *4*, 227.
54. Nadaf, H. A.; Yadav, G. S.; Kumari, B.; *J. Apic. Res.* **2016**, *54*, 260.
55. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Yun, S. J.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 630.
56. Bruzzoniti, M. C.; Checchini, L.; De Carlo, R. M.; Orlandini, S.; Rivoira, L.; Del Bubba, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 4089.
57. Koesukwiwat, U.; Sanguankaew, K.; Leepipatpiboon, N.; *Anal. Chim. Acta* **2008**, *626*, 10.
58. Sampaio, M. R. F.; Tomasini, D.; Cardoso, L. V.; Caldas, S. S.; Duarte, F. A.; Primel, E. G.; *Anal. Methods* **2013**, *5*, 2028.
59. Hrynko, I.; Łozowicka, B.; Kaczyński, P.; *Food Anal. Methods* **2018**, *11*, 2307.
60. Hendriks, G.; Uges, D. R. A.; Franke, J. P.; *J. Chromatogr. B* **2007**, *853*, 234.
61. Carneiro, R. P.; Oliveira, F. A. S.; Madureira, F. D.; Silva, G.; de Souza, W. R.; Lopes, R. P.; *Food Control* **2013**, *33*, 413.
62. Li, M.; Dai, C.; Wang, F.; Kong, Z.; He, Y.; Huang, Y. T.; Fan, B.; *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42489.
63. Cunha, S. C.; Fernandes, J. O.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 7748.
64. Resolução CONAMA No. 357/2005; *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*; DOU No. 053, de 18/03/2005, available at: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>, accessed in November, 2019.
65. Souza, S. V. C.; Junqueira, R. G.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *552*, 25.

66. Bazilio, F. S.; Bomfim, M. V. J.; Almeida, R. J.; Abrantes, S. M. P.; *Rev. Anal.* **2012**, *59*, 60.
67. Niessen, W. M. A.; Manini, P.; Andreoli, R.; *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 881.
68. Bedassa, T.; Gure, A.; Megersa, N.; *Bull. Chem. Soc. Eth.* **2017**, *31*, 1.
69. Perestrelo, R.; Silva, P.; Porto-Figueira, P.; Pereira, J. A. M.; Silva, C.; Medina, S.; Câmara, J. S.; *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1070*, 1.
70. Melwanki, M. B.; Fuh, M.-R.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1207*, 24.
71. Salvia, M.-V.; Ben Jrad, A.; Raviglione, D.; Zhou, Y.; Bertrand, C.; *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 29841.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do 2,4-D ser um herbicida amplamente utilizado na agricultura mundial, até o momento, nenhum estudo tinha sido realizado envolvendo as metodologias ELL-PBT e QuEChERS acopladas à HPLC-DAD para determinação desse composto em água. Neste trabalho, essas metodologias foram otimizadas e validadas com sucesso, sendo consideradas mais simples, práticas e acessíveis em relação às metodologias tradicionais, como SPE e LLE, devido ao consumo reduzido de solventes orgânicos e amostras, além de não exigir cartuchos, vidrarias ou equipamentos especiais. Neste estudo, nós selecionamos amostras reais de águas superficiais e subterrâneas com elevada possibilidade de contaminação, devido ao histórico de uso de pesticidas na região de Turmalina - MG. Entretanto, o monitoramento do 2,4-D nessas amostras não revelou nenhum episódio de contaminação ambiental. Por isso, resolvemos avaliar o período de estabilidade desse herbicida na água em condições ambientais. Os resultados indicaram que após 60 dias de contaminação das amostras de água, não conseguimos mais quantificar esse composto empregando a metodologia ELL-PBT acoplada à HPLC-DAD. Por isso, o monitoramento do 2,4-D em amostras de água deve ser realizado o mais próximo possível da provável data de aplicação desse herbicida na área de cultivo.