

## OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)

ANDRESSA SBANO<sup>1</sup>, JOÃO VICTOR REGO FERREIRA<sup>1</sup>,  
BÁRBARA ALVARENGA PECKLE<sup>1</sup>, ANDREW MACRAE<sup>2</sup>, IDA CAROLINA NEVES DIREITO<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Ambiental, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana (LBSBM), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\* E-mail: idacarolina@uezo.rj.gov.br

### RESUMO

O herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) representa 40% de todos os herbicidas utilizados na agricultura, sendo largamente utilizado na cultura de cana de açúcar. Sua aplicação pode prejudicar o meio ambiente e a saúde humana por ser extremamente tóxico. É necessário desenvolver um método eficaz para quantificação de pesticidas no solo e monitoramento da degradação por microrganismos do solo. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método para quantificação de 2,4-D e seus derivados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para ensaios de biodegradação "in vitro". Foi desenvolvido um método para a quantificação por meio de HPLC, que foi subsequentemente utilizado para a determinação das curvas de calibração de 2,4-D e os subprodutos 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2-clorofenol, 2-metilfenol e 4-Cloro-2 - metilfenol. As concentrações utilizadas foram de 0,5; 0,2; 0,08; 0,004; 0,0006  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . ANOVA revelou que as curvas de calibração podem ser utilizadas para quantificação destas moléculas. Os resultados mostraram que é possível empregar este método para a quantificação do 2,4-D e seus subprodutos em experimentos de biodegradação.

Palavras-chave: pesticida, biotransformação, biodegradação.

### ABSTRACT

The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) represents 40% of all herbicides used in agriculture, being widely used in sugar cane crop. Its application can damage the environment and the human health because it is extremely toxic. It is necessary to develop an effective method to quantify pesticides in soil and monitoring degradation by soil microorganisms. The aim of this study was to develop and validate a method for quantifying 2,4-D and its byproducts by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) assays for "in vitro" biodegradation. We developed a method for quantification by HPLC which was subsequently employed for determination of the calibration curves of 2,4-D and the molecules 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2-chlorophenol, 2-methylphenol and 4-Chloro-2 - methylphenol. Concentrations of 0,5; 0,2; 0,08; 0,004; 0,0006  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  were used. ANOVA showed that calibration curves can be employed to quantify these molecules. The results showed that it is possible to employ this method for the quantification of 2,4-D and its byproducts in the biodegradation experiment.

Key-words: pesticide, biotransformation, biodegradation

### INTRODUÇÃO

Os pesticidas foram introduzidos para controlar pragas, doenças e plantas daninhas em plantações e, desta forma, assegurar a produtividade e a qualidade dos produtos agrícolas. A utilização dos pesticidas na agricultura mundial iniciou-se na década de 1920 (Stopelli & Magalhães, 2005), sendo os primeiros pesticidas substâncias tóxicas de origem natural, tais como o piretro e a nicotina, além de elementos inorgânicos como o mercúrio e o enxofre (Coutinho et al., 2005). A Legislação

Brasileira define agrotóxicos (pesticidas) como substâncias utilizadas na produção, armazenamento e beneficiamento na agricultura, pastagem, proteção de florestas e outros ambientes, para preservá-los de seres nocivos e, ainda, as substâncias e produtos usados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (Stopelli & Magalhães, 2005).

Durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), os pesticidas foram utilizados como arma química e, a partir de então, ocorreu produção, expansão e síntese de diversos compostos químicos (Stopelli & Magalhães, 2005).

Durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), os pesticidas foram utilizados como arma química e, a partir de então, ocorreu produção, expansão e síntese de diversos compostos químicos (Stopelli & Magalhães, 2005). Um produto que foi criado neste período foi o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), desenvolvido com o objetivo de aumentar a produção agrícola durante a guerra (FAS, 2006) e empregado posteriormente na Guerra do Vietnã (1954-1975), juntamente com o herbicida ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), para a produção do agente laranja (Frumkin, 2003). Lançado comercialmente em 1946, o 2,4-D tornou-se o primeiro herbicida seletivo bem sucedido para emprego nas lavouras de milho, trigo, arroz e cevada (Guedes, 2010).

Na última década, o Brasil alcançou a posição de maior consumidor mundial de pesticidas (Londres, 2011; ANVISA, 2012). No ano de 2008, o mercado de pesticidas movimentou R\$ 7 bilhões no País, fazendo com que o Brasil assumisse a posição de líder no consumo de pesticidas no mundo (Silva, 2012). Em 2009, o consumo de pesticidas no Brasil ultrapassou a marca de 1 milhão de toneladas, representando 5,2 kg de pesticidas por habitante por ano (Londres, 2011). Os herbicidas se destacam como os pesticidas mais empregados na agricultura brasileira (IBGE, 2008; Conceição, 2000), representando 41% das vendas de pesticidas (SINDAG, 2009). Dentre os herbicidas, o 2,4-D é um dos mais empregados no Brasil (Caires & Castro, 2002).

O 2,4-D ( $C_8H_6Cl_2O_3$ , massa molecular = 221,0 g.mol<sup>-1</sup>) (Amarante Junior et al., 2003a) é um ácido orgânico com pKa de 2,6 e pouca solubilidade em água (Silva & Stets, 2006). A polaridade do 2,4-D está relacionada ao modo como se apresenta comercialmente, sendo que sua maior polaridade é obtida nas formas salinas (ANVISA, 2012). Ele é um herbicida sistêmico usado no controle de plantas daninhas de folhas largas (eudicotiledôneas) (ANVISA, 2012). Nas plantas, o 2,4-D atua provocando distúrbios diversos (crescimento anormal de tecidos, obstrução do floema, morte

do sistema radicular, epinastia das folhas, etc.), os quais levam os organismos mais sensíveis à morte (Rodrigues & Andrietta, 2010). O 2,4-D também é utilizado para indução de calos em laboratórios de cultura de tecidos vegetais, sendo empregado como uma auxina sintética, substância com a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular, principalmente no enraizamento (Krikorian, 1991; apud Centellas et al., 1999). Nos animais, é considerado um agente carcinogênico, afetando coração, fígado e sistema nervoso central, levando a convulsões (Silva & Stets, 2006).

O 2,4-D pertence à família dos organoclorados, que são compostos extremamente tóxicos e de longa persistência (Higarashi, 1999). Por estas razões, o controle de produção e aplicação de tais espécies está entre as prioridades nas legislações ambientais em todo o mundo, sendo que as concentrações do mesmo no meio ambiente são determinantes para o estabelecimento da forma de uso da área, seja para fim residencial, recreativo ou industrial (Higarashi, 1999).

No Brasil, a Resolução Nº 396 de 03 de Abril de 2008, do Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA, determina o limite máximo de 0,03 ppm de 2,4-D na água destinada ao consumo humano e a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), através da NBR 10004/2004, determina o limite de 3 ppm do herbicida em resíduos sólidos como suficiente para a denominação de resíduo perigoso.

Uma vez que os pesticidas circulam por todos os ambientes da Terra, bem como através do próprio alimento ou pelas águas (Rodrigues & Andrietta, 2010), há uma constante preocupação em assegurar o monitoramento do destino destas moléculas no meio ambiente e desenvolver tecnologias que permitam a remediação destas.

Existem vários métodos de determinação do 2,4-D em solo, água, cereais, frutas e outras matrizes, empregando biossensores, imunoensaios, eletroforese, cromatografia gasosa e cromatografia líquida (Tadeo et al., 2004).

Os métodos baseados em cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG/DCE) são os mais utilizados, visto que apresentam elevada sensibilidade, porém, exigem uma etapa de derivatização (Sanchez-Brunete et al., 1994; apud Amarante Junior et al., 2003b). A detecção por espectrometria de massas (EM) é uma alternativa que alia sensibilidade à elevada seletividade, viabilizando a identificação do composto estudado, mas também necessita de prévia derivatização com formação de composto volátil (Sanchez-Brunete et al., 1994; apud Amarante Junior et al., 2003b). A cromatografia líquida tem a vantagem de não necessitar de derivatização (Amarante Junior et al., 2003b). Por estas razões, dentre os métodos de análise do 2,4-D, os por cromatografia líquida costumam ser mais simples e rápidos, além de permitirem a determinação simultânea do herbicida e dos subprodutos oriundos de sua degradação, como o 2,4-diclorofenol (Hoffmann et al., 2003). A utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) permite identificar e quantificar determinada substância, como por exemplo o 2,4-D, em uma amostra de alimento, solo, água ou fármacos, assim como avaliar a degradação deste em ensaios “in vitro” (Moret et al., 2005; Haugland et al., 1990).

Neste trabalho realizamos a otimização de um método de cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação do herbicida 2,4-D e seus subprodutos para que este possa ser empregado no monitoramento da biotransformação/biodegradação do 2,4-D.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Herbicida 2,4-D e subprodutos*

O presente estudo foi realizado utilizando o herbicida 2,4-D padrão e os subprodutos 2,4-diclorofenol, 2-clorofenol, 4-clorofenol, 4-cloro-2-metilfenol e 2-metilfenol, todos da Sigma-Aldrich com pureza > 98%.

### *Equipamento e condições das corridas cromatográficas*

Foi utilizada a coluna Lichrosorb-RP-18 com 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro e fase estacionária (fase inversa) com grânulos irregulares de 5 µm de diâmetro. O cromatógrafo utilizado foi o da marca Merck equipado com detector Diode Array. A aquisição e tratamento dos dados foram feitos com o software EZchrom (Merck). Foi utilizado como fase móvel água ultra-pura acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fosfórico e acetonitrila (Tedia Brasil Ltda). A temperatura do forno utilizada foi de 25°C.

### *Seleção do método Cromatográfico*

Foram avaliados cinco métodos cromatográficos. A fase móvel foi padronizada para todos os métodos, respeitando-se as condições da corrida cromatográfica e se o método era isocrático ou em gradiente, bem como as porcentagens de cada solvente recomendado no método. No método 1, descrito por Amarante et al. (2003a), o fluxo utilizado foi de 0,7 mL.min<sup>-1</sup>, a fase móvel utilizada foi 50% água acidificada com ácido fosfórico e 50% de acetonitrila em sistema isocrático, ou seja, a concentração dos solventes da fase móvel é constante, com duração da corrida cromatográfica de 25 minutos. No método 2, descrito por Haugland et al. (1990), o fluxo utilizado foi de 2 mL.min<sup>-1</sup>, a fase móvel utilizada foi 50% de água acidificada com ácido fosfórico e 50% de acetonitrila em sistema isocrático com duração da corrida cromatográfica de 15 minutos. No método 3, descrito por Moret et al. (2005), o fluxo utilizado foi de 1 mL.min<sup>-1</sup>, a fase móvel utilizada foi 70% de água acidificada com ácido fosfórico e 30% de acetonitrila em sistema isocrático com duração da corrida cromatográfica de 15 minutos. O método 4, descrito por Direito (2009) fluxo utilizado foi de 1 mL.min<sup>-1</sup>, a fase móvel utilizada foi água acidificada com ácido fosfóri-

co e acetonitrila em sistema com gradiente: nos primeiros 10 min a concentração da acetonitrila foi de 30%; no decorrer dos 10 min seguintes variou de 30% a 40%; e de 40% até 100% no decorrer dos 40 min finais da corrida, sendo a duração da corrida cromatográfica de 1 hora. O Método 5 é resultado da otimização do método de Direito (2009) e aqui denominado Direito Modificado, sendo o fluxo utilizado de 1 mL min<sup>-1</sup>, a fase móvel utilizada foi água acidificada com ácido fosfórico e acetonitrila em sistema com gradiente: nos primeiros 3 minutos a concentração de acetonitrila foi de 30%; de 3 minutos a 20 minutos, a concentração de acetonitrila variou de 30% a 100%, com a duração da corrida cromatográfica de 20 minutos. Todos os métodos foram testados com a aplicação do 2,4-D e do 2,4-D com seus subprodutos. A mistura contendo 2,4-D e seus subprodutos foi preparada de forma que a concentração final de cada molécula fosse 0,08 µg.L<sup>-1</sup>

#### *Curva de calibração e validação do método*

Foi construída uma curva de calibração cujas concentrações de 2,4-D (>98% de pureza, Sigma-Aldrich) variaram de 0,0006 a 0,5 µg.L<sup>-1</sup>. Foram utilizados cinco níveis de concentração (0,5; 0,2; 0,08; 0,004; 0,0006 µg.L<sup>-1</sup>) e realizada a injeção de cada um deles em triplicata, com injeções de 20 µL na coluna cromatográfica. A quantificação do 2,4-D foi realizada a 225 nm. Os mesmos níveis presentes na curva de calibração do 2,4-D serviram de modelo para preparação das curvas dos subprodutos do 2,4-D: 4-clorofenol; 2,4-diclorofenol; 2-clorofenol; 2-metilfenol e 4-cloro-2-metilfenol. O método cromatográfico escolhido para o preparo das curvas de calibração foi o que obteve melhor desempenho nas análises preliminares.

Para verificar se os dados apresentavam linearidade para seu emprego na quantificação do 2,4-D sob nossas condições experimentais, foram realizados os procedimentos e as análises estatísticas sugeridas por Pimentel & Barros Neto (1996) que consistiram em: a) aplicação do método dos mínimos quadrados para cons-

Neto (1996) que consistiram em: a) aplicação do método dos mínimos quadrados para construção da curva de calibração; b) análise da variância (ANOVA) para validação do modelo; c) análise da necessidade de ajuste do modelo; d) análise da distribuição do erro; e) teste da significância da regressão. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados de acordo com o apresentado por Pimentel & Barros Neto (1996).

## RESULTADOS

### *Seleção do método cromatográfico*

Os cromatogramas obtidos pelos diferentes métodos podem ser observados nas Figuras 1 a 9. O método 1 apresentou um pico definido do 2,4-D, mas com a base muito larga (Figura 1). Quando realizada a injeção do 2,4-D com seus subprodutos foi observado que ocorreu a sobreposição de duas moléculas distintas que saíram com o mesmo tempo de retenção (Figura 2).

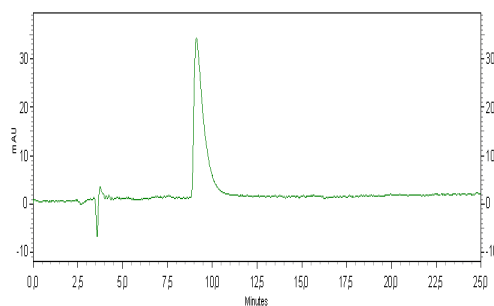


Figura 1. Cromatograma obtido empregando o método 1. Leitura realizada a 225nm. O pico observado se refere ao 2,4-D (Tempo de retenção: 9,120 min.) na concentração de 0,03µg.L<sup>-1</sup>.

O perfil cromatográfico obtido pelo método 2 apresentou um pico do 2,4-D com as mesmas características do método 1, porém com um tempo de retenção bem menor (Figura 3). Quando realizada a injeção do 2,4-D com seus subprodutos também foi observada a sobreposição de moléculas distintas que saíram com o mesmo tempo de retenção, de forma que eram esperados seis picos e foram identificados apenas quatro (Figura 4).

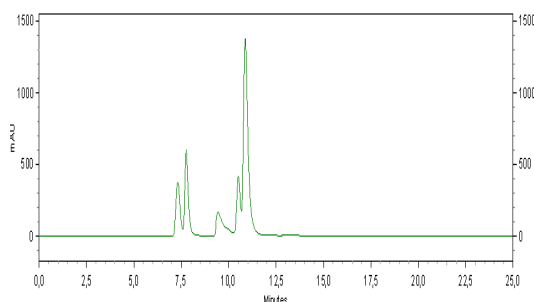


Figura 2. Cromatograma obtido empregando o método 1 com a injeção do 2,4-D e seus subprodutos. Leitura realizada a 225nm. Os picos esperados em função da polaridade das moléculas, da esquerda para a direita, seriam, respectivamente, 2-Metilfenol, 2-Clorofenol, 4-Clorofenol, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-Diclorofenol, 4-Cloro-2-Metilfenol. A concentração de cada molécula injetada foi  $0,08\mu\text{g.L}^{-1}$ .

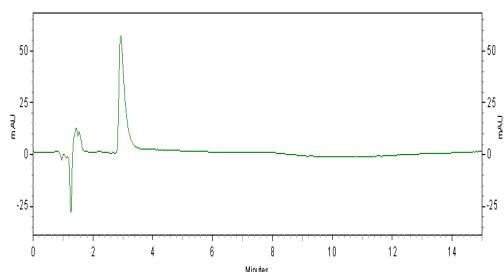


Figura 3. Cromatograma obtido empregando o método 2. Leitura realizada a 225nm. O pico observado se refere ao 2,4-D (Tempo de retenção: 2,927 min.) na concentração de  $0,03\mu\text{g.L}^{-1}$ .

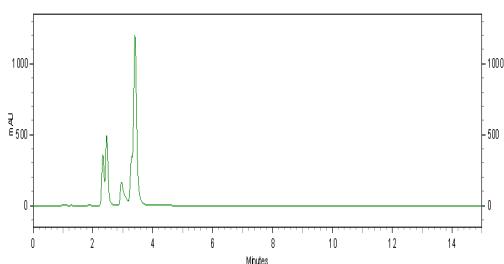


Figura 4. Cromatograma obtido empregando o método 2 com a injeção do 2,4-D e seus subprodutos. Leitura realizada a 225nm. Os picos esperados em função da polaridade das moléculas, da esquerda para a direita, seriam, respectivamente, 2-Metilfenol, 2-Clorofenol, 4-Clorofenol, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-Diclorofenol, 4-Cloro-2-Metilfenol. A concentração de cada molécula injetada foi  $0,08\mu\text{g.L}^{-1}$ .

O cromatograma obtido ao empregar o método 3 não se mostrou adequado para o estudo do 2,4-D, pois a corrida finalizou sem que o pico do mesmo fosse observado (Figura 5).

Só quando iniciada a corrida seguinte foi possível observar o pico do 2,4-D nestas condições de corrida cromatográfica. Por esta razão, não foi realizada a injeção do 2,4-D juntamente com seus subprodutos.

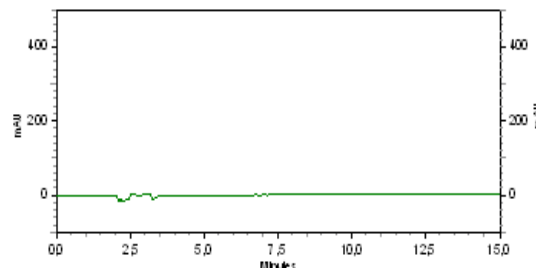


Figura 5. Cromatograma obtido empregando o método 3. Leitura realizada a 225nm. Não foi observado o 2,4-D injetado na concentração de  $0,03\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Empregando o método 4 foi observado que o mesmo promovia um gasto excessivo de solventes em função de cada corrida demorar sessenta minutos, apesar de o pico do 2,4-D sair bem definido e com tempo de retenção de 20,933 minutos (Figura 6). A separação do 2,4-D e seus subprodutos também não se mostrou eficiente uma vez que, embora os picos estivessem bem definidos, não foi possível realizar a distinção entre duas das seis moléculas injetadas (Figura 7).

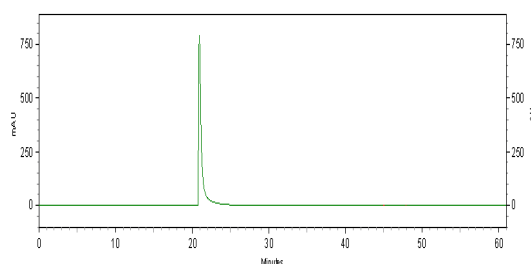


Figura 6. Cromatograma obtido empregando o método 4. Leitura realizada a 225nm. O pico observado se refere ao 2,4-D (Tempo de retenção: 20,933 min.) na concentração de  $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$ .

No método 5 (Direito Modificado) a redução na duração da corrida para 20 minutos não influenciou na definição do pico do 2,4-D que apresentou tempo de retenção de 12,46 minutos (Figura 8). Este método também se mostrou eficiente para realizar a separação do 2,4-D e seus subprodutos (Figura 9).

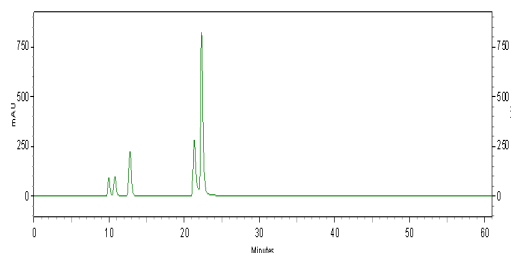


Figura 7. Cromatograma obtido empregando o método 4 com a injeção do 2,4-D e seus subprodutos. Leitura realizada a 225nm. Os picos esperados em função da polaridade das moléculas, da esquerda para a direita, seriam, respectivamente, 2-Metilfenol, 2-Clorofenol, 4-Clorofenol, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-Diclorofenol, 4-Cloro-2-Metilfenol. A concentração de cada molécula injetada foi  $0,08\mu\text{g.L}^{-1}$ .

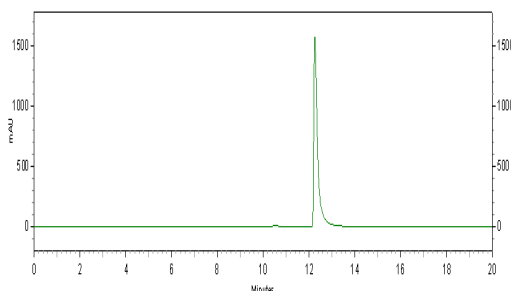


Figura 8. Cromatograma obtido empregando o método 5. Leitura realizada a 225nm. O pico observado se refere ao 2,4-D (Tempo de retenção: 12,260 min.) na concentração de  $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$ .

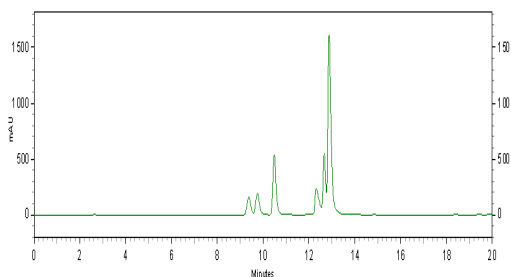


Figura 9. Cromatograma obtido empregando o método 5 com a injeção do 2,4-D e seus subprodutos. Leitura realizada a 225nm. Os picos esperados em função da polaridade das moléculas, da esquerda para a direita, seriam, respectivamente, 2-Metilfenol, 2-Clorofenol, 4-Clorofenol, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-Diclorofenol, 4-Cloro-2-Metilfenol. A concentração de cada molécula injetada foi  $0,08\mu\text{g.L}^{-1}$ .

#### Curva de calibração e validação do método

Uma vez realizada a seleção do melhor

método considerando o tempo de retenção do 2,4-D, as características do seu pico de eluição e a duração da corrida, bem como a eficiência na separação do 2,4-D e seus subprodutos, foram realizados os procedimentos para preparo das curvas de calibração e a validação do método selecionado. A partir das curvas de calibração foram determinadas as equações da reta e o valor de R-quadrado. A Tabela 1 apresenta os valores obtidos. As curvas de calibração do ácido 2,4-diclorofenoxiacético; 4-clorofenol; 2,4-diclorofenol, 2-clorofenol, 2-metilfenol e 4-cloro-2-metilfenol apresentaram  $R^2$  superior a 0,90 (Tabela 1), permitindo a realização do processo de validação das mesmas.

Tabela 1. Equações da reta e o valor de R-quadrado para a curva de calibração do 2,4-D e dos subprodutos deste.

SUBSTÂNCIA	EQUAÇÃO DA RETA / VALOR DE R-QUADRADO
ácido 2,4-diclorofenoxiacético	$y = 2E+08x - 60016$ $R^2 = 0,9995$
4-clorofenol	$y = 2E+08x + 3E+06$ $R^2 = 0,9848$
2,4-diclorofenol	$y = 2E+08x + 2E+06$ $R^2 = 0,9894$
2-clorofenol	$y = 1E+08x - 0,0048$ $R^2 = 0,9981$
2-metilfenol	$y = 1E+08x - 53022$ $R^2 = 0,9996$
4-cloro-2-metilfenol	$y = 7E+08x - 0,0107$ $R^2 = 0,985$

Os procedimentos e as análises estatísticas para verificar a linearidade do método foram realizadas e mostraram que as curvas de calibração teriam de ser ajustadas (dados não apresentados). O ajuste realizado foi referente à retirada da concentração  $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$ , de modo que após isso a curva de calibração se apresentasse linear, com boa distribuição de resíduos e com análise de variância não significativa entre as concentrações esperadas e as observadas (Tabela 2).

Os limites de detecção (LD) foram determinados e apresentaram valores entre  $0,05\mu\text{g.L}^{-1}$  e  $0,08\mu\text{g.L}^{-1}$ . Os limites de quantificação (LQ) apresentaram valores entre  $0,17\mu\text{g.L}^{-1}$  e  $0,2\mu\text{g.L}^{-1}$ .

#### DISCUSSÃO

##### Seleção do método cromatográfico



Tabela 2. Valores de F e P obtidos após realização de ANOVA considerando os valores de concentração esperados e os observados para as curvas de calibração do 2,4-D e dos subprodutos deste.

SUBSTÂNCIA	VALOR	
	F	P
ácido 2,4-diclorofenoxiacético	0.0195	0.8849
4-clorofenol	0.0906	0.7634
2,4-diclorofenol	0.0243	0.8724
2-clorofenol	0.0250	0.8694
2-metilfenol	0.0047	0.9446
4-cloro-2-metilfenol	0.0166	0.8933

O perfil cromatográfico apresentado pelo método 1 apresentou um pico definido do 2,4-D, mas com a base muito larga (Figura 1) e a separação do 2,4-D e seus subprodutos não foi eficiente (Figura 2). Este perfil precisaria ser otimizado para se obter um pico com a base mais estreita e mais alto, o que poderia reduzir a possibilidade de mistura de substâncias e, conseqüentemente, permitiria uma melhor separação. O perfil cromatográfico obtido pelo método 2 também apresentou o pico de 2,4-D com a base larga, porém com um tempo de retenção bem menor (Figura 3). Isso ocorreu em função do fluxo da fase móvel ser maior (2 mL.min<sup>-1</sup>) do que o empregado no método 1. Isto fez com que a fase móvel carresse o 2,4-D com maior facilidade logo nos primeiros minutos de corrida. Este tempo de retenção muito reduzido (2,927 min) dificultaria a separação das moléculas em mistura (Figura 4), uma vez que moléculas apolares e polares saíram da coluna com tempos muito próximos. Por estas razões, os métodos 1 e 2 não foram selecionados.

O cromatograma obtido ao empregar o método 3 não se mostrou adequado para o estudo do 2,4-D, pois a corrida finalizou sem que o pico do mesmo fosse observado (Figura 5). Para o uso deste método seria necessário aumentar o tempo de corrida, quando o desejado era selecionar um método mais rápido, porém sem que este perdesse a eficiência.

Em seu estudo, Direito (2009) empregou um método eficiente, mas que promovia um gasto excessivo de solventes em função de cada corrida acontecer durante ses-

trabalho, o método foi submetido a uma alteração no tempo da corrida cromatográfica para 20 minutos, criando o método Direito Modificado (Figuras 8 e 9). Este método se mostrou o mais adequado dentre os testados por possibilitar picos com base estreita, mais íngreme e com tempo de retenção que possibilita a adequada separação entre moléculas polares e apolares. Por esta razão, o método Direito Modificado foi utilizado para a determinação da curva de calibração para 2,4-D e seus subprodutos.

Curva de calibração e validação do método

A partir das curvas de calibração foram determinadas as equações da reta, o valor de R-quadrado (Tabela 1) e determinados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). As curvas de calibração do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2-clorofenol, 2-metilfenol e 4-cloro-2-metilfenol apresentaram R<sup>2</sup> superior a 0,90 (Tabela 1), permitindo a realização do processo de validação das mesmas.

As análises estatísticas sugeridas por Pimentel & Barros Neto (1996) foram realizadas e mostraram que as curvas de calibração deveriam ser ajustadas. O ajuste realizado foi referente a retirada da concentração 0,5 µg.L<sup>-1</sup>, de modo que após isso a curva de calibração se apresentasse linear, com boa distribuição de resíduos e com análise de variância não significativa (Tabela 2). Isso significa dizer que não existe diferença significativa entre os valores observados e os esperados, de forma que as curvas de calibração podem ser empregadas adequadamente para a quantificação do 2,4-D e seus subprodutos.

Segundo Ribani et al. (2004), é muito comum perceber diferenças entre métodos analíticos, principalmente, quando vários laboratórios analisam uma amostra em comum em estudos colaborativos. Assim, os dados provenientes de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar a reprodutibilidade do método (Ribani et al., 2004). Isso não significa, entretanto, que os métodos validados em um laboratório não possam ser empregados nos experimentos realizados por este ou mesmo que não sejam repro-

produtíveis em outros laboratórios.

A validação de métodos em geral é um procedimento feito para demonstrar o quanto o trabalho proposto é aceitável frente as incertezas do processo analítico, equipamentos, padrões, calibrações e análises (Gonçalves, 2007; apud Pihlström et al., 2009). A validação de um método cromatográfico pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico (Pihlström et al., 2009).

A validação de um método passa por várias etapas, sendo algumas no próprio laboratório (“house validation”) e outra a reprodutibilidade do método em diferentes laboratórios, o que é chamado de validação completa (“full validation”) (Ribani et al., 2004). A validação completa abrange todas as características de desempenho de um estudo em diversos locais de pesquisa, com a finalidade de verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, para garantir que tal metodologia possa ser reproduzida e que haja quebra da incerteza expandida associada à metodologia como um todo (Ribani et al., 2004). Apenas dessa maneira a metodologia pode ser aceita como oficial para uma determinada aplicação (Massart et al., 1994; apud Ribani et al., 2004).

Sob este aspecto, nosso método cromatográfico tem todos os parâmetros desejáveis para a sua aplicação, uma vez que os resultados apresentados na sua validação em laboratório se mostraram estatisticamente adequadas para o seu emprego. Mesmo os limites de detecção e quantificação encontrados através das análises dos dados gerados pelas curvas de calibração encontram-se dentro dos valores citados na literatura para métodos empregados em cromatografia líquida de alta eficiência aplicados na quantificação de pesticidas (Amarante Junior et al., 2003b).

## CONCLUSÃO

O caminho que um pesticida pode seguir no meio ambiente até sua degradação é comple-

plexo e reúne um conjunto de enzimas ordenadas pela disponibilidade de substrato. Nestes sistemas, existem diferentes genes em diferentes microrganismos gerando mais de uma rota de degradação possível para cada composto. A função realizada, no entanto, é a mesma: a remoção de pesticidas pela inserção destes nos ciclos biogeoquímicos através da biodegradação. Para que a biodegradação ocorra o pesticida deve estar disponível no solo e os microrganismos apresentarem as “ferramentas” enzimáticas necessárias.

O perfil cromatográfico gerado pelo 2,4-D e seus subprodutos, bem como dos espectros das moléculas estudadas, sinalizam que a otimização do método foi adequada para a aplicabilidade em estudos de biotransformação/biodegradação. Os picos ficaram bem definidos e as curvas de calibração mostraram que o sistema está ajustado adequadamente para a quantificação destas moléculas. O método cromatográfico desenvolvido permite a identificação e quantificação do 2,4-D e dos seus subprodutos 2,4-Diclorofenol, 2-Clorofenol, 4-Clorofenol, 4-Cloro-2-Metilfenol e 2-Metilfenol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARANTE JUNIOR, O. P.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R.; NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. 2003a. Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis. *Talanta* 60: 115-121.
- AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; NUNES, G. S. 2003b. Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). *Quím Nova* 26: 223-229.



- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Publicacao+Agrotoxico+Toxicologia/Sistema+de+Informacao+sobre+Agrotoxicos+SIA>>. Acesso em 12 jun. 2012.
- CAIRES, S. M.; CASTRO, J. G. D. 2002. Levantamento dos agrotóxicos usados por produtores rurais do município de Alta Floresta. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande. *Rev Biol Ciênc Terra* 2: 35-42.
- CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MÜLLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. 1999. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento in vitro da macieira. *Pesq Agropec Bras* 34: 181-186.
- CONCEIÇÃO, M. Z. 2000. Segurança nas aplicações de herbicidas. In: Anais Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, p. 46-48.
- COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. 2005. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. *R Ecotox Meio Ambiente* 15: 65-72.
- DIREITO, I. C. N. 2009. Bioprospecção e interações de populações bacterianas degradadoras do herbicida 2,4-D em solos agrícolas. 190p. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- FAS - FEDERATION OF AMERICAN SCIENTISTS. National Programs Prior to and During World War II. 2006. Disponível em: <<http://www.fas.org/bwc/papers/review/wwii.htm>>. Acesso em 15 mai. 2010.
- FRUMKIN, H. 2003. Agent orange and Cancer: An Overview for clinicians. *Environ Carcinogens* 153: 245-255.
- GUEDES, S. F. 2010. Estudo da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um herbicida selectivo amplamente utilizado na agricultura, por uma estirpe de *Penicillium*. 280p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova De Lisboa, Monte da Caparica.
- HAUGLAND, R. A.; SCHLEMM, D. J.; LYONS, R. P. 3rd; SFERRA, P. R.; CHAKRABARTY, A. M. 1990. Degradation of the Chlorinated Phenoxyacetate Herbicides 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid by Pure and Mixed Bacterial Cultures. *Appl Environ Microbiol* 56: 1357-1362.
- HIGARASHI, M. M. 1999. Processos Oxidativos Avançados Aplicados à Remediação de Solos Brasileiros Contaminados com Pesticidas. 96p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- HOFFMANN, D.; KLEINSTEUBER, S.; MÜLLER, R. H.; BABEL, W. 2003. A transposon encoding the complete 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkali tolerant strain *Delftia acidovorans* P4a. *Microbiology* 149: 2545-2556.
- IBGE. 2008. Indicadores de desenvolvimento sustentável. Estudos e Pesquisa - Informação Geográfica, n. 7, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/>>. Acesso em 01 jul. 2012.
- LONDRES, F. 2011. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, Rio de Janeiro.
- MORET, S.; SÁNCHEZ, J. M.; SALVADÓ, V.; HIDALGO, M. 2005. The evaluation of diffe-

rent oxyacetic acid herbicides and their metabolites from soils. *J. Chromatogr A*. 1099: 55-63.

dues in juice and beverages. *Analytical Chem.* 34: 121-131.

PIMENTEL, M. F. BARROS NETO, B. 1996. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Quím Nova* 19: 268-277.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. 2004. Validação em Métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova* 27: 771-780.

RODRIGUES, N. R.; ANDRIETTA, M. G. S. 2010. Biodegradação do diclosulam por bactérias isoladas de solos cultivados com soja. *Planta Daninha* 28: 393-400.

PIHLSTRÖM, T. et al. (Eds). 2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. (Document No. SANCO/10684/2009)

SILVA, T. L. A. O Brasil Envenenado: Alimentos Para a Vida ou Para a Morte? Disponível em: <<http://racismoambiental.net.br/2012/06/o-brasil-envenenado-alimentos-para-a-vida-ou-para-a-morte/>>. Acesso em 30 jul. 2012.

SILVA, T. M.; STETS, M. I. 2006. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from brazilian contaminated soil. *Braz. J. Microbiol.* 38: 522-525.

SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/portal/page?\\_pageid=33,2789141&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL](http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,2789141&_dad=portal&_schema=PORTAL)>. Acesso em: 28 de abril de 2009.

STOPPELLI, I. M. B. S.; MAGALHÃES, C. P. 2005. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. *Ciências Saúde Coletiva* 10: 91-100.

TADEO, J. L.; SÁNCHEZ, B. C.; BEATRIZ, A. B.; LORENA, G. L. Analysis of pesticide resi-