

Artigo

Eficiência e Robustez na Determinação do Herbicida 2,4-D em Águas Superficiais

Chaves, M. J. S.;* Verbinnen, R. T.; Diniz, M. S.; Viana, J. L. M.;
Mendonça, C. J. S.; Franco, T. C. R. S*

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (5), 1474-1484. Data de publicação na Web: 08 de outubro de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>

Successful and Robustness of 2,4-D Analysis in Surface Waters

Abstract: The analysis of the 2,4-D in natural waters is a relevant issue due to real possibility of water contamination by this herbicide. The literature amply covers the subject and liquid chromatography is undoubtedly the preferred technique for detection and quantification, since it does not require derivatization step. This article shows that besides being a simple, sensitive and reliable method, solid-phase extraction (SPE), followed by high performance liquid chromatography and diode array detection, has adequate robustness to a routine method of water quality. The Youden test demonstrated robustness of the experimental procedure for different analysts, column temperature and organic solvents, but sensitive for volume flow and pH of the mobile phase. The method was adequate in the investigation of 2,4-D in surface water samples from Rio da Prata (São Luís, MA) and was not detected in the samples analyzed.

Keywords: 2,4-D; validation of analytical method; HPLC-DAD.

Resumo

A análise de 2,4-D em águas superficiais é um assunto ambientalmente relevante devido à possibilidade real de contaminação por esse herbicida. A literatura apresenta amplamente o assunto e a cromatografia líquida é, sem dúvida, a técnica preferida para detecção e quantificação, uma vez que não necessita de etapa de derivatização. Este artigo mostra que, além de simples, sensível e confiável, a extração em fase-sólida (SPE), seguida de cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos possui robustez adequada para análises de rotina no que se refere à qualidade de águas. O Teste de Youden demonstrou que o método é robusto frente à realização do procedimento experimental para diferentes analistas, temperatura da coluna e solventes orgânicos, porém sensível à vazão e pH da fase móvel. O método mostrou-se adequado na investigação de 2,4-D em amostras de água superficial do Rio da Prata (São Luís, MA), não tendo sido detectado nas amostras analisadas.

Palavras-chave: 2,4-D; validação de método analítico; HPLC-DAD.

* Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses 1966, CEP 65080-805, São Luís-MA, Brasil.

✉ marisachaves2013@gmail.com; teresacristinafranco@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20180100](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180100)

Eficiência e Robustez na Determinação do Herbicida 2,4-D em Águas Superficiais

Marisa de J. S. Chaves,^{a,*} Raphael T. Verbinnen,^a Marta dos S. Diniz,^b José Lucas M. Viana,^a Cáritas de J. S. Mendonça,^b Teresa Cristina R. S. Franco^{a,*}.

^a Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses 1966, CEP 65080-805, São Luís-MA, Brasil.

^b Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Química, Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses 1966, CEP 65080-805, São Luís-MA, Brasil.

* marisachaves2013@gmail.com; teresacristinafranco@gmail.com

Recebido em 31 de maio de 2018. Aceito para publicação em 03 de outubro de 2018

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

- 2.1. Materiais e reagentes
- 2.2. Condições cromatográficas
- 2.3. Volume de pré-concentração nos cartuchos
- 2.4. Coleta e preparo de amostras
- 2.5. Validação do método analítico
- 2.6. Aplicação do método

3. Resultados e Discussão

- 3.1. Condições cromatográficas
- 3.2. Volume de pré-concentração nos cartuchos
- 3.3. Validação do método analítico
- 3.4. Aplicação do método

4. Conclusão

1. Introdução

O consumo de agrotóxicos no Brasil vem crescendo vertiginosamente desde 2008, sendo o país considerado maior consumidor de tais substâncias no mundo, representando cerca de 20 % do mercado mundial.¹ De 2005

a 2014 a quantidade de agrotóxicos utilizada no país teve um aumento acima de 190 %, ultrapassando a média mundial que é de 93 %.² A pulverização sobre as plantações é uma das maneiras mais comuns de aplicação dos agrotóxicos, sendo diretamente liberados para o meio ambiente, podendo atingir as águas superficiais e subterrâneas. Assim,

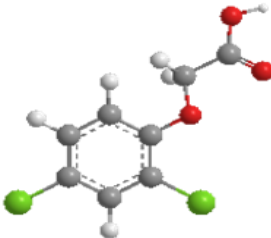
diante do uso intenso dos agrotóxicos e da relativa persistência dessas substâncias, é possível considerar que a maior parte da população está exposta, de alguma forma, a tal contaminação.^{3,4}

Os agrotóxicos podem causar diversos efeitos colaterais à saúde humana, dependendo do princípio ativo envolvido. A presença de resíduos em alimentos e água são rotineiramente relacionados a problemas no sistema nervoso central, nos sistemas cardiovascular e reprodutivo, além do aumento de vários tipos de câncer.^{4,5}

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos herbicidas mais comuns e antigos do

mundo. É classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como um herbicida hormonal de toxicidade I, extremamente tóxico. Semelhante classificação é dada por órgãos internacionais, tais como a Organização Mundial de Saúde e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Em condições ambientais, o 2,4-D e alguns dos seus derivados são sólidos cristalinos, solúveis em água. Valores de meia-vida do 2,4-D variam de 6,4 dias em solos minerais a 8,3 dias em solos orgânicos.⁶ Suas propriedades químicas, assim como sua estrutura, são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Estrutura molecular e propriedades químicas do ácido 2,4-diclorofenoxiacético

	
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) Fórmula Molecular: C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	
Solubilidade em água a 25 °C / (mg L ⁻¹)	900
PKa	2,6
Log Kow	2,58 – 2,83
Tempo de meia-vida em águas naturais	2 a 4 semanas

Métodos analíticos confiáveis e de qualidade são essenciais para a análise de contaminantes em matrizes ambientais. Para tanto, é necessária metodologia devidamente validada. Entre os parâmetros de validação a serem avaliados estão seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/recuperação, exatidão, precisão e robustez.⁷

No que se refere à obtenção de água potável são necessários processos de tratamento que sejam adequados às peculiaridades da água do manancial.⁸ A presença de agrotóxicos nos mananciais pode trazer dificuldades no tratamento efetivo da água, sendo necessárias tecnologias mais

avançadas, que incluam a eliminação desses e outros microcontaminantes. Além disso, há uma crescente necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos que produzam resultados confiáveis e que atendam à legislação, no que se refere à determinação de agrotóxicos e contaminantes emergentes em matrizes ambientais. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar parâmetros analíticos para a determinação e quantificação do herbicida 2,4-D em água superficial por HPLC-DAD, demonstrando a eficiência e robustez deste frente a algumas limitações analíticas. A execução deste método pode gerar resultados confiáveis para indicar a qualidade das águas superficiais em regiões em que há limitação instrumental para se efetuar as análises químicas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais e reagentes

Os padrões de 2,4-D, com pureza de 99,9 %, foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os solventes orgânicos de grau cromatográfico, acetonitrila (ACN) e ácido fórmico, foram obtidos da Merck. Água ultrapura (18 Ω .m) foi obtida do sistema Milli-Q, da Millipore (Direct-Q UV 3). Cartuchos para extração em fase sólida, do tipo seringa, foram obtidos da Phenomenex (StrataC-18-E, 55 μ m, 500 mg, 6 mL). Para a realização dos testes preparou-se solução estoque de 2,4-D em acetonitrila, a partir da qual foram feitas diluições para as soluções de trabalho, preparadas em água ultrapura. As amostras de água superficial do Rio da Prata foram filtradas em membranas de microfibras de vidro adquiridas da Merck, com tamanho de partículas de 0,2 a 0,6 μ m (Filtro AP 15, 47 mm de diâmetro). Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.2. Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência, acoplado a Detector de Arranjo de Diodo (HPLC-DAD) da Shimadzu, modelo DGU-20, com injeção manual. Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna SunFire C18 (Waters), com dimensões de 100 x 3,0 mm e diâmetro de partícula de 3,5 μ m. A validação da metodologia analítica foi feita após o estudo das condições cromatográficas que melhor se adaptaram à substância em estudo, tais como constituintes da fase móvel, gradiente de eluição, tempo de retenção e comprimento de onda de maior absorção pelo analito.

2.3. Volume de pré concentração nos cartuchos

Para determinar o volume de amostra (volume de ruptura) a ser utilizado na validação do método, fez-se experimentos com volumes de amostras variando de 100 a 1000 mL. Foram preparadas soluções contendo 0,5 mg do analito em diferentes volumes de amostra real, ou seja, diferentes concentrações, a fim de se avaliar a quantidade máxima e mínima de analito que pode ser adsorvida no material adsorvente escolhido (C18). Além do efeito matriz que pode variar com o aumento do volume de amostra, outro aspecto a ser considerado é o fator de concentração. Nos experimentos foram utilizados 100, 250, 500, 750 e 1000 mL de amostras.

2.4. Coleta e Preparo de amostras

O Rio da Prata está localizado no bairro do Maracanã, na porção Sudoeste da Ilha de São Luís, MA (2°36'02.4"S 44°16'32.6"W) e integra o Parque Estadual do Bacanga, sendo ele responsável por parte do abastecimento de água da cidade. Amostras de águas superficiais do Rio da Prata foram utilizadas nos estudos de recuperação, avaliação do efeito matriz e testes de volume de pré-concentração nos cartuchos. A extração e concentração do analito foram feitas em cartucho C18 por meio da extração em fase sólida (SPE), seguida de redução de volume em sistema Syncore Analyst (BÜCHI). O procedimento é apresentado na Figura 1. Após a coleta, as amostras foram filtradas em filtro de microfibras de vidro, tamanho de partículas de 0,2 a 0,6 μ m (Filtro AP 15, Merck) e, em seguida, foi feita a pré-concentração.

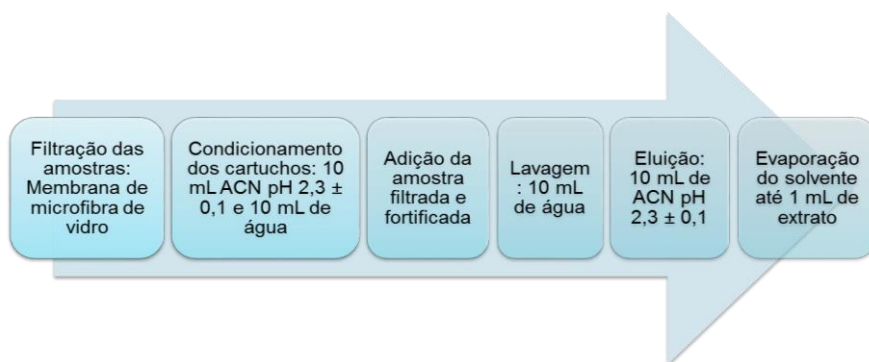


Figura 1. Esquema do procedimento de extração em fase sólida

2.5. Validação do método analítico

Parâmetros analíticos para validação do método desenvolvido foram avaliados de acordo com o guia do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), sendo eles: linearidade e faixa de trabalho, seletividade, limite inferior de detecção (LD), limite inferior de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez.

A linearidade de um método expressa a faixa na qual o sinal analítico é linearmente proporcional à sua concentração. Curvas analíticas na matriz foram obtidas a partir da fortificação das amostras de água. O procedimento de extração foi realizado nas concentrações de 0,1 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. As curvas foram utilizadas para verificar a resposta linear do detector. A faixa de trabalho foi definida a partir da verificação dos pontos que estão dentro da faixa linear do método, iniciando-se no limite de quantificação deste.

A seletividade está relacionada à detecção. Quando um método produz respostas para vários analitos, porém sendo estas respostas distintas, este é chamado seletivo.⁷ A seletividade do método foi avaliada por meio da análise de amostras fortificadas em concentrações próximas ao LQ e injetadas em triplicata, sendo os resultados comparados com aqueles obtidos dos brancos das amostras.

A detectabilidade de um método é definida pelos limites inferiores de detecção (LD) e de quantificação (LQ). A menor concentração do

analito de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental é denominada LD, enquanto LQ é a menor concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão (CV = 0 a 20 %) e exatidão do método durante as operações de rotina do laboratório. Mediante a equação da reta obtida com a curva analítica ou pelo método visual, é possível determinar ambos os limites.

Precisão diz respeito à avaliação da dispersão de resultados entre experimentos independentes quando executados sob as mesmas condições, sendo normalmente representada por meio da repetitividade e da reprodutibilidade⁷. A precisão pode ser expressa em termos do desvio-padrão, desvio-padrão relativo ou coeficiente de variação (CV). Neste trabalho foram utilizados os coeficientes de variação das recuperações como medida de precisão analítica. A precisão das medidas foi avaliada em níveis de repetitividade, no qual foram feitas injeções consecutivas por um mesmo analista e no mesmo dia, e de precisão intermediária, na qual se fez injeções por dois analistas e em dias diferentes, sob as mesmas condições.

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações, sendo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima da faixa linear e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método⁷. A recuperação é calculada segundo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100$$

Onde: *C1* é a concentração determinada na amostra adicionada, *C2* a concentração determinada na amostra não adicionada e *C3* a concentração adicionada.

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta quando sujeito a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar-se praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este é utilizado⁷. Para determinar a robustez do método, recorreu-se ao teste de Youden, pois este permite não

só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. O Teste de Youden mostra, em oito experimentos, como é possível avaliar a influência de cada variação. Todas as medidas de concentração foram realizadas em triplicata, sendo avaliados os efeitos sobre o tempo de retenção e a área do pico do analito. Os parâmetros variados no teste, assim como as quantidades nominal e variável de cada parâmetro encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros avaliados no teste de Youden

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

2.6. Aplicação do método

Foram coletadas amostras de águas superficiais do Rio da Prata nos dias 27 de Janeiro e 08 de março de 2017, no período matutino. As amostras foram conservadas em frascos âmbar e transportadas em caixa térmica até o laboratório, onde se procedeu às etapas de preparo de amostras. As amostras foram filtradas primeiramente em papel de filtro qualitativo e em seguida em membrana de microfibras de vidro com capacidade de retenção de partículas de 0,2 a 0,6 µm (Merck). Em seguida foi realizado o procedimento de SPE descrito na Figura 1.

3. Resultados e Discussão

3.1. Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo a Líquido com Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD-10A) da SHIMADZU, equipado com uma coluna SunFire C18 (Waters), com dimensões de 100 x 3,0 mm, diâmetro de partícula de 3,5 µm e temperatura do forno de 30 °C. A fase móvel foi composta de acetonitrila (componente A) e solução aquosa de ácido fórmico pH 2,18 ± 0,1 (componente B) (45A:55B), em modo isocrático, por seis minutos e fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O analito foi monitorado no

comprimento de onda 230 nm, apresentando tempo de retenção de $4,0 \pm 0,1$ minutos. O volume de injeção foi 20 μL de amostra.

3.2. Volume de pré-concentração nos cartuchos

A avaliação do volume de amostra a ser pré-concentrada (volume de ruptura) indicou que a extração em fase sólida se utilizando de 100 a 500 mL de amostra forneceu recuperações superiores a 80 %, diminuindo sensivelmente para maiores volumes de amostra, sendo que o volume de 1000 mL excedeu o volume de ruptura do cartucho, não sendo possível ter boa recuperação do analito. As taxas de recuperação, de cada

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

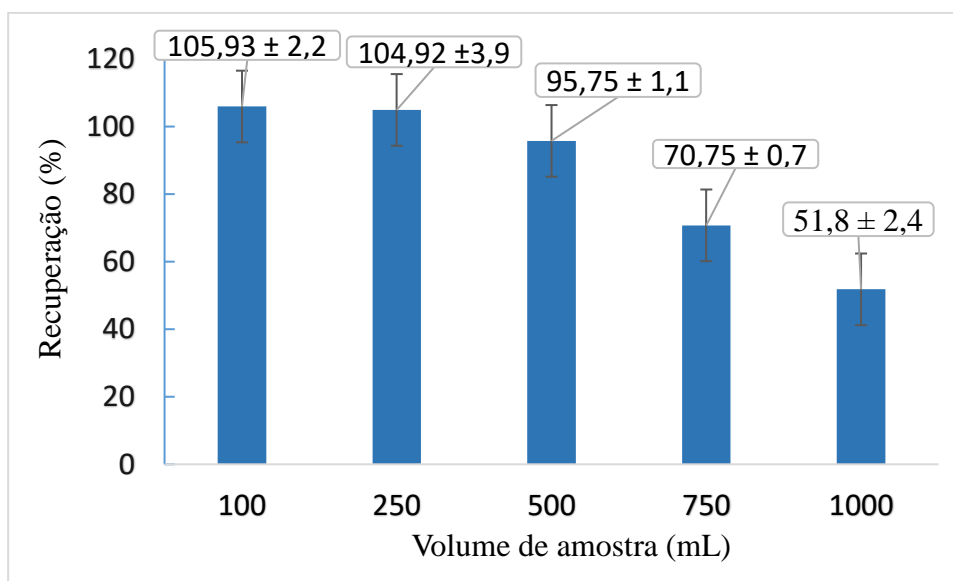


Figura 2. Valores de recuperação obtidos no teste de volume de pré-concentração nos cartuchos

3.3. Validação do método

As curvas analíticas obtidas pela injeção de concentrações crescentes, tanto em solvente quanto na matriz, apresentaram coeficientes de correlação linear superiores a 0,99 (R

=0,999, e R= 0,995, respectivamente). Isso indica que há forte correlação linear entre as concentrações do 2,4-D e as áreas obtidas nos cromatogramas. As curvas analíticas obtidas estão representadas na Figura 3. A faixa de trabalho foi definida a partir do LQ, $5 \mu\text{g L}^{-1}$, a $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

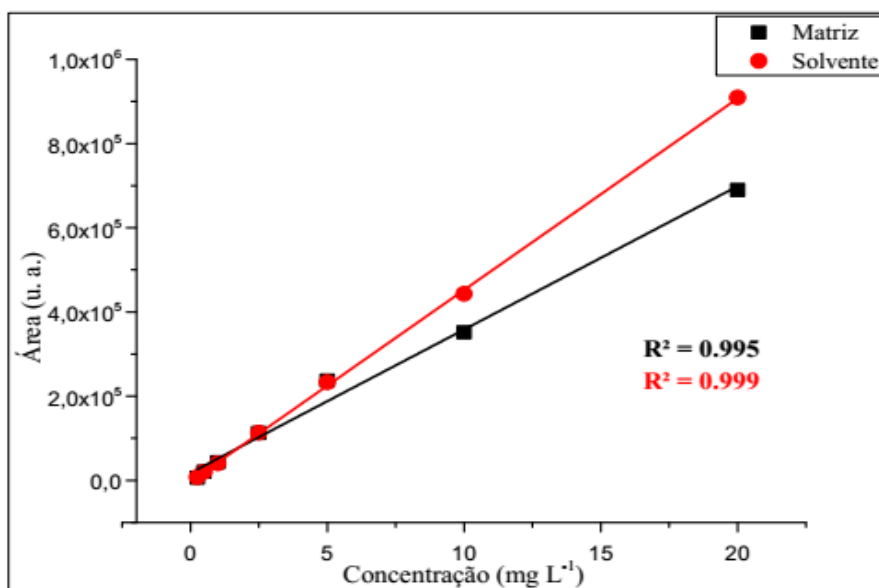


Figura 3: Curvas analíticas para 2,4-D em solvente e na matriz

Os cromatogramas correspondentes às injeções dos extratos fortificados com concentrações conhecidas de 2,4-D comparados aos cromatogramas dos brancos da matriz mostram que o pico observado é

exclusivamente do analito de interesse, não havendo, assim, qualquer interferente da matriz (Figura 4), sendo, portanto, um método seletivo.

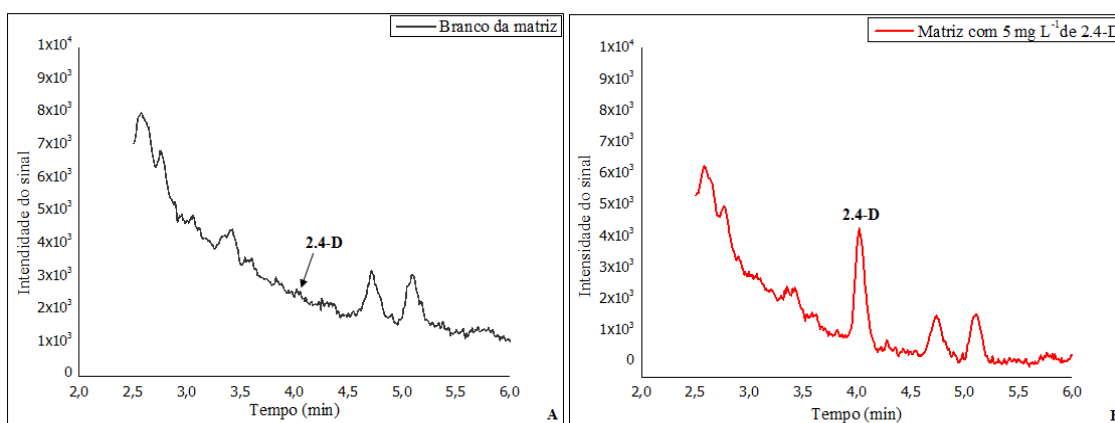


Figura 4. Cromatogramas obtidos para amostras do branco da matriz (A) e da matriz fortificada com 5 µg L⁻¹ (B)

Os limites inferiores de detecção e de quantificação encontrados foram 1,5 µg L⁻¹ e 5 µg L⁻¹, respectivamente. Este método tem a capacidade de detectar uma quantidade de 2,4-D doze vezes menor que a permitida para esta matriz, e de quantificar cerca de 6 vezes

menos. Os baixos valores dos coeficientes de variação (CV) (Tabela 3) mostram que há baixa dispersão das respostas tanto do método quanto do equipamento. O método é, portanto, preciso, o que contribui para a confiabilidade dos resultados.

Tabela 3. Valores de precisão obtida para o método proposto

Concentração / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetitividade	Precisão Intermediária
	CV*	CV
2,5	3,22	2,31
10,0	0,46	1,04
100	0,18	0,84

* Coeficiente de variação

O preparo de amostra por SPE mostrou-se eficiente na extração e concentração do analito, apresentando recuperações variando de 76,41 % \pm 0,2 a 106 % \pm 6,5. Os valores de recuperação para as concentrações próximas

ao LD, ao ponto médio e à concentração máxima da curva analítica encontram-se na Tabela 4. O fator de concentração foi de 100, portanto, é possível detectar até 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D em amostras reais de águas superficiais.

Tabela 4: Valores de recuperação obtidos para o método em estudo utilizando SPE

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
2,5	80,02 \pm 3,7
5,0	100,97 \pm 2,2
10,0	106,60 \pm 6,5
25,0	99,43 \pm 1,0
50,0	101,7 \pm 0,8
100,0	79,41 \pm 1,5
200,0	76,1 \pm 0,2

Na Figura 5 são apresentados os gráficos de efeito dos parâmetros investigados no teste de robustez de Youden em relação à área do pico (A) e ao tempo de retenção do herbicida (t_R). O valor destacado no eixo horizontal em cada um dos gráficos (0,434 para t_R e 138319,95 para A) é referente ao valor crítico de efeito, a partir do qual o parâmetro investigado indica efeito significativo na resposta do método.

Desta forma, observa-se na Figura 5 que t_R do 2,4-D, analisado em água superficial natural pelo presente método, foi afetado tanto pelo fluxo quanto, e principalmente, pela proporção da fase móvel. Já a área do pico demonstrou ser sensível a alteração tanto no fluxo quanto no pH da fase móvel.

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

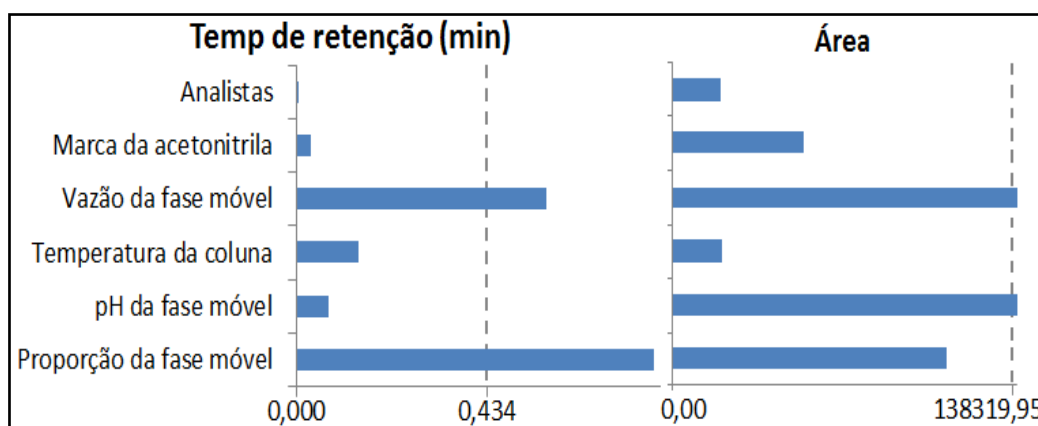


Figura 5. Diagramas de efeito do teste de robustez. O valor em destaque em cada um dos gráficos é referente à intensidade de efeito crítico

3.4. Aplicação do método

Nas amostras de águas superficiais do Rio da Prata, não foi detectado 2,4-D. Apesar de o rio fazer parte da Área de Preservação Ambiental do Bacanga, há registros de ações antrópicas nas suas margens, o que implica na necessidade de monitoramento contínuo daquelas águas, considerando que se trata de ponto de captação de água do Sistema Sacavém, responsável por cerca de 20 % do abastecimento público de água da cidade de São Luís, Maranhão.⁹

4. Conclusão

O método mostrou-se linear, seletivo, preciso e robusto com LQ de 5 µg L⁻¹. O preparo de amostra por SPE foi eficiente para extração e concentração de 2,4-D em água de rio, apresentando bons resultados de recuperação e repetitividade. Nas amostras de água do Rio da Prata, não foi detectado o herbicida, porém estudos continuados devem ser feitos, de forma a garantir a qualidade da água, usada em abastecimento público.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Maranhão – UFMA, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA.

Referências Bibliográficas

- ¹ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. *Relatórios de comercialização de agrotóxicos*. Novembro/2016. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/relatorios/substancias-quimicas/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#>>. Acesso em: 08 maio 2017.
- ² Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. *Indicadores de desenvolvimento sustentável*. Brasil, 2015. ISBN 978-85-240-4347-5. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94254.pdf>>. Acesso em: 08 maio 2017.
- ³ Heller, L.; Pádua, V. L. de.; *Abastecimento de água para consumo humano*, Editora UFMG: Belo Horizonte, 2006.
- ⁴ Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim Epidemiológico* -

Monitoramento de Agrotóxicos na Água para Consumo Humano no Brasil, 2013. <<http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/20/2014-028---Boletim-Agrotoxico-.pdf>>. Acesso em: 08 outubro 2018.

⁵ Agency for Toxic Substances and Disease Registry (USA). *Toxicological profile information sheet*. Department of Health and Human Services. 2007. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/Index.asp.%20Acessado%20em%2003/02/17>>. Acesso em: 03 fevereiro 2017.

⁶ Amarante Jr, O. P. de; Melo, F. I. Brito; Franco, T. C. R. S.; Brito, N. M.; Ribeiro, M. L.; *Avaliação do potencial de contaminação por herbicidas – ácido 2,4-diclorofenoxiacético*. São Carlos: RiMa, 2014.

⁷ Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. DOQ-CGCRE-008 – Revisão de 05 agosto 2016. [Link]

⁸ Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Atlas de Saneamento 2011. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://downloads.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 28 fevereiro 2017.

⁹ Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão – CAEMA. *Projetos de governo para a produção de água e distribuição na ilha de São Luís*. Disponível em: <http://www.caema.ma.gov.br/portalcaema/index.php?option=com_content&view=article&id=499&Itemid=116>. Acesso em: 08 abril 2017.

¹⁰ Ministério da Saúde. Portaria de consolidação nº 5 - consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do sistema único de saúde. Brasília, DF. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html>. Acesso em: 2 janeiro 2009.