

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Agrárias
Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal

Junai Carvalho de Souza Lopes

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO
HERBICIDA FLORPIRAUXIFEN-BENZIL EM SOLO E ARROZ**

Montes Claros
2024

Junai Carvalho de Souza Lopes

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO
HERBICIDA FLORPIRAUXIFEN-BENZIL EM SOLO E ARROZ**

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

Orientador: Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério

Coorientador: Prof. Dr. Lázaro Chaves Sicupira

Montes Claros

2024

Lopes, Junai Carvalho de Souza.

L864o
2024 Otimização e validação de métodos de extração para determinação do herbicida florpirauxifen-benzil em solo e arroz [manuscrito] / Junai Carvalho de Souza Lopes. Montes Claros, 2024.
79 f.: il.

Tese (doutorado) - Área de concentração em Produção Vegetal. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Flaviano Oliveira Silvério.

Banca examinadora: Flaviano Oliveira Silvério, Paulo Henrique Fidêncio, Sônia Ribeiro Arrudas, Janaina Teles de Faria, Charles Martins Aguiar.

Inclui referências: f. 25-30; 52-54; 76-78.

1. Herbicidas. 2. Solos. 3. Arroz. I. Silvério, Flaviano Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 632.9


ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 21 dias do mês de fevereiro de 2024, às 7:30 horas, sob a Presidência do Professor Flaviano Oliveira Silvério, D. Sc. (Orientador - UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Paulo Henrique Fidêncio, D. Sc. (UFVJM/Diamantina), Sônia Ribeiro Arrudas, D. Sc. (Unimontes), Janaína Teles de Faria, D. Sc. (UFMG/ICA), e Charles Martins Aguiar, D. Sc. (UFMG/ICA), reuniu-se, presencialmente, a Banca de tese de **Junai Carvalho de Souza Lopes**, aluna do Curso de Doutorado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de tese intitulada: **"Otimização e Validação de Métodos de Extração Para Determinação do Herbicida Florpiauxifen-benzil em Solo e Arroz"**, sendo a aluna considerada **Aprovada**. 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.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do **ARTIGO 65** do regulamento do Curso de Doutorado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

Art. 65 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, 1 (um) exemplar impresso e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação ou tese, no prazo de 60 (sessenta) dias.

Montes Claros, 21 de fevereiro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **PAULO HENRIQUE FIDÊNCIO**
 Data: 26/02/2024 10:27:16-0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Paulo Henrique Fidêncio
 Membro

Documento assinado digitalmente
 **SONIA RIBEIRO ARRUDAS**
 Data: 27/02/2024 13:06:09-0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>


Sônia Ribeiro Arrudas
 Membro

Documento assinado digitalmente
 **JANAÍNA TELES DE FÁRIA**
 Data: 26/02/2024 08:39:15-0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Janaína Teles de Faria
 Membro

Documento assinado digitalmente
 **CHARLES MARTINS AGUIAR**
 Data: 26/02/2024 09:33:32-0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Charles Martins Aguiar
 Membro

Documento assinado digitalmente
 **FLAVIANO OLIVEIRA SILVÉRIO**
 Data: 26/02/2024 07:50:16-0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Flaviano Oliveira Silvério
 Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar o dom da vida e por me permitir realizar conquistas importantes no campo pessoal e profissional.

À minha mãe Jandira Carvalho de Souza, por ser uma mulher forte e aguerrida. Com coragem, enfrentou e continua enfrentando as dificuldades que a vida lhe traz, vencendo diariamente cada uma delas. Mãe, você é um exemplo de mulher à frente do seu tempo. Tenho orgulho de ser sua filha.

Ao meu esposo Carlos Magno Ferreira Lopes e meus filhos Magno Antônio e Matheus Felipe, agradeço a Deus por ter vocês sempre comigo, me incentivando, apoiando minhas escolhas e me permitindo realizá-las.

Aos meus irmãos, que me incentivaram nos momentos difíceis e muitas vezes compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

À minha família, pelo apoio, carinho e amizade que sempre me dedicaram.

Aos professores Drs. Flaviano Oliveira Silvério e Lázaro Chaves Sicupira, meu orientador e meu coorientador, que, com competência e habilidades impressionantes, conduziram-me e conduzem vários estudantes neste processo de crescimento intelectual tão importante para o processo educacional da nossa região.

À professora Dra. Gevany Paulino de Pinho, pelo apoio, disponibilidade, e contribuições em minha formação.

Ao meu colega e amigo, Sandro Soares, pelo encorajamento, ajuda e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos amigos que fiz no laboratório, colegas de jornada estudantil e de pesquisa, que estiveram comigo, nos momentos mais difíceis, compartilhando seus conhecimentos e me incentivando a continuar.

Ao Instituto Federal de Minas Gerais (IFNMG) por me incentivar no processo de qualificação e aperfeiçoamento acadêmico.

Ao Laboratório de Química Instrumental (LQI) e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelo apoio acadêmico e por toda a infraestrutura colocada a minha disposição durante a realização deste projeto de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo financeiro, sem o qual a pesquisa no Brasil se torna inviável.

A todos, minha gratidão. Não somos ninguém sozinhos, sempre teremos uma parte de todos que passaram em nossas vidas.

Mesmo quando tudo parecer desabar,
cabe a mim decidir entre rir ou chorar,
ir ou ficar, desistir ou lutar;
porque descobri, no caminho incerto da vida,
que o mais importante é o decidir.

Cora Coralina.

Otimização e validação de métodos de extração para determinação do herbicida florpiauxifen-benzil nas matrizes solo e arroz

RESUMO

O florpiauxifen-benzil é um herbicida pertencente à classe das auxinas sintéticas que foi liberado no Brasil no ano de 2019, para as culturas de arroz, cana-de-açúcar, milho e soja. Em virtude de sua recente liberação, ainda são escassos os estudos de validação de metodologias de extração e análise de resíduos até o momento. Diante deste cenário, é importante um estudo de novas metodologias de extração e análise que poderão ser aplicadas para a quantificação de seus resíduos. Por isso, este estudo teve como objetivo otimizar e validar a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT), para a determinação de florpiauxifen-benzil, nas matrizes solo e arroz, usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). O método de extração utilizou 4,0 g da matriz, 4 mL de água e 8 mL de fase extratora. O sistema foi homogeneizado e congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma hora. Então, parte do extrato foi recuperado, evaporado, ressuspensão em solvente e armazenado em freezer até análise por HPLC-DAD. Para o desenvolvimento da metodologia para a matriz arroz, uma etapa de *clean-up* precisou ser acrescentada, em razão do aspecto amarelado e gorduroso do extrato, que foi recuperado, após a etapa de secagem. Foram otimizadas condições cromatográficas e condições de extração do composto para as matrizes estudadas. As melhores condições cromatográficas, para a matriz solo, foram alcançadas, usando coluna Poroshell, temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, composição de fase móvel acetonitrila e água (85:15 v/v) com ácido fórmico 0,1% (v/v), 243 nm como comprimento de onda e fluxo de $0,3\text{ mL min}^{-1}$. Durante a ESL-PBT, seis fases extratoras foram avaliadas. A melhor fase extratora foi a acetonitrila, contendo ácido fórmico a 0,1% (v/v), que apresentou uma taxa de recuperação de 104,0% e desvio-padrão relativo (DPR) inferior a 4,0%. Foram obtidos limite de detecção de $5\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ e limite de quantificação de $20\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$. O estudo de estabilidade apresentou um resultado de 17,5 dias para o tempo de meia vida do composto. As melhores condições cromatográficas, para a matriz arroz, foram alcançadas, usando coluna Kinetex, temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, composição de fase móvel metanol e água (78:22 v/v), 260 nm como comprimento de onda e fluxo de $0,3\text{ mL min}^{-1}$. A condição ótima de extração foi obtida, utilizando acetonitrila e água (2:1) como fase de extração, seguida de *clean-up* dos extratos com alumina na proporção de 50 mg de alumina por mL de extrato. As porcentagens de recuperação alcançadas foram próximas de 100%, com um desvio-padrão relativo (DPR) inferior a 9,0%. O resultado apresentou efeito de matriz significativo (184,3%), mas a metodologia foi precisa, exata, linear e seletiva, com limite de quantificação de $5,0\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$.

Palavras-chave: florpiauxifen-benzil; auxina sintética; ESL-PBT.

Optimization and validation of extraction methods for determining the herbicide florpyrauxifen-benzyl in matrices soil and rice

ABSTRACT

Florpyrauxifen-benzyl is a herbicide belonging to the synthetic auxin class that was released in Brazil in 2019, for rice, sugar cane, corn and soybean crops. By virtue its recent release, there are still few validation studies on waste extraction methodologies and analysis to date. Given this scenario, it is important to study new extraction and analysis methodologies that can be applied to quantify waste. Therefore, this study aimed to optimize and validate solid-liquid extraction with low temperature purification (SLE-LTP), for the determination of floryprauxifen-benzyl, in soil and rice matrices, using high-performance liquid chromatography coupled to detection by diode array (HPLC-DAD). The extraction method used 4.0 g of matrix, 4 mL of water and 8 mL of extractor phase. The system was homogenized and frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one hour. Then, part of the extract was recovered, evaporated, resuspended in solvent and stored in a freezer until analysis by HPLC-DAD. To development of the methodology for the rice matrix, a clean-up stage needed to be added, due to the yellowish and greasy appearance of the extract, which was recovered after the drying stage. They were optimized chromatographic conditions and compound extraction conditions for the studied matrices. The best chromatographic conditions for the soil matrix were achieved using a Poroshell column, temperature of $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, mobile phase composition of acetonitrile and water (85:15 v/v) with 0.1% (v/v) formic acid, 243 nm as wavelength and flow of 0.3 mL min^{-1} . During SLE-LTP, six extractor phases were evaluated. The best extracting phase was acetonitrile, containing 0.1% (v/v) formic acid, which presented a recovery rate of 104.0% and relative standard deviation (RSD) of less than 4.0%. They were obtained a detection limit of $5\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ and a quantification limit of $20\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$. The stability study presented a result of 17.5 days for the half-life time of the compound. The best chromatographic conditions for the rice matrix were achieved using Kinetex column, temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, mobile phase composition of methanol and water (78:22 v/v), 260 nm as wavelength and flow of 0.3 mL min^{-1} . The optimal extraction condition was obtained using acetonitrile and water (2:1) as the extraction phase, followed by clean-up of the extracts with alumina in the proportion of 50 mg of alumina per mL of extract. The recovery percentages achieved were close to 100%, with a relative standard deviation (RSD) of less than 9.0%. The result presented a significant matrix effect (184.3%), but the methodology was precise, accurate, linear and selective, with a quantification limit of $5.0\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$.

Keywords: floryprauxifen-benzyl; synthetic auxin; SLE-LTP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

3 REVISÃO DE LITERATURA	16
Figura 1 – Consumo de agrotóxicos no Brasil no ano de 2021.....	16
Figura 2 – Estrutura química da molécula do florpiauxifen-benzil.....	18
Figura 3 – Etapas da técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura.....	21
4 ARTIGOS	31
4.1 Artigo 1 – Método de extração para determinar o herbicida florpiauxifen-benzil no solo.....	31
Figura 1. Estrutura química da molécula do florpiauxifen-benzil.....	34
Figura 2. Espectro de absorção na região ultravioleta da solução padrão do florpiauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de 1,0 mg L ⁻¹	38
Figura 3. Cromatogramas da solução padrão do florpiauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ . Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = 20 µL, fase móvel acetonitrila = 100:0, taxa de fluxo = 0,4 mL min ⁻¹ , temperatura (T) = 30 °C e comprimento de onda (λ) = 210 nm (-), (λ) = 243 nm (-) e (λ) = 260 nm (-).....	39
Figura 4. Cromatogramas da solução padrão do florpiauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ . Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = 20 µL, fase móvel acetonitrila = 100:0, λ = 243 nm, taxa de fluxo = 0,4 mL min ⁻¹ , T = 30 °C (a) e 35 °C (b).....	40
Figura 5. Cromatogramas da solução padrão do florpiauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ . Condições cromatográficas: volume de injeção = 20 µL, fase móvel acetonitrila = 100:0, vazão = 0,4 mL min ⁻¹ , T = 30 °C, λ = 243 nm, colunas Poroshell (a) Kinetex (b)	40
Figura 6. Cromatogramas da solução padrão do florpiauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ . Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = 20 µL, fase móvel acetonitrila = 100:0, T = 30 °C, λ = 243 nm, taxa de fluxo = 0,3 mL min ⁻¹ (a), 0,4 mL min ⁻¹ (b), 0,5 mL min ⁻¹ (c) e 1,0 mL min ⁻¹ (d).....	41
Figura 7. Cromatogramas da solução padrão do florpiauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de 0,5 mg L ⁻¹ . Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = 10 µL, taxa de fluxo = 0,3 mL min ⁻¹ , T = 30 °C e λ = 243 nm. Fase móvel (a) 100% acetonitrila; (b) 100% acetonitrila com AF; (c) (90% acetonitrila:10% água) com AF; (d) (85% acetonitrila:15% água) com AF; (e) (80% acetonitrila:20% água) com AF; (f) (75% acetonitrila:25% água) com AF; (g) (70% acetonitrila:30% água) com AF.....	42
Figura 8. Cromatogramas do extrato fortificado com florpiauxifen-benzil a 90,0 µg kg ⁻¹ . Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = 10 µL, vazão = 0,3 mL min ⁻¹ , T = 30 °C e λ = 243 nm. Fase móvel (a) 100% acetonitrila; (b) 100% acetonitrila com AF; (c) (90% acetonitrila:10% água) com AF; (d) (85% acetonitrila:15% água) com AF; (e) (80% acetonitrila:20% água) com AF; (f) (75% acetonitrila:25% água) com AF; (g) (70% acetonitrila:30% água) com AF.....	44

Figura 9. Taxa de recuperação de florpiauxifen-benzil nas seis diferentes composições da fase de extração. As barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. A: acetoneitrila:água (8:4 v/v); B: acetoneitrila com AF:água (8:4 v/v); C: acetoneitrila:água com AF (8:4 v/v); D: (acetoneitrila:água) com AF (8:4 v/v); E: acetoneitrila + acetato de etila:água (6,5 + 1,5:4 v/v); F: (acetoneitrila:água) com HCl (8:4 v/v)	45
Figura 10. Cromatograma do extrato enriquecido com florpiauxifen-benzil a 90 µg kg ⁻¹ . (a) acetoneitrila:água (8:4 v/v); (b) acetoneitrila com AF:água (8:4 v/v); (c) acetoneitrila:água com AF (8:4 v/v); (d) (acetoneitrila:água) com AF (8:4 v/v); (e) acetoneitrila + acetato de etila:água (6,5 + 1,5:4 v/v); (f) (acetoneitrila:água) com HCl (8:4 v/v).....	46
Figura 11. Cromatogramas do extrato de solo sem o analito (extrato em branco) (a) e extrato de solo fortificado com florpiauxifen-benzil a 90 µg kg ⁻¹ (b).....	47
Figura 12. Gráficos obtidos no estudo de linearidade da metodologia otimizada. (a) Curvas analíticas de soluções de florpiauxifen-benzil em extratos de solventes e matriz, em que R ² : coeficiente de determinação. (b) Resíduos de regressão linear para florpiauxifen-benzil. (c) Probabilidade normal de resíduos de regressão para florpiauxifen-benzil, em que R: coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner. (d) Autocorrelação dos resíduos de regressão para florpiauxifen-benzil, em que e _i : resíduo.....	49
Figura 13. Concentração média de florpiauxifen-benzil em amostras de solo por 150 dias.....	51
4.2 Artigo 2 – Método de extração para determinar o herbicida florpiauxifen-benzil em arroz.....	55
Fig. 1 Cromatograma do extrato da matriz fortificada com florpiauxifen-benzil para a concentração de 90 µg kg ⁻¹ (-----), cromatograma do extrato da matriz livre de florpiauxifen-benzil (extrato em branco) (- -) e cromatograma do padrão de florpiauxifen-benzil em solvente acetoneitrila para a concentração de 500 µg kg ⁻¹ (—). Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = 20 µL, fase móvel acetoneitrila:água (100:0), T = 30 °C, taxa de fluxo = 0,4 mL min ⁻¹ , λ = 243 nm (a); coluna Poroshell, volume de injeção = 10 µL, fase móvel acetoneitrila acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico:água (85:15), T = 30 °C, taxa de fluxo = 0,3 mL min ⁻¹ , λ = 243 nm (b).....	64
Fig. 2 Cromatograma do extrato da matriz fortificada com florpiauxifen-benzil para a concentração de 90 µg kg ⁻¹ (—) e cromatograma do extrato da matriz livre de florpiauxifen-benzil (extrato branco) (- -). Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = 10 µL, taxa de fluxo = 0,3 mL min ⁻¹ , T = 25 °C, λ = 260 nm e fase móvel metanol:água (78:22).....	64
Fig. 3 Espectro de absorção na região ultravioleta da solução padrão de florpiauxifen-benzil em acetoneitrila para a concentração de 1.0 mg L ⁻¹	65
Fig. 4 Porcentagens de extração de florpiauxifen-benzil em quatro diferentes composições de fases extratoras. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente uma das outras pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. (A) acetoneitrila:água (8:4 v/v), (B) acetoneitrila acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico:água (8:4 v/v), (C) acetoneitrila acidificada com 0,1% (v/v) de ácido clorídrico:água (8:4 v/v), (D) acetoneitrila + acetato de etila:água (6,5+1,5:4 v/v).....	66
Fig. 5 Cromatograma do extrato da matriz fortificada com florpiauxifen-benzil para a concentração de 90 µg kg ⁻¹ (—) e cromatograma do extrato da matriz livre de florpiauxifen-benzil (extrato em	

branco) (- -). Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = 10 µL, T = 25 °C, taxa de fluxo = 0,3 mL min⁻¹, λ = 260 nm e fase móvel metanol:água (78:22). (a) acetonitrila:água (8:4 v/v), (b) acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico:água (8:4 v/v), (c) acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido clorídrico:água (8:4 v/v), (d) acetonitrila + acetato de etila:água (6,5+1,5:4 v/v)..... 67

Fig. 6 Porcentagens de extração de florpírauxifen-benzil da matriz arroz, empregando o método ESL-PBT nas condições otimizadas: fase extratora acetonitrila:água (8:4 v/v) para seis diferentes condições de *clean-up* (sílica gel funcionalizada com octadecila (C18), florissil, carvão ativado (Act. Charc), alumina, amina primária e secundária (PSA) e sílica gel) todos na concentração de 50 mg de adsorvente por mL de extrato da matriz arroz..... 68

Fig. 7 Cromatograma do extrato da matriz fortificada com florpírauxifen-benzil para a concentração de 90 µg kg⁻¹ (—) e cromatograma do extrato da matriz livre de florpírauxifen-benzil (extrato em branco) (- -). Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = 10 µL, T = 25 °C, taxa de fluxo = 0,3 mL min⁻¹, λ = 260 nm e fase móvel metanol:água (78:22). *Clean-up* realizado com 50 mg de adsorvente por mL de extrato da matriz. (a) adsorvente C18, (b) florissil, (c) carvão ativado (Act. Charc), (d) alumina, (e) PSA e (f) sílica gel 60..... 69

Fig. 8 Porcentagem de extração de florpírauxifen-benzil da matriz arroz, empregando o método ESL-PBT nas condições otimizadas: fase extratora acetonitrila:água (8:4 v/v) e *clean-up* usando o adsorvente alumina nas concentrações de 50 e 100 mg de adsorvente por mL de extrato da matriz arroz 70

Fig. 9 (a) Cromatograma do extrato da matriz livre do analito (extrato branco) e (b) cromatograma do extrato da matriz fortificada com florpírauxifen-benzil para a concentração de 90 µg kg⁻¹. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = 10 µL, fase móvel metanol:água (78:22), T = 25 °C, taxa de fluxo = 0,3 mL min⁻¹, λ = 260 nm..... 72

Fig. 10 Gráficos obtidos no estudo de linearidade da metodologia otimizada para florpírauxifen-benzil. (a) Curvas analíticas de calibração deste composto em solvente e extrato da matriz. (b) Resíduos de regressão linear com exclusão dos valores extremos. (c) Probabilidade normal dos resíduos de regressão. (d) Gráfico de autocorrelação dos resíduos de regressão pelo teste de Durbin-Watson. R²: coeficiente de determinação; R: coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner; e_i: resíduo..... 73

LISTA DE TABELAS

3 REVISÃO DE LITERATURA	16
Tabela 1 – Número de registros aprovados de agrotóxicos no Brasil entre 2020-2022	17
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do florpiauxifen-benzil.....	18
Tabela 3 – Métodos de extração e técnicas cromatográficas de análises descritas na literatura para a quantificação de matrizes sólidas	19
4 ARTIGOS	31
4.1 Artigo 1 – Método de extração para determinar o herbicida florpiauxifen-benzil no solo....	31
Tabela 1. Condições cromatográficas otimizadas.....	35
Tabela 2. Composições da fase de extração.....	36
Tabela 3. Resultados do estudo de validação analítica.....	48
4.2 Artigo 2 – Método de extração para determinar o herbicida florpiauxifen-benzil em arroz..	55
Tabela 1 Condições cromatográficas otimizadas.....	59
Tabela 2 Composição das fases extratoras avaliadas.....	60
Tabela 3 Estudo comparativo das condições cromatográficas para a determinação de florpiauxifen-benzil.....	63
Tabela 4 Estudo comparativo dos métodos de extração desenvolvidos em estudos anteriores e o método otimizado neste estudo.....	71
Tabela 5 Resultados do estudo de validação analítica.....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Uso de agrotóxicos no Brasil	16
3.2 O herbicida florpiauxifen-benzil	17
3.3 Método de análise em matrizes sólidas.....	19
3.4 Validação da metodologia de análise	22
3.4.1 Seletividade	22
3.4.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	22
3.4.3 Precisão e exatidão	23
3.4.4 Linearidade	23
3.4.5 Efeito de matriz	23
3.5 Referências.....	25
4 ARTIGOS	31
4.1 Artigo 1 – Método de extração para determinar o herbicida florpiauxifen-benzil no solo	31
4.2 Artigo 2 – Método de extração para determinar o herbicida florpiauxifen-benzil em arroz.....	55
5 CONCLUSÃO	79

1 INTRODUÇÃO GERAL

Na última década, o Brasil esteve entre os países que mais utilizaram agrotóxicos no mundo, correspondendo, em 2021, a aproximadamente 20% do consumo mundial. Na mesma via, a utilização de compostos químicos, para realizar o controle de pragas no país, vem aumentando e, desde o ano de 2018, observa-se crescente e significativo incremento na liberação de registros, componentes e afins (FAO, 2023; MAPA, 2023).

Entre os vários registros de agrotóxicos no Brasil, durante o ano de 2019, podemos destacar o composto denominado florpiauxifen-benzil. Essa substância foi registrada como Produto Formulado à Base de Ingrediente Ativo Novo (PFN) e liberado para uso no território brasileiro para a cultura do arroz. Trata-se de um herbicida que pertence à classe das auxinas sintéticas e é atuante no controle de plantas daninhas resistentes em locais aquáticos de água doce (ANVISA, 2023; APVMA, 2018; MDA, 2019).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA), o herbicida apresenta classificação toxicológica nível III, indicando que é medianamente tóxico com perfil de toxicidade ocorrendo por vias oral, cutânea e inalatória (ANVISA, 2023; MDA, 2019). Com relação à quantificação dos resíduos de florpiauxifen-benzil, estudos demonstram que ainda existem diversas lacunas de dados, como, por exemplo, a falta de resultados de quantificação em pólen, produtos apícolas, solo e de contaminação ambiental (EFSA, 2018).

As análises de monitoramento desse composto, propostas pela Agência de Proteção Ambiental Americana (em inglês, *United States Environmental Protection Agency-US EPA*), Agência Regulatória Européia (em inglês, *European Food Safety Authority-EFSA*) e Agência Australiana de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (em inglês, *Australian Pesticides and Veterinary Medicines-APVMA*), indicam, até o momento, que a metodologia de extração deve ocorrer pelo método QuEChERS (em inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), cuja sigla em português significa um método rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro. Para as análises, recomendam a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (em inglês, *High Performance Liquid Chromatography to tandem Mass Spectrometry-HPLC-MS/MS*) (US EPA, 2017a; APVMA, 2018; EFSA, 2018; MDA, 2019).

Embora essa metodologia de extração tenha se mostrado eficiente, é desejável o desenvolvimento de outras que possam ser mais simples, mais fáceis de executar, mais eficientes e mais baratas. Nesse sentido, trabalhos anteriores mostraram que a extração sólido-líquido com a purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) atendeu a essas características, quando aplicada a outros contaminantes ambientais, em diferentes tipos de matrizes (PINHO et al., 2009; ANDRADE et al., 2017; MESQUITA et al., 2018). Uma vantagem da metodologia de ESL-PBT é que a extração e limpeza dos extratos ocorrem em uma única etapa.

A análise por cromatografia líquida utilizando o detector por arranjos de diodos (em inglês, *High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection-HPLC-DAD*), é uma opção que tem se mostrado eficiente e promissora. Os resultados alcançados por esta metodologia têm atendido as exigências de padrões internacionais na quantificação de diferentes analitos (SICUPIRA et al., 2019; VIEIRA et al, 2022; LOPES; SICUPIRA; SILVÉRIO, 2023).

Faz-se necessário ampliar o conhecimento acerca dos métodos de extração de análise de resíduos, da capacidade de persistência e biodegradabilidade do florpiauxifen-benzil, quanto aos diferentes tipos de matrizes, em que esse composto poderá estar presente, visto que essas matrizes podem ser contaminadas causando prejuízos à biota e aos seres humanos.

As matrizes estudadas têm grande importância, no monitoramento dos analitos, por se tratarem de um dos destinos da cadeia de uso dos agrotóxicos. As matrizes solo e arroz foram escolhidas neste estudo por se tratar de fontes diretas de contato com o herbicida, sendo ainda o arroz um cereal que está presente diariamente na alimentação do brasileiro, o que o potencializa a se tornar uma fonte de contaminação ao ser humano.

Dessa forma, espera-se com este estudo contribuir para que uma nova metodologia de extração e quantificação possa ser implantada, em análises de resíduos desse agrotóxico, a fim de realizar acompanhamento dos riscos de contaminação do meio ambiente e possível intoxicação do cidadão pela exposição e consumo contínuo do alimento.

Por isso, a proposta deste trabalho envolveu o estudo da metodologia de ESL-PBT, para resíduos do agrotóxico florpiauxifen-benzil, em amostras de solo e arroz com quantificação, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). Esse método foi validado, por meio da faixa de linearidade, precisão, exatidão, seletividade, limite de quantificação e detecção e efeito de matriz, entre outros, conforme recomendação do protocolo SANTE (SANTE, 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimizar e validar o método de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) para determinação de resíduos do herbicida florpirauxifen-benzil, em amostras de solo e arroz, usando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD).

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1. Otimizar as condições cromatográficas para a determinação do florpirauxifen-benzil em extratos de solos e arroz.

2.2.2. Otimizar o método de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT), para a determinação do florpirauxifen-benzil, em amostras de solos e arroz.

2.2.3. Validar o método de extração ESL-PBT por meio da seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e efeito de matriz.

2.2.4. Aplicar o método otimizado e validado para avaliar a estabilidade desse herbicida no solo.

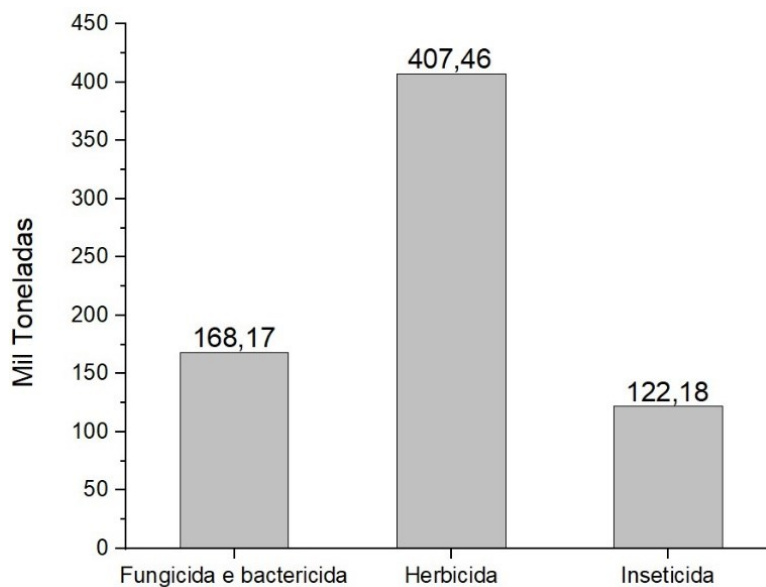
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Uso de agrotóxicos no Brasil

A consolidação da indústria agroquímica, após a segunda guerra mundial, na América do Norte e na Europa Ocidental, associada ao desenvolvimento e aplicação de tecnologias, para esse setor, introduziram novos tipos de agrotóxicos na cadeia produtiva impulsionando o seu uso na agricultura (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). No Brasil, esse processo foi incentivado, durante a revolução verde, por meio de programas de liberação de créditos, para os produtores agrícolas e ocorreu, nas décadas de 1970, por meio do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA) (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; MORAES, 2019).

No ano de 2021, o Brasil ocupou o primeiro lugar entre os países que mais utilizaram agrotóxicos no mundo, e os herbicidas foram os mais consumidos, chegando ao total de 407,5 mil toneladas, o que correspondeu a 56,6% de todo agrotóxico vendido no país, como pode ser observado na Figura 1 (FAO, 2023; IBAMA, 2023).

Figura 1 – Consumo de agrotóxicos no Brasil no ano de 2021.



Fonte: Adaptado de FAO, 2023.

No ano de 2022, foram liberados 652 novos registros de agrotóxicos no país (MAPA, 2023), entre os quais 35 foram inéditos, com formulações à base de ingredientes ativos novos, indicando uma tendência de crescimento na liberação dessas substâncias. Neste ano, o total de agrotóxicos químicos formulados chegou a quase duas vezes o total de agrotóxicos biológicos e orgânicos de baixo risco. A Tabela 1 mostra o número total de registros de agrotóxicos liberados, anualmente no Brasil, no período entre 2020-2022.

Tabela 1 – Número de registros aprovados de agrotóxicos no Brasil entre 2020-2022

Ano	Total
2020	493
2021	562
2022	652

Fonte: Adaptado de MAPA, 2023.

Os principais programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos no país são o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) e o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Os resultados dessas análises são relevantes em desenvolvimento de pesquisas, programas de fiscalização, proteção da saúde e meio ambiente (MEIRA, 2015).

A Agência de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA) é responsável por coordenar o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Esse programa, cuja abrangência é nacional, tem entre seus objetivos o monitoramento de resíduos de agrotóxicos, em alimentos de origem vegetal, a fim de produzir informações a respeito de possíveis riscos à saúde em função da dieta alimentar (ANVISA, 2020).

Nesse contexto, observa-se com preocupação o crescente número de registros e é necessário reforçar a importância das análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos e a divulgação de resultados a esse respeito.

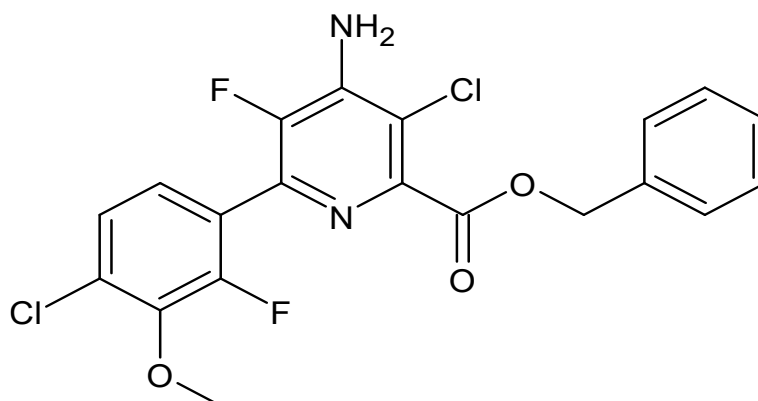
3.2 O herbicida florpírauxifen-benzil

Os herbicidas podem ser classificados quanto à seletividade, espectro de ação, época de aplicação, mecanismo de ação, translocação na planta e caráter iônico. O herbicida florpírauxifen-benzil (Benzil 4-amino-3-cloro-6-(4-cloro-2-fluor-3-metoxifenil)-5-fluorpiridina-2-carboxilato) é classificado como um mimetizador de auxina, um dos hormônios reguladores de crescimento vegetal, pelo seu mecanismo de ação (CARVALHO, 2013).

Esse tipo de composto é também conhecido como auxina sintética e pertence ao grupo-O, grupo dos benzoatos e dos (fenoxi, piridina, quinolina)carboxilatos. É capaz de causar uma série de alterações nos processos metabólicos da planta-alvo por sua ação nos mesmos locais (sítios) de ação da auxina natural. Sua aplicação pode promover a elevação da concentração da auxina, que não pode ser controlada pelo metabolismo natural da planta, dessa forma, ocorre um colapso no funcionamento celular, causando danos ao crescimento e levando a planta-alvo à morte por esgotamento de reservas e perda de função celular (CARVALHO, 2013).

Este princípio ativo pode ser aplicado, na parte aérea das plantas daninhas, sendo absorvido pelas folhas e posteriormente metabolizado na forma ativa. O herbicida se move pelo floema e se acumula nas regiões de cultivo, atuando como um herbicida seletivo, sistêmico e pós-emergente. A estrutura química desse composto pode ser vista na Figura 2 (US EPA, 2017b; MDA, 2019; ANVISA, 2023; WANG et al., 2021; ZHOU et al., 2022).

Figura 2 – Estrutura química da molécula do florigrauxifen-benzil.



Fonte: MDA, 2019.

Esse herbicida foi autorizado, no Brasil, em 2019, pela resolução RE n. 1,394 de 24/05/2019, para ser usado no combate a plantas daninhas, em lavouras de arroz, cana-de-açúcar, milho e soja, mas também em outras culturas como algodão, sorgo e girassol, que geralmente podem ser cultivadas após a colheita do arroz (ANVISA, 2023; US EPA, 2017b; MDA, 2019; MILLER; NORSWORTHY, 2018; ASSUNÇÃO et al., 2020; WRIGHT et al., 2021).

O florigrauxifen-benzil possui baixa solubilidade em água ($< 0,015 \text{ mg L}^{-1}$) e elevada afinidade por solventes orgânicos apolares (MDA, 2019; APVMA, 2018; MILLER; NORSWORTHY, 2018). Essas características são favoráveis para a contaminação e acúmulo em solos, plantas, além de favorecer a entrada na cadeia alimentar, uma vez que algumas variedades de arroz têm sido cultivadas em solos altamente irrigados (ASSUNÇÃO et al., 2020). A Tabela 2 apresenta as principais propriedades físico-químicas desse herbicida.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do florigrauxifen-benzil

Fórmula molecular	$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3$
Massa molecular	$439,248 \text{ g mol}^{-1}$
Cor e estado físico	Pó castanho
pH a 23,4 °C	6,58 (1% m/m de dispersão em H_2O destilada)
Solubilidade em água (20°C)	$0,015 \text{ mg L}^{-1}$ água purificada
Solubilidade em solventes orgânicos (20°C)	210 g L^{-1} em acetona 13 g L^{-1} em metanol
Pressão de vapor	$4,6 \cdot 10^{-5} \text{ Pa}$ (25°C) $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ Pa}$ (20°C)
Tempo de meia vida	8 a 10 dias para solo inundado

Fonte: Adaptado de APVMA, 2018; IUPAC, 2019.

A toxicidade desse composto ao homem e ao meio ambiente tem sido objeto de estudos no Brasil e em outros países como Austrália, Itália, Espanha e Estados Unidos da América (APVMA, 2018; EFSA, 2018; BUCZEK et al., 2020). O perfil de toxicidade indica contaminação por vias oral, cutânea e inalatória, com classificação toxicológica, nível III, considerado medianamente tóxico. Portanto a inserção desse princípio ativo no meio ambiente deve ser monitorada detalhadamente, pois o uso desse produto pode causar episódios de contaminação ambiental e humana, e seus impactos ainda são pouco estudados e conhecidos (APVMA, 2018).

Por causa de sua recente inserção na agricultura, são raros os relatos sobre o método de extração, para a determinação desse herbicida, em amostras de solo e arroz.

3.3 Método de análise em matrizes sólidas

Um método de análise precisa oferecer com eficiência a capacidade de extrair diferentes analitos de diferentes tipos de matrizes, remover os possíveis interferentes, ser robusto e preciso, rápido, de baixo custo, com reduzido tempo de análise e consumo de solventes orgânicos e reagentes químicos (HERCEGOVÁ; DÖMÖTÖROVÁ; MATISOVÁ, 2007). Diferentes métodos de extração e técnicas de análises têm sido empregados na tentativa de ampliar cada vez mais o alcance para diversas matrizes. A Tabela 3 apresenta os métodos de extração QuEChERS e ESL-PBT com diferentes técnicas analíticas para matrizes sólidas descritos na literatura.

Tabela 3 – Métodos de extração e técnicas cromatográficas de análises descritas na literatura para a quantificação em matrizes sólidas

Método de extração	Técnica de análise	Matriz	Referência
QuEChERS ^a	LC-MS/MS ^b	Arroz	Rebelo et al., 2016 Mardani et al., 2021 Sefiloglu; Tezel; Balcioglu, 2021
		Solo	Sefiloglu; Tezel; Balcioglu, 2021
	CG-tandem MS (MS/MS) ^c	Arroz	Mondal; Kole; Bhattacharyya, 2017
	CG-MS ^d	Lodo de esgoto	Ramalho et al., 2019
ESL-PBT ^e	CG-MS/MS ^f	Lodo de esgoto Solo	Andrade et al., 2017
	HPLC-DAD ^g	Solo	Lopes; Sicupira; Silvério, 2023

^a*Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*; ^bcromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem; ^ccromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem; ^dcromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa; ^eextração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura; ^fcromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; ^gcromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos.

Fonte: LOPES, J. C. S, 2024.

O método de extração QuEChERS (em inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*), cuja sigla em língua portuguesa remete à descrição das suas características como rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, foi proposto por Anastassiades e Lehotay em 2003. O princípio da técnica originalmente utilizada, no desenvolvimento do método QuEChERS, utiliza 10 g de amostra, 10 mL do solvente de extração, que normalmente é a acetonitrila, seguida pela agitação em vórtex. A partição do sistema ocorre pela adição de sais (normalmente, uma mistura de 1 g de NaCl e 4 g de MgSO₄), que causa um efeito conhecido como “*salting out*” ao qual é atribuído uma melhora nos percentuais de recuperação do analito. Esses sais diminuem a solubilidade do sistema (dos analitos na fase aquosa e de água na fase orgânica), o que contribui para a redução do volume da fase aquosa e favorece a extração de compostos apolares. Um padrão interno é adicionado e uma etapa de *Clean-up* realizada por meio da extração em fase sólida dispersiva (em inglês, *Dispersive Sólido Phase Extraction*, D-SPE). Nessa etapa, ocorre a adição de uma mistura do sorvente (em inglês, *Primary Secondary Amine*, PSA) com MgSO₄ (25 mg:150 mg) por mL de extrato, seguida de centrifugação, o que possibilita diminuir os coextrativos polares (PRESTES et al., 2009).

Algumas modificações no método original foram estudadas por Mastvoska e Lehotay, entre elas estão a acidificação da acetonitrila, por meio da utilização de ácido acético; a substituição do NaCl por acetato de sódio; o aumento dos volumes de amostra e solvente; a substituição da agitação em vórtex por agitação manual e a realização de uma etapa de concentração ao final do método. Essas alterações foram significativas e demonstraram melhorias na porcentagem de recuperação para compostos de diferentes polaridades, na seletividade e na diminuição dos limites de quantificação (MASTVOSKA; LEHOTAY, 2004; LEHOTAY; MASTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005).

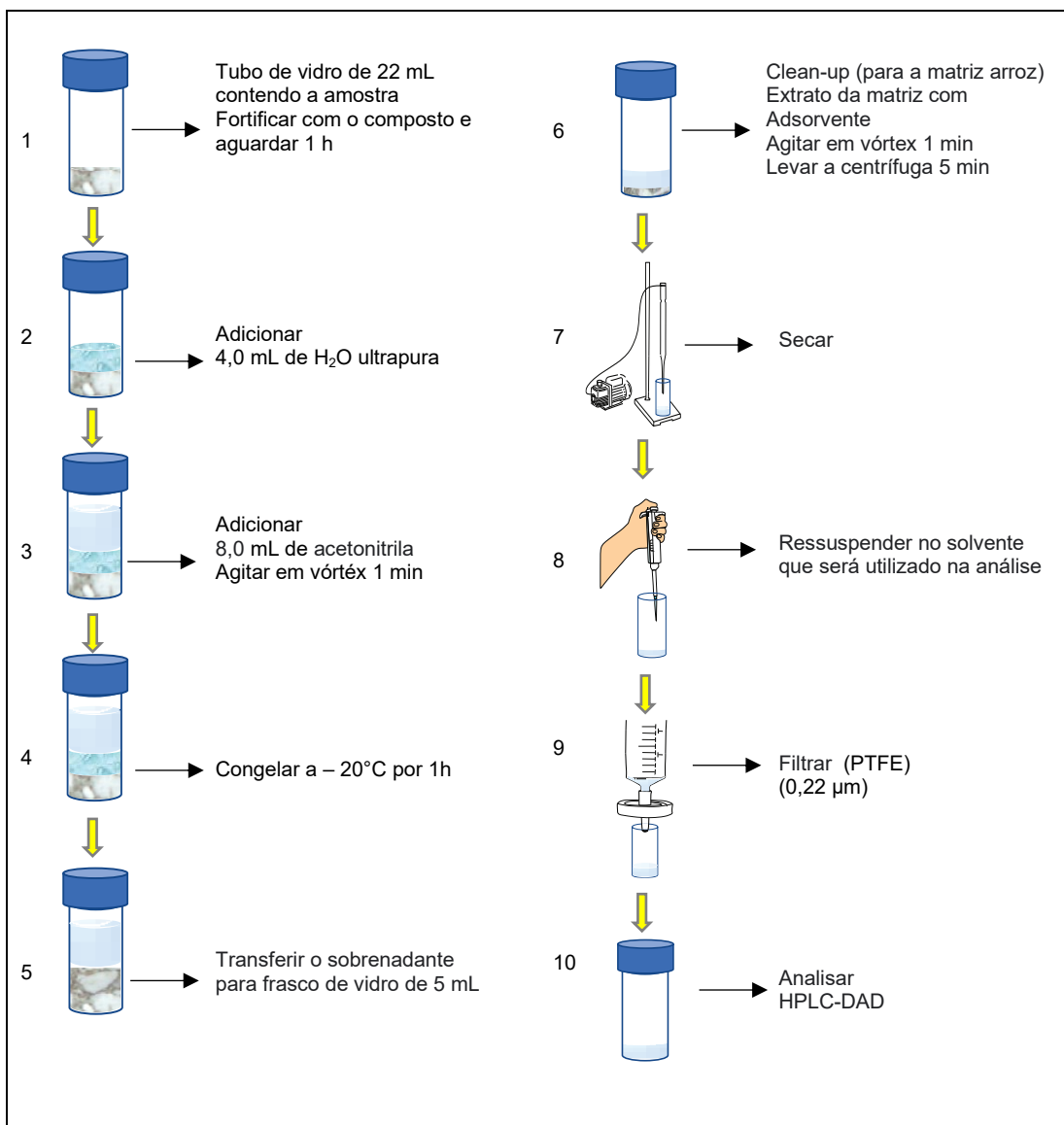
Entre as vantagens do método de extração QuEChERS estão a capacidade de realizar o preparo de várias amostras, em curto espaço de tempo, uso reduzido de volumes de solventes e a obtenção de percentuais de recuperação superiores a 85% mesmo em compostos de diferentes polaridades (PRESTES et al., 2009; NAZIR; RAFIQUE; AHAD, 2017). Entretanto, como desvantagens, está a realização de etapa de *clean-up* e de concentração da amostra, uma vez que a concentração final do extrato obtido é inferior, quando comparado a outros métodos de extração e, para atingir os limites de quantificação desejados, o extrato necessita de uma etapa de concentração o que aumenta o seu tempo de execução (PRESTES et al., 2009; AL-ALAM et al., 2017).

O método de extração sólido líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) foi utilizado, inicialmente, na extração de pesticidas, em 1960, quando foi empregado por Anglin e Mckinley para quantificação de dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) em extratos de plantas (ANGLIN; MCKINLEY, 1960). Desde então vem sendo utilizado para a extração de diferentes tipos de compostos e matrizes. Podem ser citados, por exemplo, as determinações de organoclorados, organofosforados, piretroides, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), carbamatos, dioxinas, entre outros (PINHO; SILVÉRIO, 2010; FREITAS et al., 2014; BARBOSA et al., 2014; ANDRADE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018; MESQUITA et al., 2018). Trata-se de um dos principais métodos de extração de agrotóxicos utilizados e apresenta vantagens, em relação aos outros métodos, por se tratar de uma técnica simples, com número reduzido de etapas, eficiente e seletivo. Utiliza reduzidas quantidades de amostras e de solventes orgânicos e permite a realização de extrações simultâneas, além de possibilitar a extração dos analitos e a limpeza dos extratos ao mesmo tempo (FREITAS et al., 2014; RODRIGUES et al., 2018).

Essa técnica consiste em realizar a extração do analito de interesse pela adição de água (4 mL) e uma fase orgânica extratora (8 mL) à amostra sólida (4 g), que contém o analito-alvo, então, o sistema é homogeneizado em vórtex e colocado sob temperaturas reduzidas (-20°C).

O congelamento da amostra é a etapa na qual ocorre a partição do analito entre a fase orgânica e aquosa. Nesse momento, alguns interferentes presentes na matriz tendem a serem congelados juntamente com a fase aquosa, promovendo, assim, uma purificação do extrato. O analito de interesse, que inicialmente estava na fase sólida, migra para a fase orgânica, que permanece líquida nessa temperatura. Em seguida, o extrato é recolhido, concentrado, ressuscitado no solvente (ou fase móvel), em que será analisado e filtrado. A Figura 3, a seguir, representa as etapas da técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) utilizadas neste estudo.

Figura 3 – Etapas da técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura.



Fonte: LOPES, J. C. S, 2024.

3.4 Validação da metodologia de análise

A validação da metodologia otimizada é uma etapa prevista e necessária para demonstrar que o método analítico proposto permite a obtenção de resultados confiáveis, precisos e adequados à qualidade desejada. Os procedimentos de validação devem incluir, sempre que possível, as figuras de mérito: seletividade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), faixa de linearidade, precisão, exatidão e efeito de matriz (SANTE, 2021; INMETRO, 2020; BAZILIO et al., 2012; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). A seguir, são apresentadas as figuras de mérito utilizadas, como ferramentas para validar as metodologias desenvolvidas neste trabalho.

3.4.1 Seletividade

A seletividade do método refere-se à capacidade de distinção do analito-alvo na presença de outros compostos possivelmente interferentes. Para avaliar esse parâmetro, comparam-se cromatogramas do extrato da matriz fortificada com o analito de interesse, na concentração desejada de trabalho, com o cromatograma do extrato da matriz isenta do analito (SANTE, 2021). A ausência de picos cromatográficos de interferentes, no mesmo tempo de retenção do analito avaliado, configura a seletividade do método.

3.4.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A sensibilidade de um método analítico está associada à sua capacidade em detectar e quantificar o analito em estudo. Sua determinação ocorre, por meio das medidas dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e existem diferentes formas de realizar essas medidas e, uma delas é a relação sinal/ruído. Os valores de LD e LQ devem ser determinados, por meio de experimentos de fortificação da matriz com a menor quantidade de composto, que possa ser detectada e quantificada, respectivamente. A relação entre o sinal do composto e o ruído na linha de base na amostra é realizada pela comparação dos sinais, definindo as concentrações mínimas de detecção e quantificação que podem ser realizadas com confiança (BRITO et al., 2003; PEREZ, 2010; SANTE, 2021; INMETRO, 2020).

Os LD e LQ são as concentrações do analito em estudo que devem gerar picos cromatográficos com área três e dez vezes maior, respectivamente, que a área cromatográfica do ruído da linha de base, no mesmo tempo de retenção do analito-alvo, no cromatograma do extrato da matriz isenta do composto (extrato branco) (INMETRO, 2020).

Os limites máximos de resíduos de pesticidas (LMRs) em alimentos são estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (FAO, 2024) e é desejável que o LD e o LQ de um método estejam abaixo desses níveis.

O limite máximo de resíduo estabelecido no Brasil pela ANVISA, para o composto florpiauxifenbenzil na matriz arroz, é de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ANVISA, 2023). Em relação à matriz solo, esse valor ainda não foi definido, então, os valores utilizados, como referência neste estudo, foram obtidos por comparação a LQs obtidos, para herbicidas como o diuron, glifosato, nicosulfuron e bromacil, para a mesma matriz, utilizando diferentes métodos de extração. Esses valores estavam na faixa de 40 a 83 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (PINTO; LANÇAS, 2009; BOTERO-COY et al., 2013; LAZIĆ; ŠUNJKA, 2014).

3.4.3 Precisão e exatidão

A exatidão e precisão de um método estão associadas à tendência de recuperação do analito-alvo na amostra analisada. Para determinar a exatidão do método em estudo, os ensaios de recuperação têm sido realizados, em triplicatas independentes, em três diferentes níveis, incluindo o valor do limite de quantificação (LQ) (SANTE, 2021).

A exatidão deve ser avaliada pelo coeficiente de variação das medidas, e as taxas de recuperação obtidas devem estar com valores entre 70 e 120% para serem consideradas aceitáveis (SANTE, 2021).

A precisão do método foi determinada sob condições de repetibilidade. Para determinar a precisão do método em estudo, os ensaios de recuperação devem ser realizados em, no mínimo, cinco repetições independentes (SANTE, 2021). O método, para ser considerado preciso, deve fornecer resultados para o desvio padrão-relativo (DPR) obtidos em cada análise com valores inferiores a 20% (SANTE, 2021).

3.4.4 Linearidade

A linearidade do método analítico demonstra a capacidade de obter resultados proporcionais à concentração do analito em um determinado intervalo (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). A faixa de trabalho deve ser construída, levando-se em consideração o limite de restrição do analito presente na legislação. Essa concentração deve estar no ponto central da faixa de trabalho, na qual a curva analítica apresenta a menor incerteza, para a determinação da concentração (BAZILIO et al., 2012; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Os níveis de concentração escolhidos, para compor a curva de calibração (seis), devem ser equidistantes e realizados com três repetições independentes para cada nível.

O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), descrito como método analítico a ser usado na avaliação da linearidade, utiliza a estimativa dos parâmetros da regressão linear com exclusão máxima de 22,2% dos dados (teste de Jackknife), o tratamento de valores extremos (outliers) e a avaliação dos resíduos pelos parâmetros de normalidade pelo teste de Ryan-Joiner, homoscedasticidade, pelo teste de Brown-Forsythe e independência pelo teste de Durbin-Watson (BAZILIO et al., 2012; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

A análise de variância (ANOVA) é aplicada aos dados da curva analítica para verificar a significância dos parâmetros da regressão e do desvio de linearidade (BAZILIO et al., 2012; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

3.4.5 Efeito de matriz

O efeito de matriz corresponde a uma alteração na resposta da análise cromatográfica e pode ser ocasionada por diferentes fatores, entre eles, influência da natureza da matriz, tipo de coextrativos presentes e condições cromatográficas utilizadas. Observa-se que, para matrizes mais complexas, como as alimentares (frutas, mel, sucos, leite, etc) e as utilizadas neste estudo (solo e arroz), esse efeito se torna mais acentuado. Na perspectiva de anular este efeito, uma etapa de *clean-up* adicional pode ser inserida na metodologia (PINHO et al., 2009).

Uma forma de avaliar o efeito de matriz é a construção de duas curvas analíticas utilizando os mesmos níveis de concentração e a comparação entre os resultados obtidos por elas. A primeira curva deve ser realizada com o analito-alvo em solvente puro e a outra com o analito-alvo em extrato da matriz. Além disso, a análise de linearidade deve ser realizada para as duas curvas (INMETRO, 2020).

Os possíveis efeitos produzidos no sistema cromatográfico podem ser avaliados pela razão entre o coeficiente angular obtido na curva analítica em extrato da matriz e o coeficiente angular obtido na curva analítica no solvente. A equação matemática demonstrada, a seguir, é utilizada para avaliar esse parâmetro.

$$\text{Efeito de matriz (\%)} = 100 * \left(\frac{I_{\text{matriz}}}{I_{\text{solvente}}} - 1 \right)$$

Em que: I_{matriz} = é o coeficiente angular da curva analítica no extrato da matriz fortificada com o analito alvo; I_{solvente} = é o coeficiente angular da curva analítica para o composto em solvente.

O resultado encontrado tem sido interpretado da seguinte forma: valores encontrados entre – 20% e + 20% são atribuídos a um baixo efeito de matriz; valores encontrados entre – 50% e – 20% ou entre + 20% e + 50% são considerados um efeito de matriz médio; e valores encontrados abaixo de – 50% ou acima de + 50% são considerados alto efeito de matriz (TOMASINI et al., 2012; ECONOMOU et al., 2009).

Os dados obtidos no estudo de validação de um método analítico devem ser usados como parâmetros que possibilitem demonstrar que esse método, nas condições em que é praticado, tem características que tornam a metodologia adequada para a análise do pesticida estudado.

No próximo capítulo, são apresentados dois artigos, demonstrando o desenvolvimento de metodologia de análise e validação para o florpiauxifen-benzil em amostras de solo e arroz. As metodologias utilizaram as figuras de mérito descritas neste capítulo e demonstraram confiabilidade, para as análises, já que os resultados estavam dentro dos parâmetros descritos por SANTE (SANTE, 2021).

3.5 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. **Anal Bioanal Chem**, v. 409, p. 5157–5169, 2017.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOC International**, v. 86, n.2, p. 412431, 2003.

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

ANGLIN, C.; MCKINLEY, W. P. Insecticide residues, procedure for clean-up of plant extracts prior to analyses for DDT and related pesticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 186-189, 1960.

APVMA. Australian Pesticides and Veterinary Medicines. **On the evaluation of the new active florpypauxifen-benzyl (Rinskor™) in the Product GF-3301 Herbicide**. 2018. Disponível em: <<https://apvma.gov.au/node/29096>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

ASSUNÇÃO, T. O. G.; GOMES, F. B. R.; BRANDT, E. M. F.; PEREIRA, R. O. Novos agrotóxicos e o padrão de potabilidade da água: dinâmica ambiental e riscos à saúde. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, v. 17, e16, 2020.

BARBOSA, E. S.; EVANGELISTA, G. F.; PIMENTA, E. M.; SILVÉRIO, F. O.; PINHO, G. P. Otimização e validação da extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura de HPAs em lodo de esgoto. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 404-410, 2014.

BAZILIO, F. S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J.; ABRANTES, S. M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Revista Analytica**, n. 59, p. 60-67, 2012.

BOTERO-COY, A. M.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 132-141, 2013.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A.; A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**. Relatório de atividades de 2017-2018. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>>. Acesso em: 05 nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Índice Monográfico F71: Flupiraxifen-benzílico**. Instrução Normativa - IN nº 237 de 01/08/23 (DOU de 02/08/23). 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/f/4376json-file-1/view>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUCZEK, S. B.; ARCHAMBAULT, J. M.; GREGORY COPE, W.; HEILMAN, M. A.; BULL. Evaluation of juvenile freshwater mussel sensitivity to multiple forms of flupiraxifen-benzyl. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 105, p. 588-594, 2020.

CARVALHO, L. B. **Herbicidas**. 1ª ed. Santa Catarina. Lages: Editado pelo autor, 2013. 62 p.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009.

EFSA. European Food Safety Authority. (Org.). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flupiraxifen (variant assessed flupiraxifen-benzyl). **European Food Safety Authority Journal**, v. 16 (8), p. 5378, 2018.

FAO. Organização das Nações Unidas para a alimentação e a Agricultura. **Pesticides use**. 2023. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>>. Acesso em: 10 jan. 2024.

FAO. Organização das Nações Unidas para a alimentação e a Agricultura. **Pesticides**. 2024. Disponível em: <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/pesticides/es/>>. Acesso em: 10 jan. 2024.

FREITAS, R. S.; QUEIROZ, M. E. L. R.; FARONI, L. R. D'A.; HELENO, F. F.; MOURA, V. V. Desenvolvimento do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de inseticidas em grãos de milho ozonizados. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 238-243, 2014.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 54–73, 2007.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>. Acesso em: 15 jul. 2023.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **DOQ-CGCRE-008**. Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2020. Disponível em: <<https://app.sogi.com.br/Manager/texto/arquivo/exibir/arquivo?eyJ0eXAiOiJKV1QiLCJhbGciOiJIUzI1NiJ9>>

AFFIjAvMTM4ODM3NS9TR19SZXF1aXNpdG9fTGvNjYwXfVGV4dG8vMC8wL0RPU1DZ2NyZS04XzA5LnBkZi8wLzAiAFFBcMYdNmecpDn0m0Dj4vzJmvMJZMAYtW6mklIj0C7fk>. Acesso em: 10 jan. 2023.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Pesticide properties database; 2019. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/3097.htm>. Acesso em: 15 julho 2022.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

LAZIC, S.; ŠUNJKA, D. Solid-phase extraction followed by hplc/dad for determination of sulfonylurea herbicide in soil. **Research Journal of Agricultural Science**, v. 46, n.2, p. 132-138, 2014.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables **Journal of AOC International**, v. 88, n.2, p. 615-629, 2005.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde debate**, v. 42, n. 117, p. 518-534, 2018.

LOPES, J. C. S.; SICUPIRA, L. C.; SILVÉRIO, F. O. Extraction method for determining florpyrauxifen-benzyl herbicide in soil, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, n. 2, p. 302-308, 2023.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agrotóxicos**. Registros concedidos. 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>>. Acesso em: 10 jan. 2024.

MARDANI, Z.; SHAKOORI, A.; PEIRAVIAN, F.; NOURI, L.; SALAMZADEH, J. Development of a liquid chromatography-mass spectrometry technique for evaluation of multi-class pesticides in rice samples. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 1, p. 165-174, 2021.

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259–272, 2004.

MDA - Massachusetts Department of Agriculture, **Review of Florpyrauxifen-benzyl for Application to Massachusetts Lakes and Ponds**. 2019. Disponível em: <<https://www.mass.gov/doc/florpyrauxifen-benzyl>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

MEIRA, A. P. G. Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 22, n. 2, p. 766-777, 2015.

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.

MILLER, M. R.; NORSWORTHY, J. K. Assessment of floupyrauxifen-benzyl potential to carryover to subsequent crops. **Weed Technology**, v. 32, n. 4, p. 404-409, 2018.

MONDAL, R.; KOLE, R. K.; BHATTACHARYYA, A. Validation of multiresidue method for analysis of 31 pesticides in rice using gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 4, 2017.

MORAES, R. F. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Brasília, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2023.

NAZIR, S.; RAFIQUE, N.; AHAD, K. Comparative evaluation of extraction procedures and chromatographic techniques for analysis of multiresidue pesticides in honey. **Journal of Environmental and Toxicological Studies**, v. 1, n 1, 2017.

PEREZ, M. A. F. **Validação de métodos analíticos: como fazer? Por que ela é importante?** Instituto de Tecnologia de Alimentos, n. 3, v. 22, p. 1-9, 2010. Disponível em: <https://ital.agricultura.sp.gov.br/arquivos/cetea/informativo/v22n3/v22n3_artigo2.pdf>. Acesso em 10 jan. 2023.

PINHO G. P.; NEVES A. A.; QUEIROZ M. E. L. R.; SILVÉRIO F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.

PINHO G. P.; SILVÉRIO F. O. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 909-913, 2010.

PINTO, J. S. S.; LANÇAS, F. M. Design, construction and evaluation of a Simple pressurized solvent extraction system. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 5, p. 913-917, 2009.

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.

RAMALHO, M. B.; DURÃES, A. F. S.; SILVÉRIO, F. O.; PINHO, G. P. Determination of three cresol isomers in sewage sludge by solid-liquid extraction with low temperature purification and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 55, n. 3, p. 184-192, 2019.

REBELO, A. M.; DOLZAN, M. D.; HELLER, M.; DESCHAMPS, F. C.; ABATE, G.; MICKE, G. A.; GRASSI, M. T. Simultaneous determination of herbicides in rice by QuEChERS and LC-MS/MS using matrix-matched calibration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 1, p. 186-193, 2016.

RODRIGUES, R. P.; FARIAS, W. R.; GOULART, S. M.; GOULART, A. C.; SANTOS, J. P. V.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização da extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação

de carbofurano em *cucurbita pepo L* ("abobrinha") por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quimica Nova**, v. 41, n. 2, p. 213-218, 2018.

SANTE/11312/2021 European Commission. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. 2021. Disponível em: <<https://www.accredia.it/documento/guidance-sante-11312-2021-analytical-quality-control-and-method-validation-procedures-for-pesticide-residues-analysis-in-food-and-feed/>>. Acesso em: 3 set. 2022.

SEFILOGLU, F. O.; TEZEL, U.; BALCIOGLU, I. A. Validation of an analytical workflow for the analysis of pesticide and emerging organic contaminant residues in paddy soil and rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 11, p. 3298-3306, 2021.

SICUPIRA L. C.; TIAGO J. P. F.; PINHO G. P.; SILVÉRIO F. O. 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**, v. 30, n. 6, p. 1284-1292, 2019.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method Scheilla V.C. de Souza, Roberto G. Junqueira. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M. R. F.; CALDAS, S. S.; BUFFON, J. G.; DUARTE, F. A.; PRIMEL, E. G. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 99, p. 380-386, 2012.

US EPA. United States Environmental Protection Agency. **Florpyrauxifen-benzyl**: Environmental fate and ecological effects risk assessment for the registration of the new herbicide for the use on rice and aquatics. 2017b. Disponível em: <<https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2016-0560-0011>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

US EPA. United States Environmental Protection Agency. **Florpyrauxifen-benzyl**: New active ingredient, first food use. Human health risk assessment for the establishment of permanent tolerances on rice, fish, and shellfish and registration for uses on rice and freshwater aquatic weed control. 2017a. Disponível em: <<http://fluoridealert.org/wp-content/uploads/florpyrauxifen-benzyl.human-health-risk-assessment.2017>>.pdf. Acesso em: 25 jul. 2022.

VIEIRA L. H. S.; SICUPIRA L. C.; CACIQUE A. P.; SILVÉRIO F. O. Optimization and validation of LLE-LTP to determine florpyrauxifen-benzyl herbicide in water samples by HPLC-DAD. **J Environ Sci Health B Pestic Food Contam Agric Wastes**, v. 57, n. 9, p. 697-709, 2022.

WANG, H.; SUN, X.; YU, J.; LI, J.; DONG, L. The phytotoxicity mechanism of florpyrauxifen-benzyl to *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv and weed control effect. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 179, p. 104978, 2021.

WRIGHT, H. E.; NORSWORTHY, J. K.; ROBERTS, T. L.; SCOTT, R. C.; HARDKE, J. T.; GBUR, E. E. Use of florpyrauxifen-benzyl in non-flooded rice production systems. **Crop, forage & Turfgrass**

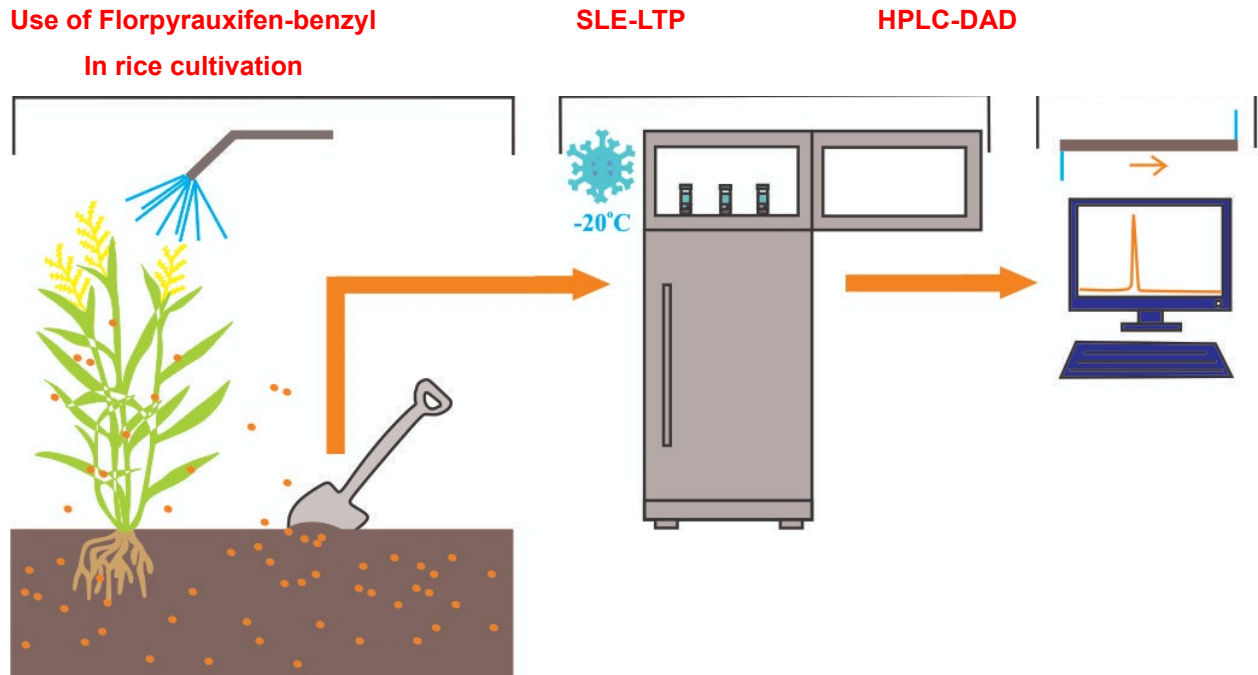
Management, v. 7, e20081, 2021.

ZHOU R.; DONG Z.; BIAN C.; WU T.; ZHOU W.; LI Y.; LI B. **Florpyrauxifen-benzyl in paddy field environment: its residue analysis, dissipation dynamics, storage stability, dietary risk assessment and decontamination.** 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4008164>>. Acesso em: 18 fev. 2023.

4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1 – Método de extração para determinar o herbicida florpirauxifen-benzil no solo

Este artigo foi elaborado conforme as normas do periódico “*Journal of the Brazilian Chemical Society*”.



O resumo gráfico representa a metodologia ESL-PBT combinada com HPLC-DAD utilizada no presente estudo.

Método de Extração para Determinar o Herbicida Florpirauxifen-benzil no Solo

Junai C. S. Lopes,^a Lázaro C. Sicupira^b e Flaviano O. Silvério^{*,a}

^a Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, 39404-547, Montes Claros-MG,
Brasil

^b Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri, 39440-000, Janaúba-MG, Brasil

* e-mail: flavianosilverio@ufmg.br

Resumo

O florpiauxifen-benzil é o novo princípio ativo autorizado pela legislação brasileira, que atua como herbicida e pode ser utilizado no controle de ervas daninhas no cultivo do arroz, mas estudos sobre toxicidade ao homem e ao meio ambiente ainda estão em revisão. Em razão da recente inserção no mercado mundial de agrotóxicos, ainda existem poucos estudos relacionados às metodologias de extração e detecção desse composto. Portanto este estudo teve como objetivo otimizar e validar a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT), para a determinação de florpiauxifen-benzil, em solo usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). Os resultados mostraram que as melhores condições cromatográficas foram alcançadas, usando coluna Poroshell, temperatura de 30 °C, composição de fase móvel acetonitrila e água (85:15 v/v) acidificada com ácido fórmico 0,1% (v/v), taxa de fluxo de 0,3 mL min⁻¹ e 243 nm como comprimento de onda. Durante a ESL-PBT, seis fases extratoras foram avaliadas. A melhor fase extratora foi a acetonitrila, contendo ácido fórmico a 0,1% (v/v), que apresentou uma taxa de recuperação de 104,0 % e desvio-padrão relativo (DPR) inferior a 3,9%. A metodologia foi precisa, exata, linear e seletiva. Foram obtidos limite de detecção de 5 µg kg⁻¹ e limite de quantificação de 20 µg kg⁻¹. O estudo de estabilidade no solo apresentou um resultado de 17,5 dias para o tempo de meia vida do composto.

Palavras-chave: florpiauxifen-benzil, ESL-PBT, herbicida, arilpicolinato

Introdução

Florpirauxifen-benzil é um potente herbicida do grupo químico arilpicolinato, sendo seletivo e pós-emergente para plantas daninhas que atuam principalmente na cultura do arroz.¹⁻⁴ A estrutura química desse composto pode ser vista na Figura 1.⁵

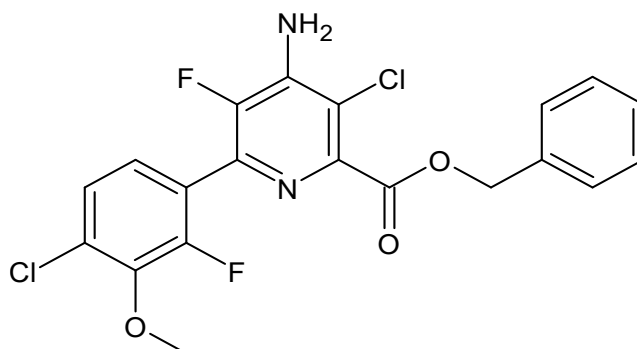


Figura 1. Estrutura química da molécula do florpirauxifen-benzil.

Esse princípio ativo pode ser aplicado, na parte aérea das plantas daninhas, sendo absorvido pelas folhas e posteriormente metabolizado na forma ativa. O herbicida se move pelo floema e se acumula nas regiões de cultivo, atuando como um herbicida sistêmico e pós-emergente. Esse herbicida foi autorizado, no Brasil, em 2019², para ser usado no combate a plantas daninhas, em lavouras de arroz, mas também em outras culturas como soja, algodão, milho, sorgo e girassol, que geralmente podem ser cultivadas após a colheita do arroz.⁶⁻⁹

A toxicidade desse composto ao homem e ao meio ambiente tem sido objeto de estudos no Brasil e em outros países.¹⁰⁻¹² Portanto sua inserção no meio ambiente deve ser monitorada detalhadamente, pois o uso desse produto pode causar episódios de contaminação ambiental e humana e seus impactos ainda são pouco estudados e conhecidos.¹⁰⁻¹²

Esse herbicida possui baixa solubilidade em água ($< 0,015 \text{ mg L}^{-1}$) e alta afinidade por solventes orgânicos apolares.^{5,10,13,14} Essas características são favoráveis para a contaminação e acúmulo em solos, plantas, além de favorecer a entrada na cadeia alimentar, uma vez que algumas variedades de arroz têm sido cultivadas em solos altamente irrigados.⁸

Por sua recente inserção na agricultura, são raros os relatos sobre o método de extração, para a determinação desse herbicida, em amostras de solo. Até o momento, apenas o método QuEChERS, cuja sigla em português significa um método rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, foi otimizado e validado para esse composto.⁴ Embora essa metodologia tenha se mostrado muito eficiente, é desejável o desenvolvimento de outras metodologias que possam ser mais simples, mais fáceis de executar, mais eficientes e mais baratas. Nesse sentido, trabalhos anteriores^{15,16} mostraram que a extração sólido-líquido, com a purificação em baixa temperatura (ESL-PBT), atendeu a essas características, quando aplicada a outros contaminantes ambientais em diferentes tipos de matrizes. Uma das principais vantagens desta metodologia é a extração e limpeza dos extratos em uma única etapa.

Portanto pretende-se otimizar a metodologia ESL-PBT para a determinação deste herbicida, em amostras de solo, usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD).

Experimental

Reagentes e soluções

A acetonitrila grau HPLC foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O solvente P.A. acetato de etila foi adquirido da Dinâmica (Indaiatuba, Brasil) e a acetonitrila da Êxodo Científica (Sumaré, Brasil). Todos os solventes foram filtrados em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com poros de $0,22\mu\text{m}$ adquirida da Filtrilo (Colombo, Brasil). O ácido fórmico foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e o ácido clorídrico da Anidrol (Diadema, Brasil). O padrão de florpiauxifen-benzil foi adquirido da LGC Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha). As soluções padrão estoque foram preparadas na concentração de 20 mg L^{-1} e as soluções de trabalho foram preparadas na concentração de 5 mg L^{-1} . Todas as soluções foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Equipamento

Os equipamentos utilizados neste estudo incluíram um vórtex da Scilogex (Rocky Hill, EUA), uma bomba de vácuo da Prismatec (Itu, Brasil), uma balança analítica da Shimadzu (Barueri, Brasil) e um espectrofotômetro Cary 50 ultravioleta e visível (UV-Vis) da Agilent Technologies (St. Clair, EUA).

Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um HPLC-DAD, modelo 1290, Agilent Technologies (St. Clair, EUA). O volume de injeção foi de $10\text{ }\mu\text{L}$ para a coluna Poroshell (St. Clair, EUA) e $20\text{ }\mu\text{L}$ para a coluna Kinetex (Torrance, EUA). As condições cromatográficas avaliadas podem ser vistas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas avaliadas

Parâmetros	
	210
Comprimento de onda (λ) / nm	243 260
Coluna cromatográfica	Kinetex (C18) (100A, 150 x 4,60 mm, 5 μm , Phenomenex) Poroshell 120 EC-C18 (50 x 4,60 mm, 2,7 μm , Agilent)

Composição da fase móvel em modo isocrático	Acetonitrila:água 100:0 (v/v) (Acetonitrila:água) ^a com (AF) ^b
	0,3
Taxa de fluxo / (mL min ⁻¹)	0,4 0,5 1,0
	30
Temperatura da coluna / °C	35

^a100:0; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25 e 70:30 (v/v); ^bsolução a 0,1% (v/v) de ácido fórmico.

Otimização da ESL-PBT

A ESL-PBT foi otimizada avaliando seis composições de fase de extração (Tabela 2). Esse método de extração é baseado na adição de 4,0 g de solo, em frascos de vidro (22 mL) e 72 µL de solução de trabalho, contendo florpiauxifen-benzil na concentração de 5 mg L⁻¹. A mistura foi mantida em repouso por 1h para permitir a completa integração do analito com a matriz. Em seguida, foram adicionados 4 mL de água e 8 mL da mistura extratora e o sistema foi homogeneizado em vórtex por 30 s, sendo mantido a – 20 °C por 1 h para o congelamento completo da fase aquosa. Em seguida, 3 mL do extrato obtido foram completamente evaporados, ressuspensos em 400 µL de acetonitrila acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e armazenados a – 20 °C até análise por HPLC-DAD. A taxa de extração foi avaliada pelo teste t ($P < 0,05$).

Tabela 2. Composições da fase de extração

Ensaio	Fases extratoras		Proporção / mL
A	ACN ^a	H ₂ O	8:4
B	ACN + AF ^b	H ₂ O	8:4
C	ACN	H ₂ O + AF	8:4
D	ACN + AF	H ₂ O + AF	8:4
E	ACN + AE ^c	H ₂ O	6,5 + 1,5:4
F	ACN + HCl ^d	H ₂ O + HCl	8:4

^aACN: acetonitrila; ^bAF: solução a 0,1% (v/v) de ácido fórmico; ^cAE: acetato de etila; ^dHCl: solução a 0,1% (v/v) de ácido clorídrico.

Validação da metodologia

A validação da metodologia foi realizada por meio de seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, faixa de linearidade e efeito de matriz.¹⁷ A seletividade foi

investigada comparando cromatogramas de extratos da matriz do solo enriquecida e do branco (extrato de matriz livre de flupiraxifen-benzil), em seis repetições independentes.

O LD e LQ foram determinados por amostras de solo fortificadas, com a menor quantidade possível de flupiraxifen-benzil, que pode ser detectada e quantificada usando as condições de extração otimizadas. Para determinar o LD e LQ, considerou-se a relação sinal/ruído comparando os sinais obtidos nas amostras fortificadas com os ruídos das amostras sem fortificação (brancos) no mesmo tempo de retenção. Foram considerados três e dez vezes a relação sinal/ruído para o LD e LQ, respectivamente.

A exatidão foi avaliada, por meio de experimentos que recuperam o analito da matriz fortificada, usando três níveis de concentração de 20,0, 90,0 e 195,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com três repetições cada. A exatidão foi analisada pela recuperação dos analitos, em que valores entre 70 e 120% foram considerados aceitáveis.

A precisão foi determinada, por meio de experimentos que recuperam o analito da matriz fortificada, usando um nível de concentração de 90,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com sete repetições. A precisão foi avaliada pelo desvio-padrão relativo (DPR) das repetições, sendo DPR inferior a 20% o critério de aceitabilidade.¹⁷

A faixa de linearidade foi avaliada, por meio de curvas analíticas da matriz fortificada, em seis níveis de concentração de: 20,0; 55,0; 90,0; 125,0; 160,0 e 195,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com três repetições independentes para cada nível. Os parâmetros da regressão linear foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários e baseados na análise dos resíduos da regressão, com exclusão máxima de 22,2% dos dados (teste de Jackknife). Os resíduos da regressão linear foram avaliados pelos parâmetros de normalidade (teste de Ryan e Joiner), homocedasticidade (teste de Brown e Forsythe) e independência (teste de Durbin e Watson). A análise de variância (ANOVA) foi aplicada às curvas analíticas para verificar o quanto a linha de regressão explica os valores que foram usados para ajustar a linearidade.^{18,19}

O efeito da matriz foi avaliado, utilizando duas curvas analíticas, sendo a primeira em solvente (acetonitrila) e a segunda em extrato de solo fortificado, ambas contendo o flupiraxifen-benzil nas concentrações de: 20,0; 55,0; 90,0; 125,0; 160,0 e 195,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em triplicata. As duas curvas foram avaliadas de acordo com o procedimento de linearidade, conforme descrito anteriormente. O efeito de matriz foi determinado pela Equação 1.

$$\text{Taxa de efeito de matriz (\%)} = \left(\frac{\text{Inclinação}_{\text{matriz}} - \text{Inclinação}_{\text{solvente}}}{\text{Inclinação}_{\text{solvente}}} \times 100 \right) \quad (1)$$

Em que: $\text{Inclinação}_{\text{matriz}}$ = coeficiente angular da curva analítica no extrato de solo enriquecido; $\text{Inclinação}_{\text{solvente}}$ = coeficiente angular da curva analítica em solvente (acetonitrila).

Valores entre - 20% e + 20% foram interpretados como baixo efeito de matriz, entre - 20% e - 50% ou entre + 20% e + 50% como médio efeito de matriz e valores abaixo de - 50% ou acima de + 50% como alto efeito de matriz.^{20,21}

Estudo da estabilidade do florpirauxifen-benzil no solo

Um experimento foi preparado neste estudo para avaliar a estabilidade do florpirauxifen-benzil no solo, simulando condições ambientais. Primeiro, 4,0 g de amostra de solo livre de florpirauxifen-benzil foram adicionados a um frasco de vidro de 22,0 mL. Em seguida, cada amostra de solo foi enriquecida com florpirauxifen-benzil, obtendo-se uma concentração inicial de $195,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os frascos foram mantidos abertos ao sol por 1, 5, 10, 15 e 20 dias. Após cada dia, as amostras foram submetidas a ESL-PBT, nas condições otimizadas, seguidas de análise por HPLC-DAD para determinar a concentração de florpirauxifen-benzil presente no solo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados e discussão

Otimização das condições cromatográficas

A primeira etapa do estudo foi definir o comprimento de onda para a determinação do florpirauxifen-benzil. O espectro de absorção pode ser observado na Figura 2.

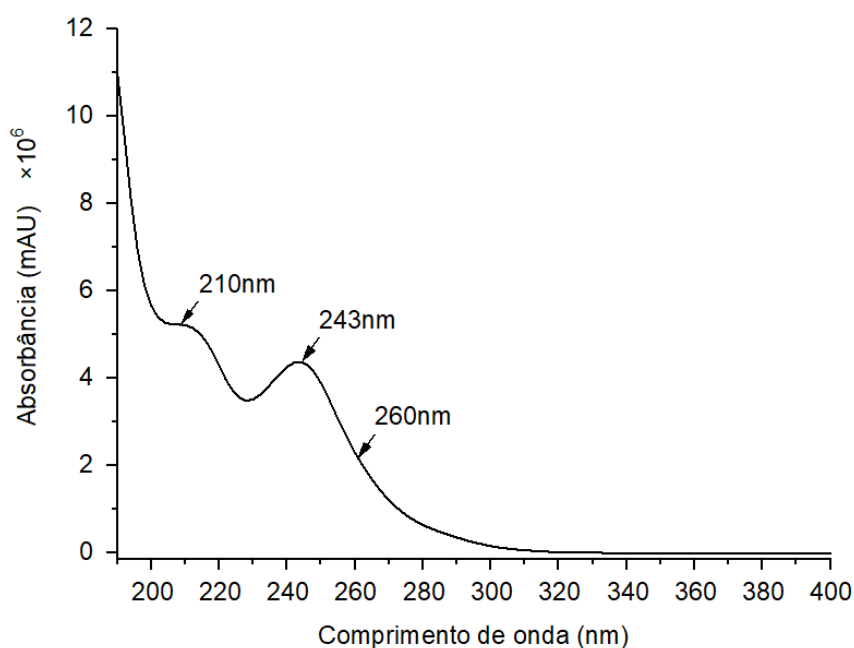


Figura 2. Espectro de absorção na região ultravioleta da solução padrão do florpirauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

O espectro obtido revelou que as maiores absorbâncias foram observadas em 210 e 243 nm. Entretanto, o comprimento de onda de 260 nm também foi avaliado, por se tratar de uma região de absorbância do composto considerável e por ser uma região em que menos interferentes absorvem,

quando comparados aos comprimentos de onda de 210 e 243 nm. Esses comprimentos de onda foram avaliados em HPLC-DAD e os cromatogramas obtidos podem ser observados na Figura 3.

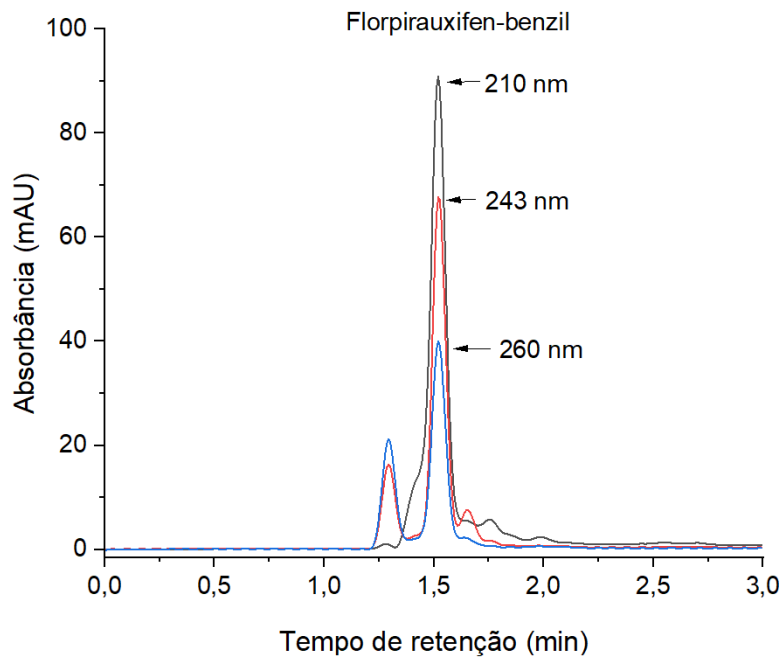


Figura 3. Cromatogramas da solução padrão do florpirauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = $20 \text{ }\mu\text{L}$, fase móvel acetonitrila = 100:0, taxa de fluxo = $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura (T) = $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e comprimento de onda (λ) = 210 nm (-), (λ) = 243 nm (-) e (λ) = 260 nm (-).

Os resultados mostraram que o sinal do composto em 210 nm não foi adequadamente separado, conforme mostrado na Figura 3. Por outro lado, 260 nm foi seletivo, mas o sinal reduziu consideravelmente em intensidade, portanto 243 nm foi definido como um comprimento de onda adequado para determinar esse herbicida. Da mesma forma, um estudo anterior relatou que o florpirauxifen-benzil apresentou maior absorvância em 212 e 245 nm em soluções ácidas e neutras, respectivamente.⁶

Em seguida, duas temperaturas de análise foram avaliadas para melhor separar o sinal do analito alvo do sinal do interferente. Os cromatogramas obtidos podem ser observados na Figura 4.

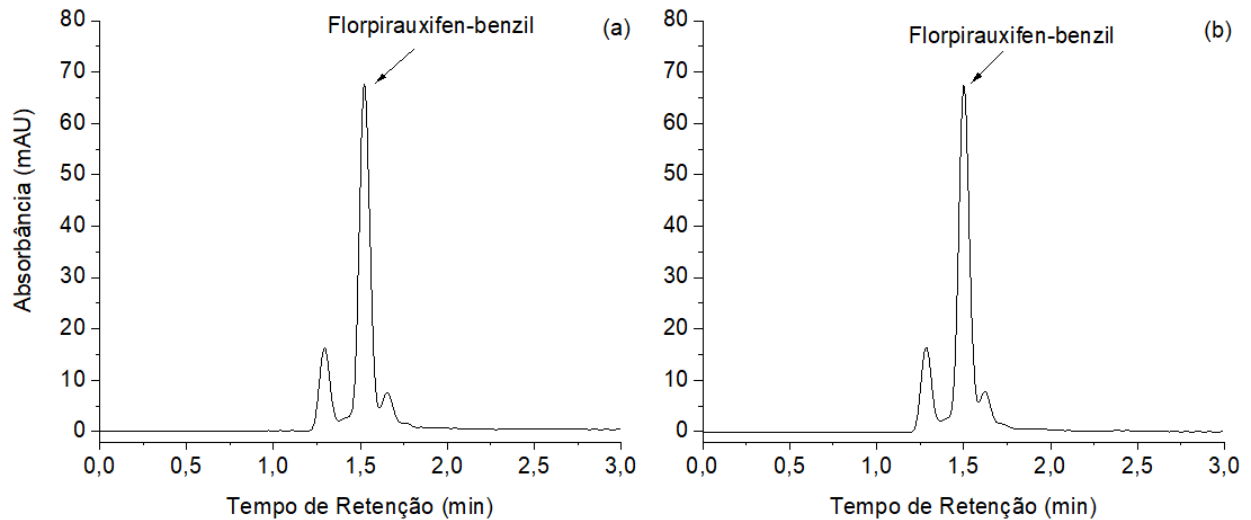


Figura 4. Cromatogramas da solução padrão do florpirauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = $20 \mu\text{L}$, fase móvel acetonitrila = 100:0, $\lambda = 243 \text{ nm}$, taxa de fluxo = $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ (a) e $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (b).

Os resultados revelaram que o aumento da temperatura promove uma aproximação do sinal interferente ao sinal do analito, portanto a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ foi definida para este estudo.

A seguir, duas colunas cromatográficas foram avaliadas, para a determinação do florpirauxifen-benzil, como pode ser observado na Tabela 1. Os resultados obtidos podem ser observados nos cromatogramas da Figura 5.

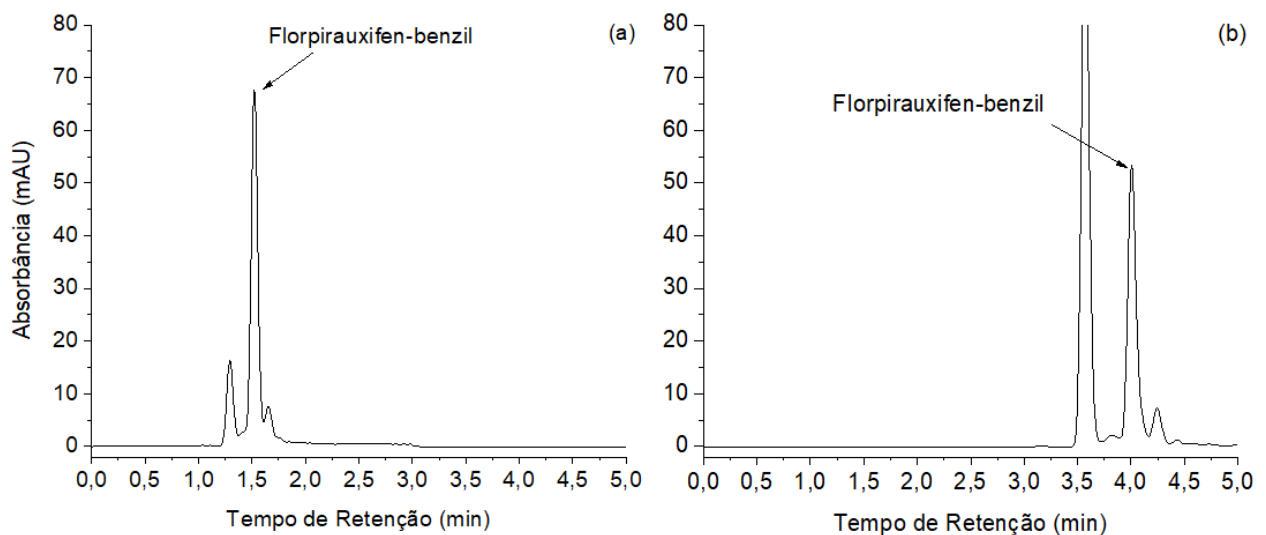


Figura 5. Cromatogramas da solução padrão do florpirauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Condições cromatográficas: volume de injeção = $20 \mu\text{L}$, fase móvel acetonitrila = 100:0, vazão = $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 243 \text{ nm}$, colunas Poroshell (a) Kinetex (b).

Os cromatogramas da solução de florpirauxifen-benzil nas duas colunas apresentam sinal cromatográfico estreito e agudo, porém o sinal na coluna Poroshell (120 EC-C18) apresentou menor

tempo de retenção (1,52 min), maior intensidade e área cromatográfica. Portanto essa coluna foi definida para as próximas etapas deste estudo.

Em seguida, o fluxo da fase móvel foi avaliado em quatro níveis como pode ser observado na Tabela 1. Os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 6.

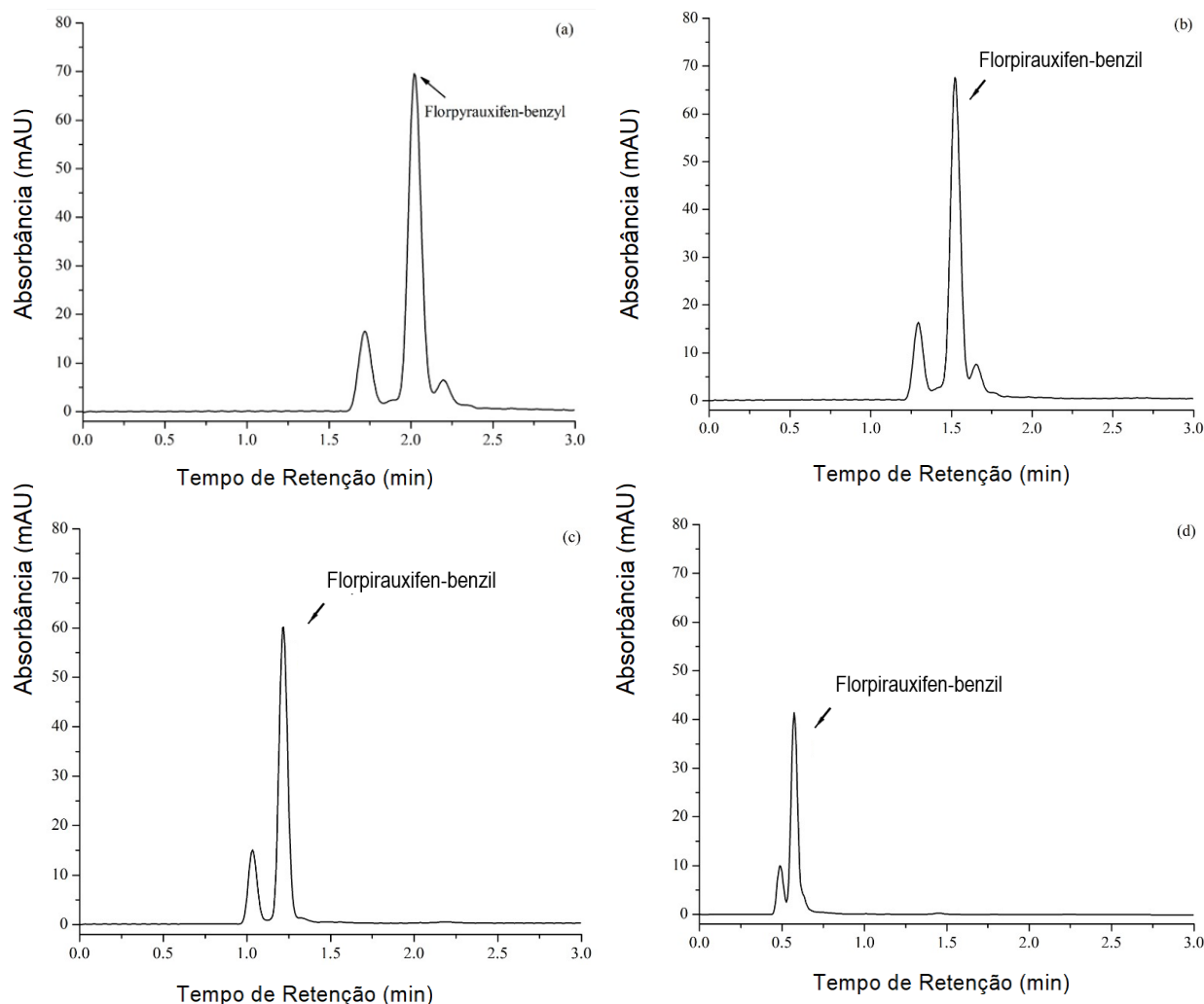


Figura 6. Cromatogramas da solução padrão do florpirauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de 1,0 mg L⁻¹. Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = 20 µL, fase móvel acetonitrila = 100:0, T = 30 °C, λ = 243 nm, taxa de fluxo = 0,3 mL min⁻¹ (a), 0,4 mL min⁻¹ (b), 0,5 mL min⁻¹ (c) e 1,0 mL min⁻¹ (d).

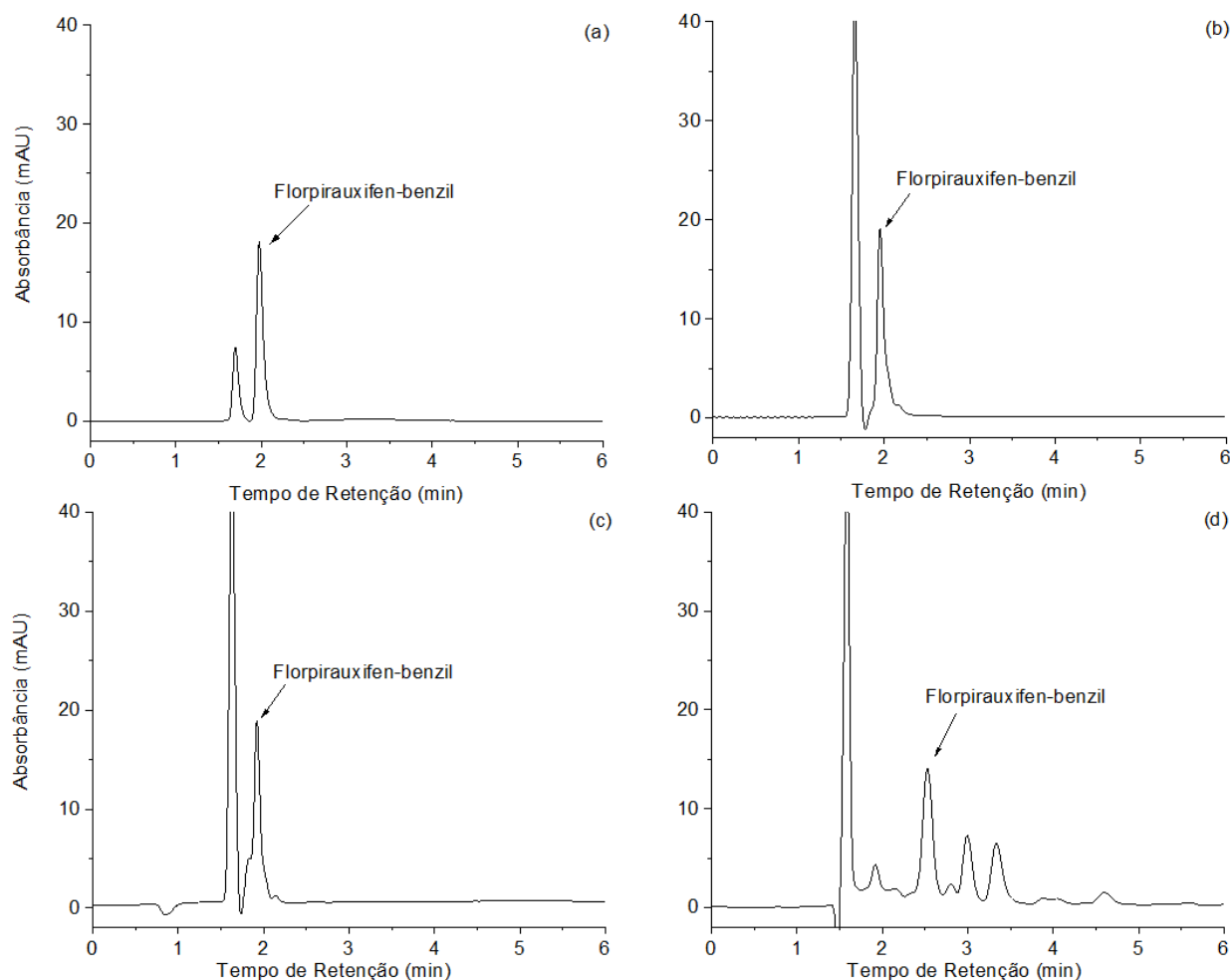
O cromatograma obtido com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ resultou em um sinal de menor intensidade e com um sinal interferente que não foi separado do composto. O cromatograma obtido com fluxo de 0,5 mL min⁻¹ melhorou o sinal, em relação ao fluxo de 1,0 mL min⁻¹, porém o tempo de retenção obtido para o composto demonstra que ainda se localizou bem próximo da região em que a presença de interferentes na matriz é mais intensa e, quando comparado ao fluxo de 0,4 mL min⁻¹, observa-se tratar de um sinal que não estava completamente separado. O cromatograma, utilizando o fluxo de 0,4 mL min⁻¹, apresentou um sinal ainda com a presença de um interferente na base do pico principal. Já o cromatograma obtido com fluxo de 0,3 mL min⁻¹ resultou em um sinal mais nítido, separado do

sinal do interferente e com um tempo de retenção mais afastado da região em que a matriz apresenta uma região de maior número de interferentes. Portanto $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ foi definido para as próximas etapas deste estudo. Esse mesmo valor de fluxo foi utilizado por Zhou et. al. em estudo anterior.⁴

Diferentes composições de fase móvel foram avaliadas neste estudo, como pode ser observado na Tabela 1, e os cromatogramas obtidos em cada condição são mostrados na Figura 7.

O uso da fase móvel acidificada com ácido fórmico não alterou a intensidade do sinal, em comparação com as condições sem ácido fórmico, como pode ser observado nas Figuras 7a e 7b.

As figuras representadas, a partir de 7c até 7g, mostram um aumento da polaridade da fase móvel por do aumento da proporção de água e diminuição da proporção de acetonitrila. Esse aumento ocasionou uma melhora na separação do sinal cromatográfico do composto até a proporção de (80% acetonitrila:20% água) com AF. Entretanto, à medida que esse aumento se tornou mais acentuado, ocorreu uma deformação nos picos do composto. A fase móvel (85% acetonitrila:15% água) acidificada com AF (Figura 7d) foi escolhida para dar continuidade ao trabalho por apresentar um pico mais definido e livre de interferentes.



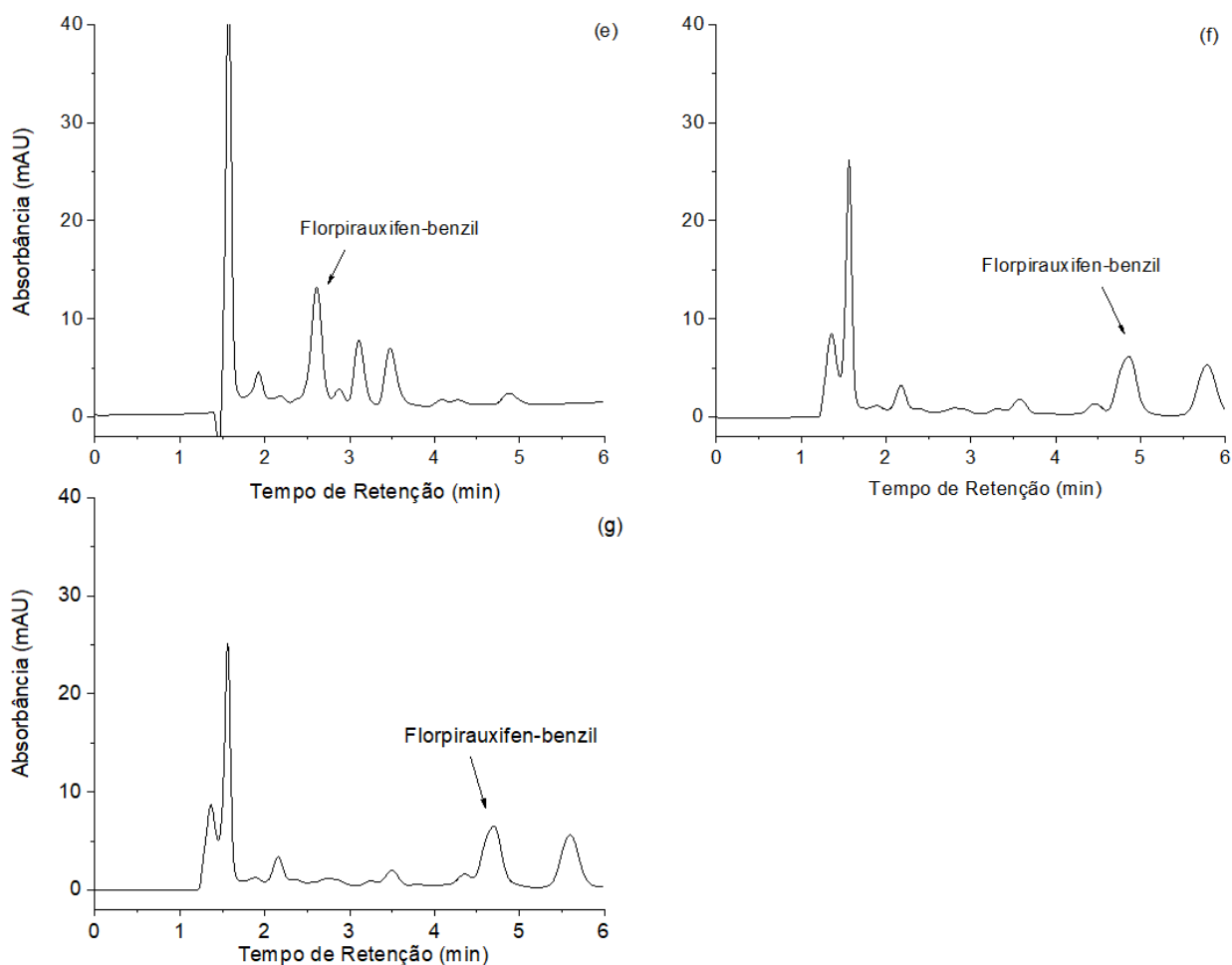


Figura 7. Cromatogramas da solução padrão do florpirauxifen-benzil em acetonitrila na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = $10 \text{ }\mu\text{L}$, taxa de fluxo = $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\lambda = 243 \text{ nm}$. Fase móvel (a) 100% acetonitrila; (b) 100% acetonitrila com AF; (c) (90% acetonitrila:10% água) com AF; (d) (85% acetonitrila:15% água) com AF; (e) (80% acetonitrila:20% água) com AF; (f) (75% acetonitrila:25% água) com AF; (g) (70% acetonitrila:30% água) com AF.

As condições cromatográficas definidas no teste com a fase móvel também foram testadas para a matriz solo. Observou-se que o uso de ácido fórmico, na composição da fase móvel, melhorou a seletividade do método para a matriz solo em comparação com a fase móvel sem ácido fórmico como pode ser observado nas Figuras 8a e b.

A fase móvel consistindo de (85% de acetonitrila e 15% de água) acidificadas com 0,1% (v/v) de ácido fórmico resultou em um cromatograma com sinal de florpirauxifen-benzil livre de interferências com maior intensidade e área cromatográfica, conforme pode ser observado na Figura 8d. Portanto essa condição foi definida para este estudo.

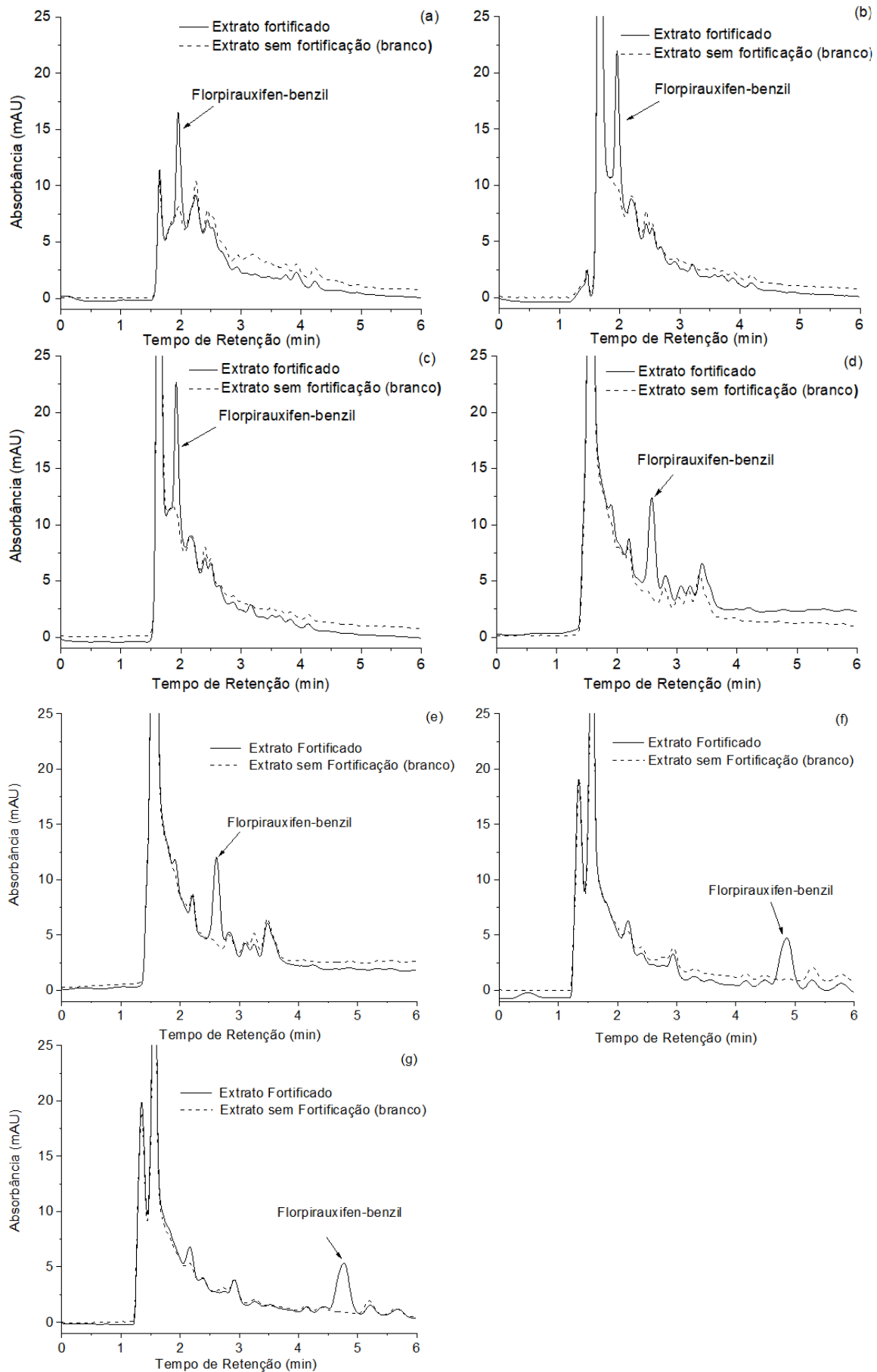


Figura 8. Cromatogramas do extrato fortificado com florpirauxifen-benzil a $90,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = $10 \mu\text{L}$, vazão = $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\lambda =$

243 nm. Fase móvel (a) 100% acetonitrila; (b) 100% acetonitrila com AF; (c) (90% acetonitrila:10% água) com AF; (d) (85% acetonitrila:15% água) com AF; (e) (80% acetonitrila:20% água) com AF; (f) (75% acetonitrila:25% água) com AF; (g) (70% acetonitrila:30% água) com AF.

Após completar a otimização das condições cromatográficas, para a determinação de florigrauxifen-benzil por HPLC-DAD, as condições de extração da metodologia ESL-PBT foram otimizadas.

Otimização das condições de extração por ESL-PBT

Trabalho anterior²² realizado com esse herbicida, para a matriz solo, mostrou o uso de fases extratoras compostas por acetonitrila acidificada com ácido fórmico ou ácido clorídrico. Assim, neste estudo, avaliamos seis diferentes fases extratoras, conforme podese observado na Tabela 2. As taxas de recuperação obtidas em cada fase extratora são apresentadas na Figura 9.

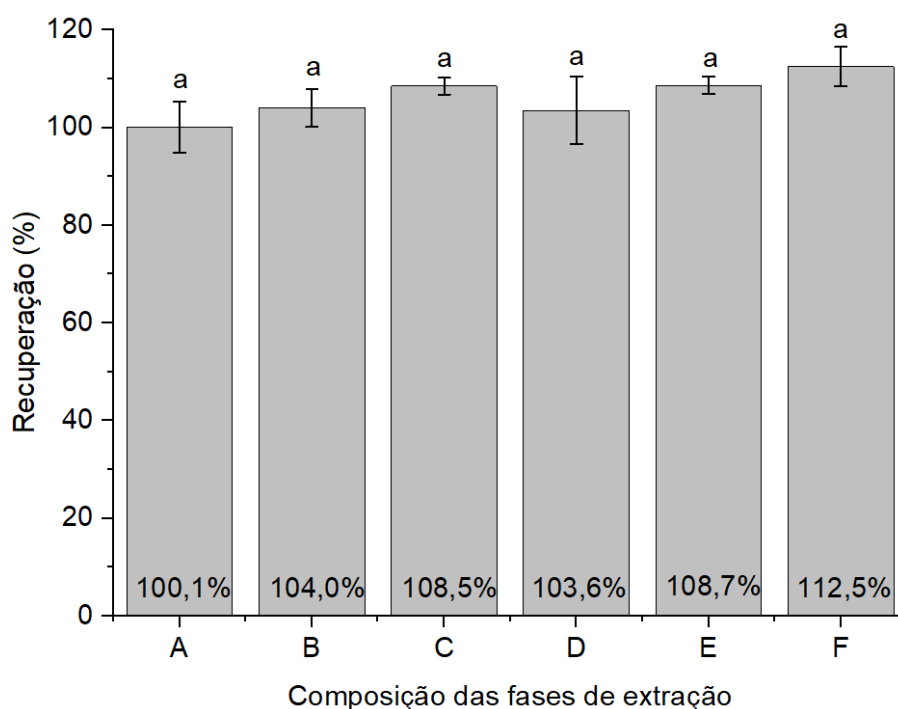


Figura 9. Taxa de recuperação de florigrauxifen-benzil nas seis diferentes composições da fase de extração. As barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de t ao nível de significância de 5%. A: acetonitrila:água (8:4 v/v); B: acetonitrila com AF:água (8:4 v/v); C: acetonitrila:água com AF (8:4 v/v); D: (acetonitrila:água) com AF (8:4 v/v); E: acetonitrila + acetato de etila:água (6,5 + 1,5:4 v/v); F: (acetonitrila:água) com HCl (8:4 v/v).

Os resultados revelaram que as taxas de recuperação das seis fases de extração ficaram entre 100,1 e 112,5%, com desvio-padrão relativo abaixo de 6,9%. Por isso, foi avaliado o perfil dos cromatogramas obtidos em cada fase extratora (Figura 10).

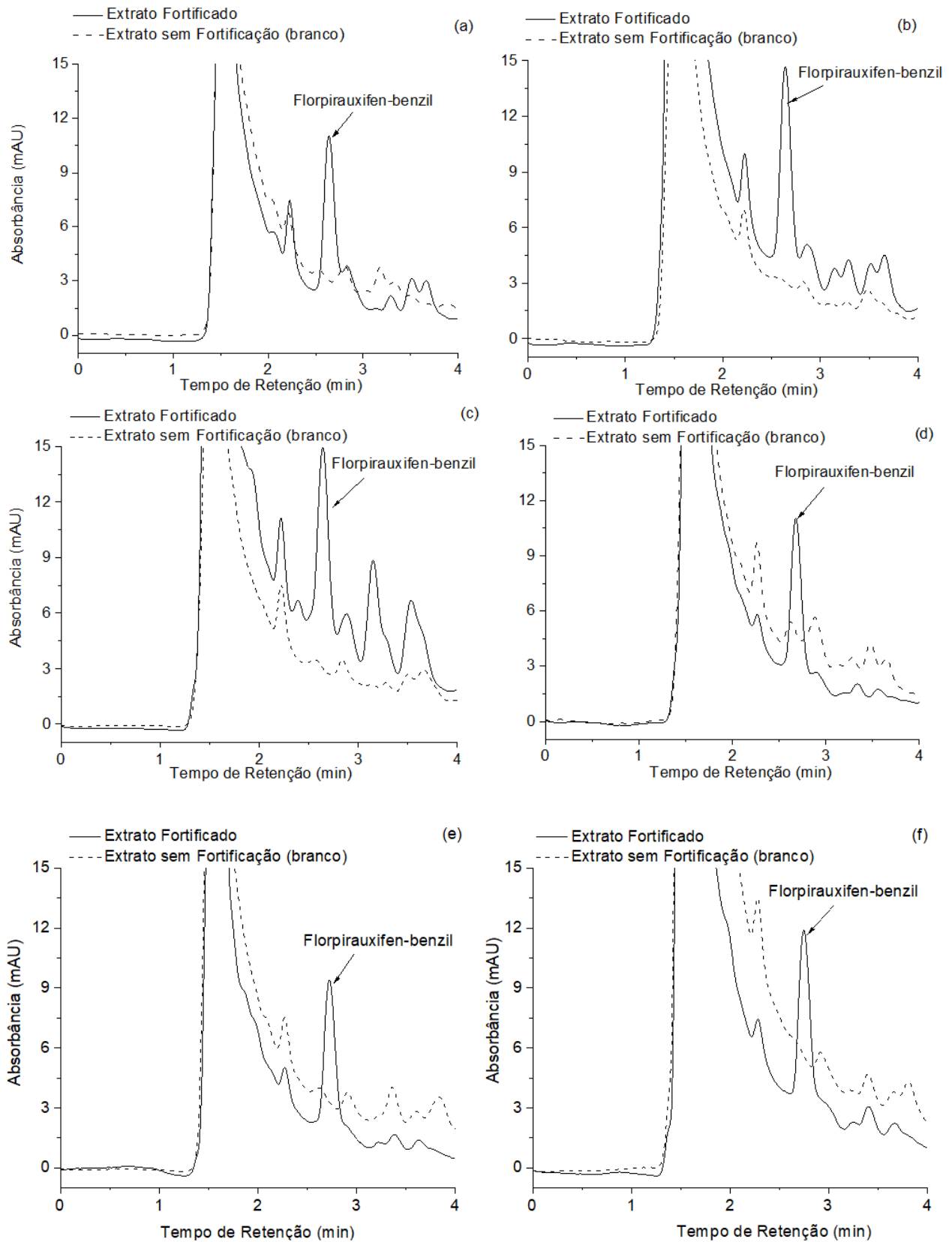


Figura 10. Cromatograma do extrato enriquecido com florpirauxifen-benzil a $90 \mu\text{g kg}^{-1}$. (a) acetonitrila:água (8:4 v/v); (b) acetonitrila com AF:água (8:4 v/v); (c) acetonitrila:água com AF (8:4 v/v); (d) (acetonitrila:água) com AF (8:4 v/v); (e) acetonitrila + acetato de etila:água (6,5 + 1,5:4 v/v); (f) (acetonitrila:água) com HCl (8:4 v/v).

Os resultados revelaram que o cromatograma com o menor número de interferentes foi obtido, usando acetonitrila acidificada com ácido fórmico a 0,1% (v/v) e água, como pode ser observado na Figura 10b. Vários estudos descrevem a utilização de acetonitrila, como fase orgânica para o desenvolvimento da metodologia de extração,^{4,6,13-16,22} inclusive diferentes composições são relatadas. No entanto, neste estudo, além da acetonitrila pura, também, foram testados a adição de ácido fórmico, ácido clorídrico e acetato de etila com o objetivo de melhorar a recuperação, diminuir os interferentes no tempo de retenção do composto e minimizar o efeito de matriz. A acetonitrila acidificada com ácido fórmico foi a fase orgânica que apresentou a melhor resposta, por isso, foi escolhida para este trabalho. Em seguida, essa metodologia otimizada foi submetida à etapa de validação.

Validação

A validação da metodologia otimizada foi realizada, por meio das seis principais figuras de mérito: seletividade, LD, LQ, faixa de linearidade, precisão, exatidão e efeito de matriz.

Seletividade

A seletividade da metodologia otimizada foi confirmada pela comparação dos cromatogramas do extrato branco (extrato de solo sem o analito) e extrato de matriz de solo fortificado com o florpiauxifen-benzil. Os cromatogramas obtidos podem ser observados na Figura 11.

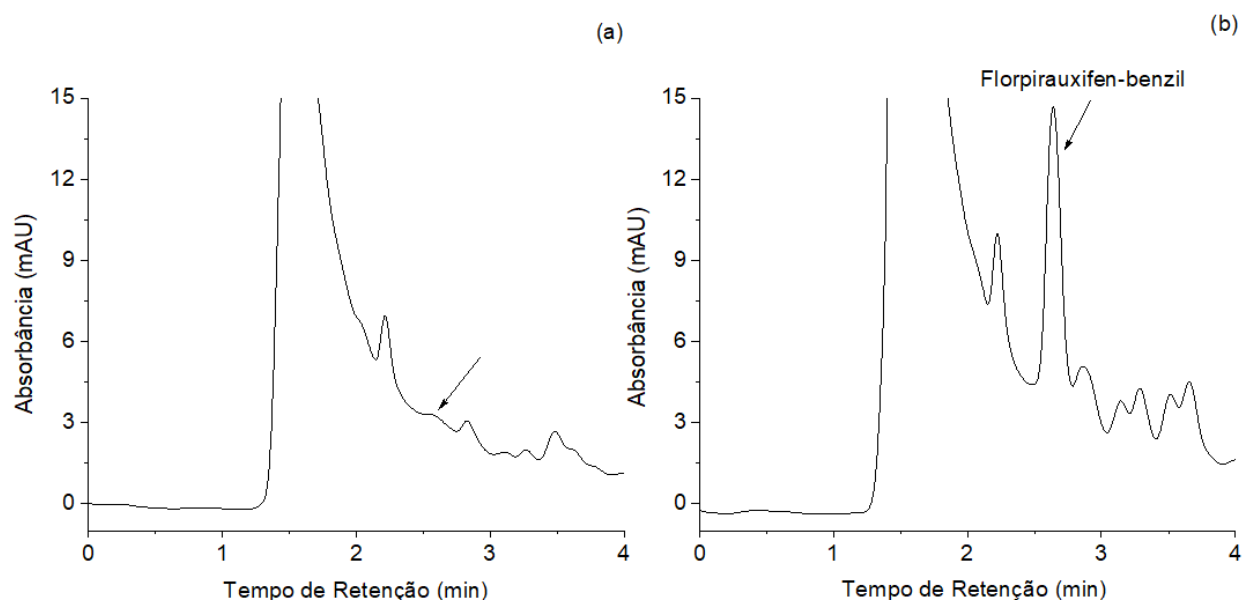


Figura 11. Cromatogramas do extrato de solo sem o analito (extrato em branco) (a) e extrato de solo fortificado com florpiauxifen-benzil a $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ (b).

Esses resultados mostraram que, no cromatograma do extrato em branco, não foram observados sinais cromatográficos atribuídos a interferentes, no mesmo tempo de retenção do florpiauxifen-benzil, o que caracteriza a seletividade do método.

Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD)

Os valores de LD e LQ obtidos para a metodologia otimizada foram de 5 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ conforme pode ser observado na Tabela 3.

Os limites máximos de resíduos (LMRs) para florpirauxifen-benzil, em amostras de solo, ainda não foram definidos pela legislação brasileira, porém, de acordo com estudos anteriores,²³⁻²⁵ herbicidas como o diuron, glifosato, nicosulfuron e bromacil, para a mesma matriz, apresentaram LQ na faixa de 40 a 83 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Dessa forma, o LQ encontrado neste trabalho para florpirauxifen-benzil é inferior ao encontrado para outros pesticidas, o que demonstra o potencial desse método para monitorar o florpirauxifen-benzil no solo.

Tabela 3. Resultados do estudo de validação analítica

Faixa de linearidade ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Equação linear	R ^{2c}	Recuperação \pm DPR ^d / %			LD ^e $\mu\text{g kg}^{-1}$	LQ ^f $\mu\text{g kg}^{-1}$
			20,0 $\mu\text{g kg}^{-1a}$	90,0 $\mu\text{g kg}^{-1b}$	195,0 $\mu\text{g kg}^{-1a}$		
20,0-195,0	Y=91420,3X-452846,3	0,9973	108,8 \pm 9,30	108,3 \pm 2,25	109,1 \pm 1,86	5,0	20,0

^amédia de 3 repetições; ^bmédia de 7 repetições; ^cR²: coeficiente de determinação; ^dDPR: desvio padrão relativo; ^eLD: limite de detecção; ^fLQ: limite de quantificação.

Recentemente Zhou et al.⁴ demonstraram ter atingido um LQ de aproximadamente 1,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ usando a metodologia de extração QuEChERS e a técnica de detecção por cromatografia líquida de ultra-alta performance UPLC-QTOF-MS/MS. Em razão da técnica utilizada estar associada a um equipamento de maior sensibilidade, ocorre melhora na resolução dos picos cromatográficos e diminuição do valor do limite de quantificação.²⁶ Entretanto o valor de LQ de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ obtido pela técnica de ESL-PBT e análise por HPLC-DAD, encontrado neste trabalho, está abaixo dos valores propostos pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA-US),²⁷ agência reguladora de controle de pragas do Canadá²⁸ e pela autoridade australiana de pesticidas e medicamentos veterinários (APVMA)¹⁰, para commodities, como arroz, ovos, leite, carne, peixe e crustáceos, reafirmando a capacidade do método proposto para ser utilizado como referência no processo de monitoramento do florpirauxifen-benzil no solo.

Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram confirmadas simultaneamente por experimentos de fortificação e recuperação. Os resultados da Tabela 3 mostraram que os valores de DPR foram menores que 10% e as taxas de recuperação ficaram entre 108,3 e 109,1%. Esses valores asseguram a precisão e exatidão do método otimizado, de acordo com as diretrizes de SANTE, respectivamente.¹⁷

Faixa de linearidade

A faixa de linearidade do método otimizado foi determinada, por meio de seis níveis de concentração equidistantes, com três repetições independentes para cada nível, sendo as concentrações utilizadas de 20,0; 55,0; 90,0; 125,0; 160,0 e 195,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A concentração 20,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ corresponde ao valor do LQ e

foi determinada como o primeiro nível das curvas analíticas, no extrato da matriz solo e no solvente, como pode ser observado na (Figura 12a). A faixa de linearidade incluiu o valor da concentração do LQ ($20,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) e a concentração de fortificação da amostra ($90,0 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Os parâmetros da regressão linear foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), obtendo-se assim os valores de inclinação, intersecção e coeficiente de determinação (R^2), conforme pode ser observado na (Figura 12a). O teste de Jackknife foi aplicado aos resíduos da regressão e não foram observados valores extremos (Figura 12b). O valor de R^2 foi maior que 0,99, indicando a variabilidade dos dados coletados explicada pelo modelo de regressão. Em seguida, a normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos de regressão foram avaliados.

A normalidade dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Ryan-Joiner (Figura 12c). Os coeficientes de correlação encontrados nos gráficos foram superiores ao coeficiente de correlação crítico ($R = 0,9622 > R_{\text{crit}} = 0,9461$) obtido por interpolação polinomial. Logo pode-se concluir que os resíduos seguiram distribuição normal (nível de significância de 0,05), permitindo assim a utilização de testes de hipóteses que seguem esse tipo de distribuição.

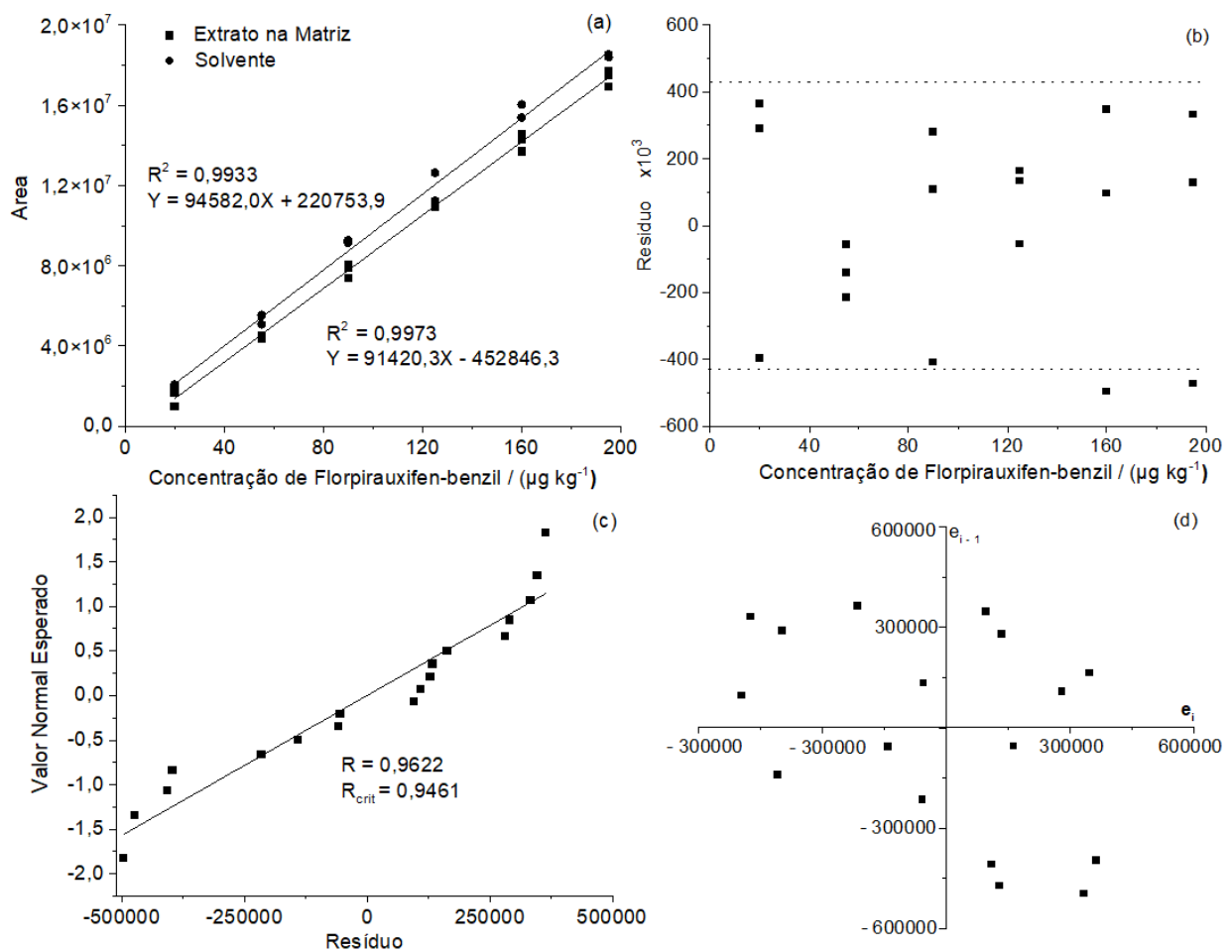


Figura 12. Gráficos obtidos no estudo de linearidade da metodologia otimizada. (a) Curvas analíticas de soluções de florpirauxifen-benzil em extratos de solventes e matriz, em que R^2 : coeficiente de determinação. (b) Resíduos de regressão linear para florpirauxifen-benzil. (c) Probabilidade normal de resíduos de regressão para florpirauxifen-benzil, em que R : coeficiente de correlação do teste de

Ryan-Joiner. (d) Autocorrelação dos resíduos de regressão para florpiauxifen-benzil, em que e_i : resíduo.

A homocedasticidade dos resíduos da regressão foi investigada pelo teste Brown-Forsythe que determina a existência de diferenças entre as variâncias residuais por uma adaptação do teste de Levene. A distribuição dos resíduos da regressão, ao longo dos níveis de concentração estudados, foi homogênea, confirmando assim a homocedasticidade, como pode ser visto na Figura 12b.

A independência dos resíduos da regressão foi analisada pelo teste de Durbin-Watson e não foi observada autocorrelação ao nível de significância de 0,05. Uma representação gráfica dos dados foi realizada, para confirmar esse resultado, e uma distribuição aleatória dos resíduos nos quatro quadrantes foi obtida demonstrando sua independência, como pode ser visto na Figura 12d.

Os dados foram ajustados ao modelo linear, em toda a faixa avaliada de 20,0 a 195,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 3), em que foram observados regressão significativa e desvio de linearidade não significativo ao nível de significância de 0,05. Portanto, pode-se concluir que o MMQO foi adequado para os dados estudados. Todas as avaliações de linearidade seguiram os procedimentos propostos por Souza e Junqueira¹⁸ e Bazilio et al.¹⁹

Efeito de matriz

O efeito de matriz foi determinado, comparando os coeficientes angulares obtidos, a partir das curvas analíticas no extrato de matriz e acetonitrila (Figura 12a), obtendo-se um valor de - 3,34%. Esse resultado foi considerado um baixo efeito de matriz, considerando que o solo é uma matriz complexa que contém diversos compostos, o que pode interferir no sinal do analito. Estudo¹⁵ realizado para dioxinas e furanos em solo encontrou diferenças significativas, na resposta cromatográfica dos dois analitos, quando preparados em solvente e, no extrato da matriz do solo obtido, após ESL-PBT, o que corrobora a afirmação anterior.

Estudo da estabilidade do florpiauxifen-benzil no solo

A concentração inicial de florpiauxifen-benzil na amostra de solo foi de 195,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, que é a maior concentração da faixa de linearidade da metodologia validada neste estudo. Os resultados obtidos nos experimentos para o estudo de estabilidade do florpiauxifen-benzil no solo são mostrados na Figura 13.

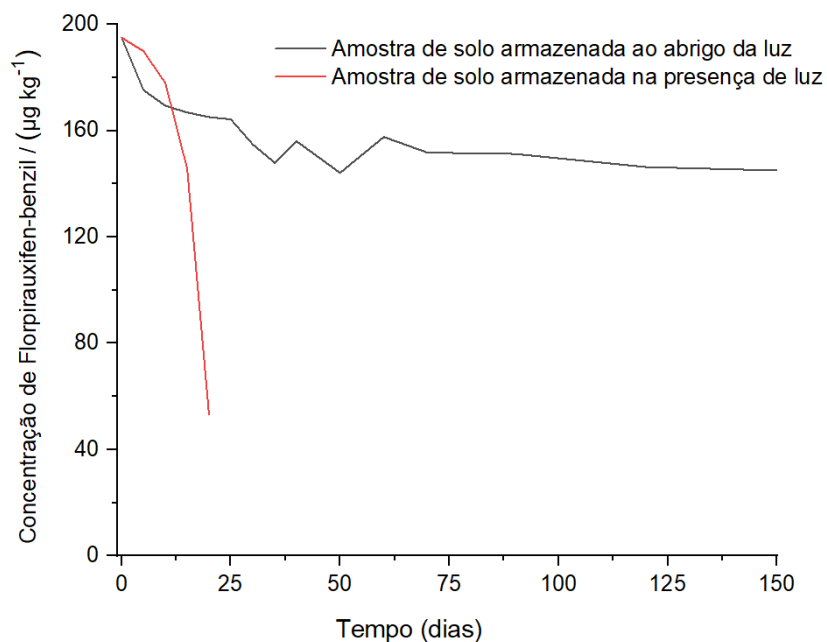


Figura 13. Concentração média de florpirauxifen-benzil em amostras de solo por 150 dias.

Os resultados indicam que a meia-vida do florpirauxifen-benzil no solo, avaliado em condições de exposição à luz solar, foi de aproximadamente 17,5 dias. Nesse período, a concentração média do composto diminuiu de 195,0 para 97,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Estudo anterior²⁹ mostrou tempo de meia-vida de 8-10 dias, no entanto, para solo inundado e tempo de meia-vida em água de 3,3 dias, indicando que a meia-vida mais curta para solo inundado é em função da presença de água no solo.

Conclusões

A ESL-PBT seguida pela análise por HPLC-DAD foi otimizada e validada para a determinação de florpirauxifen-benzil em amostras de solo. Essa metodologia mostrou ser fácil de executar, rápida, sensível e eficaz com taxas de recuperação aceitáveis e baixo efeito de matriz. O limite de quantificação alcançado foi inferior ao máximo aceitável pela legislação brasileira para outros agrotóxicos no solo. Por todos esses motivos, essa metodologia pode ser considerada uma alternativa promissora para o monitoramento do florpirauxifen-benzil em amostras de solo. O estudo de estabilidade deste composto no solo mostrou que aproximadamente 17,5 dias é a meia-vida do florpirauxifen-benzil no solo para um ambiente de exposição solar.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (308480/2019-8) pelo apoio financeiro das bolsas de pesquisa. Os autores também agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-02736-21) e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela infraestrutura fornecida.

Referências

1. United States Environmental Protection Agency (USEPA); Final Registration Decision on the New Active Ingredient Florpyrauxifen-benzyl; 2017. Disponível em: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2016-0560-0065>. Acesso em: julho 2022.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA); F71 - Florpirauxifen-benzil; 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/f/4376json-file-1/view>. Acesso em: julho 2022.
3. Wang, H.; Sun, X.; Yu, J.; Li, J.; Dong, L. The phytotoxicity mechanism of florpyrauxifen-benzyl to *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv and weed control effect. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2021**, *179*, 104978.
4. Zhou, R.; Dong, Z.; Bian, C.; Wu, T.; Zhou, W.; Li, Y.; Li, B. Florpyrauxifen-benzyl in paddy field environment: Its residue analysis, dissipation dynamics, storage stability, dietary risk assessment and decontamination. SSRN, 2022. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4008164>. Acesso em: julho 2022.
5. Massachusetts Department of Agriculture (MDA); Review of Florpyrauxifen-benzyl for Application to Massachusetts Lakes and Ponds; 2019. Disponível em: <https://www.mass.gov/doc/florpyrauxifen-benzyl>. Acesso em: julho 2022.
6. United States Environmental Protection Agency (USEPA); Environmental Fate and Ecological Effects Risk Assessment for the Registration of the New Herbicide for the Use on Rice and Aquatics; 2017. Disponível em: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2016-0560-0011>. Acesso em: julho 2022.
7. Minnesota Department of Agriculture (MDA); Florpyrauxifen-benzyl; 2018. Disponível em: www.mda.state.mn.us/sites/default/files/inline-files/Florpyrauxifen-benzyl.pdf. Acesso em: julho 2022.
8. Assunção, T. O. G.; Gomes, F. B. R.; Brandt, E. M. F.; Pereira, R. O. Novos agrotóxicos e o padrão de potabilidade da água: dinâmica ambiental e riscos à saúde. *Rev. Gest. Água Am. Lat.* **2020**, *17*, 16.
9. Wright, H. E.; Norsworthy, J. K.; Roberts, T. L.; Scott, R. C.; Hardke, J. T.; Gbur, E. E. Use of Florpyrauxifen-benzyl in Non-flooded Rice Production Systems. *Crop, forage Turfgrass Manage.* **2021**, *7*, e20081.
10. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA); On the evaluation of the new active florpyrauxifen-benzyl (Rinskor™) in the Product GF-3301 Herbicide; 2018. Disponível em: <https://apvma.gov.au/node/29096>. Acesso em: julho 2022.
11. European Food Safety Authority (EFSA); Arena, M.; Auteri, D.; Barmaz, S.; Brancato, A.; Brocca, D.; Bura, L.; Cabrera, L. C.; Chaideftou, E.; Chiusolo, A.; Civitella, C.; Court Marques, D.; Crivellente, F.; Ctverackova, L.; De Lentdecker, C.; Egsmose, M.; Erdos, Z.; Fait, G.; Ferreira, L.; Goumenou, M.; Greco, L.; Ippolito, A.; Istace, F.; Jarrah, S.; Kardassi, D.; Leuschner, R.; Lostia, A.; Lythgo, C.; Magrans, J. O.;

- Medina, P.; Mineo, D.; Miron, I.; Molnar, T.; Padovani, L.; Parra Morte, J. M.; Pedersen, R.; Reich, H.; Sacchi, A.; Santos, M.; Serafimova, R.; Sharp, R.; Stanek, A.; Streissl, F.; Sturma, J.; Szentes, C.; Tarazona, J.; Terron, A.; Theobald, A.; Vagenende, B.; Van Dijk, J.; Villamar-Bouza, L. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance florpyrauxifen (variant assessed florpyrauxifen-benzyl. *EFSA J.* **2018**, *16*, 5378.
12. Buczek, S. B.; Archambault, J. M.; Gregory Cope, W.; Heilman, M. A.; Evaluation of Juvenile Freshwater Mussel Sensitivity to Multiple Forms of Florpyrauxifen-Benzyl. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2020**, *105*, 588.
13. Miller, M. R.; Norsworthy, J. K. Assessment of Florpyrauxifen-benzyl Potential to Carryover to Subsequent Crops. *Weed Technol.* **2018**, *32*, 404.
14. Miller, M. R.; Norsworthy, J. K. Influence of Soil Moisture on Absorption, Translocation, and Metabolism of Florpyrauxifen-benzyl. *Weed Sci.* **2018**, *66*, 418.
15. Andrade, V. F.; Durães, A. F. S.; Cassimiro, D. L.; de Pinho, G. P.; Silvério, F. O. Fast extraction of polychlorinated dibenzo-pdioxin and polychlorinated dibenzofuran in sewage sludge and soil samples. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2017**, *52*, 267.
16. 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. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2018**, *53*, 199.
17. SANTE; Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and Feed, 2019. Disponível em: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf. Acesso em: julho 2022.
18. Souza, S. V. C.; Junqueira, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method Scheilla V.C. de Souza, Roberto G. Junqueira. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *552*, 25.
19. Bazilio, F. S.; Bomfim, M. V. J.; Almeida, R. J.; Abrantes, S. M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. *Rev. Anal.* **2012**, *59*, 60.
20. Economou, A.; Botitsi, H.; Antoniou, S.; Tsiipi, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, 5856.
21. Tomasini, D.; Sampaio, M. R. F.; Caldas, S. S.; Buffon, J. G.; Duarte, F. A.; Primel, E. G. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, **2012**, *99*, 380.
22. United States Environmental Protection Agency (USEPA); Method Validation Study for the Determination of Residues of XDE-848 Benzyl Ester and Three Metabolites (X11438848, X12300837 and X11966341) in Soil and Sediment by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry; 2017.

Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-09/documents/ecm_-_florpyrauxifen-benzyl_degradates_in_soil_-_mrid_49677775.pdf. Acesso em: julho 2022.

23. Pinto, J. S. S.; Lanças, F. M. Design, construction and evaluation of a Simple pressurized solvent extraction system. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2009**, *20*, 913.

24. Botero-coy, A. M.; Ibáñez, M.; Sancho, J. V.; Hernández, F. Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2013**, *1292*, 132.

25. Lazić, Sanja.; Šunjka, Dragana. Solid-phase extraction followed by HPLC/DAD for determination of sulfonylurea herbicide in soil. *Research Journal of Agricultural Science*, **2014**, *46*, 132.

26. Oshita, D.; Jardim, I. C. S. F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multiresíduos de agrotóxicos em morangos. *Química Nova*, **2015**, *38*, 1273.

27. United States Environmental Protection Agency (USEPA); Florpyrauxifen-benzyl; Pesticide Tolerances. Disponível em: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2016-0560-0064>. Acesso em: 23 fev 2023.

28. Pest Management Regulatory Agency (PMRA); Florpyrauxifen-benzyl. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/sr/srb.html?q=florpyrauxifen&wb-srch-sub=>. Acesso em: 23 fev 2023.

29. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); Pesticide properties database; 2019. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/3097.htm>. Acesso em: 15 julho 2022.

4.2 Artigo 2 – Método de extração para determinar o herbicida florigrauxifen-benzil em arroz

Este artigo foi elaborado conforme as normas do periódico *"Food Analytical Methods"*.

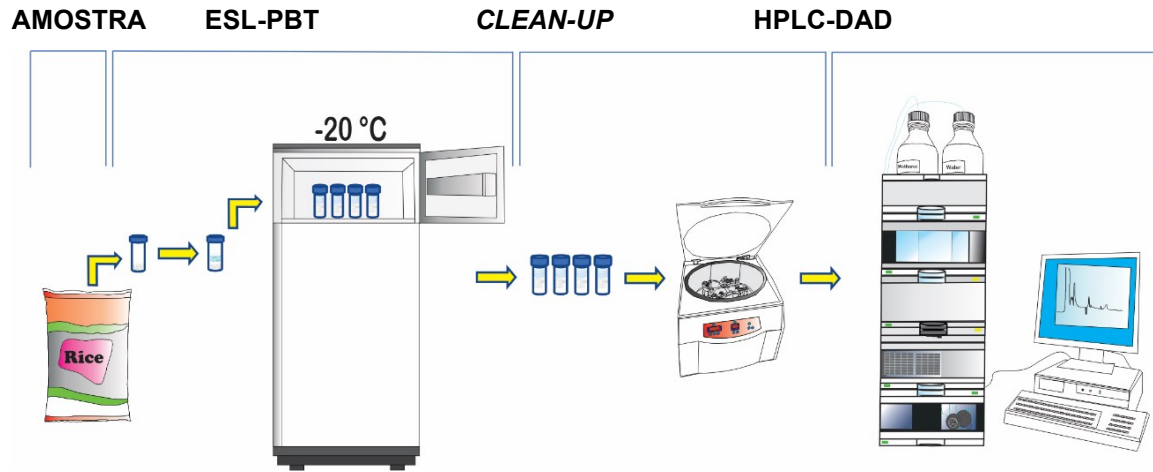


Figura representando a metodologia de ESL-PBT acoplada ao HPLC-DAD usada no presente estudo.

Método de Extração para Determinar o Herbicida Florpirauxifen-benzil em Arroz

Junai Carvalho de Souza Lopes^{1,2}, Lázaro Chaves Sicupira³, Gevany Paulino de Pinho², Flaviano Oliveira Silvério^{2,*}

¹ Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais 39404-058, Brazil

² Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais 39404-547, Brazil

³ Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Janaúba, Minas Gerais 39447-790, Brazil

Junai Carvalho de Souza Lopes – ORCID: 0000-0002-6263-6704

Lázaro Chaves Sicupira – ORCID: 0000-0002-4085-2959

Gevany Paulino de Pinho - ORCID: 0000-0002-2360-9594

Flaviano Oliveira Silvério - ORCID: 0000-0002-5753-8739

*e-mail: *flavianosilverio@ufmg.br (F. O. Silvério)

Resumo

Florpiraxifen-benzil é um princípio ativo utilizado como herbicida no controle de ervas daninhas na cultura do arroz. Existem poucos estudos relacionados a metodologias de extração e determinação deste composto. Assim, este trabalho teve como objetivo otimizar e validar a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), para a determinação de florpiraxifen-benzil em amostras de arroz. Os resultados mostraram que as condições cromatográficas ótimas foram obtidas utilizando coluna kinetex, temperatura de 25 °C, composição de fase móvel metanol:água (78:22 v/v), taxa de fluxo de 0,3 mL min⁻¹ e 260 nm como o comprimento de onda. Condições ótimas de extração foram obtidas, utilizando acetonitrila:água (2:1) como fase de extração, seguida de *clean-up* dos extratos com alumina. As porcentagens de recuperação alcançadas foram próximas de 100%, com um desvio-padrão relativo (DPR) inferior a 9,0%. O resultado apresentou efeito de matriz significativo (184,3%), mas a metodologia foi precisa, exata, linear e seletiva, com limite de quantificação de 5,0 µg kg⁻¹.

Palavras-chave Florpiraxifen-benzil, ESL-PBT, Herbicida arilpicolinato, Arroz, Auxina sintética

Introdução

Recentemente, o princípio ativo florigrauxifen-benzil foi inserido no mercado mundial para combater plantas daninhas que atuam em culturas de arroz, cana-de-açúcar, milho e soja (USA 2017a; APVMA 2018; MDAR and MassDEP 2019; ANVISA 2022). Esse composto é uma auxina sintética, do grupo químico do arilpicolinato e pode ser aplicado, na parte aérea das plantas daninhas, sendo capaz de se mover pelo floema e se acumular em regiões que interrompem os processos de crescimento em plantas suscetíveis (USA 2017a; APVMA 2018; MDAR and MassDEP 2019).

Essas características fizeram com que esse herbicida fosse autorizado no Brasil, no ano de 2019, para uso e comercialização (ANVISA 2022). Entretanto a legislação brasileira o classificou como um produto perigoso ao meio ambiente, em nível III, mas ainda não concluiu a classificação em termos de toxicidade a humanos (ANVISA 2022). O limite máximo de resíduo (LMR) determinado, para esse herbicida pela legislação brasileira (ANVISA 2022), foi de 10 µg kg⁻¹.

Apesar desse cenário, ainda são raros os estudos sobre métodos de extração, para o monitoramento desse princípio ativo, em matrizes ambientais e alimentares, provavelmente, pela sua recente inserção no mercado mundial de agrotóxicos (Vieira et al. 2022; Lopes et al. 2023; Zhou et al. 2022; Arena et al. 2018). Até o momento, apenas o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) foi otimizado e validado com sucesso para o monitoramento desse herbicida no arroz (Zhou et al. 2022). Neste sentido, há uma demanda, para o desenvolvimento de novos métodos de extração, que sejam de fácil execução, com uso reduzido de amostras e reagentes e que sejam sensíveis e eficientes. Por essa razão, a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) tem sido aplicada com sucesso para vários herbicidas, inclusive para o monitoramento de florigrauxifen-benzil no solo e na água (Vieira et al. 2022; Lopes et al. 2023). Essa metodologia tem se destacado pela remoção de interferentes que ficam aprisionados na purificação, em baixa temperatura, funcionando como um *clean-up* prévio dos extratos, agilizando o processo, reduzindo o uso de solventes orgânicos e diminuindo o custo final (Ramalho et al. 2020; Pereira et al. 2020).

Considerando a representatividade do arroz como um dos cereais mais consumidos no mundo (EMBRAPA 2021) e a escassez de estudos, envolvendo o desenvolvimento de métodos de extração para esse herbicida, este estudo teve como objetivo otimizar e validar a metodologia de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT), para determinar o herbicida florigrauxifen-benzil, em amostras de arroz, usando a cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD).

Materiais e métodos

Amostras de arroz

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas, utilizando arroz comercial isento de florigrauxifen-benzil. As amostras foram moídas e armazenadas em frascos de vidro tampados e mantidos à temperatura ambiente.

Reagentes e soluções

Metanol grau HPLC foi obtido de F. Maia (Belo Horizonte, Brasil). Solventes P. A. acetonitrila foi obtido da Êxodo Científica (Sumaré, Brasil) e acetato de etila adquirido da Dinâmica (Indaiatuba, Brasil). Todos os solventes foram filtrados em membranas de politetrafluoretileno (PTFE) com poros de 0,2 μm adquiridas da Filtrilo (Colombo, Brasil). Ácido fórmico foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, USA) e o ácido clorídrico foi comprado da Anidrol (Diadema, Brasil). O padrão de florpirauxifen-benzil foi adquirido de LGC Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

A solução-padrão-estoque foi preparada em acetonitrila na concentração de 20 mg L^{-1} . A solução de trabalho foi preparada na concentração de 5 mg L^{-1} por diluição da solução estoque em acetonitrila. Todas as soluções foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na etapa de *clean-up* dos extratos, foram avaliados os adsorventes: florisil (60-100 mesh) adquirido da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, USA); sílica gel 60 (230-400 mesh) da Macherey-Nagel (Düren, Germany); Amina Primária e Secundária (PSA) e sílica gel funcionalizada com Octadecila (C18) da Sigma Aldrich (St. Louis, USA); alumina da Agilent Technologies (St. Clair, USA) e carvão ativado que foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste estudo incluem um vórtex da Scilogex (Rocky Hill, USA), uma bomba à vácuo da Primatec (Itu, Brasil), uma centrífuga da Kindly (São Paulo, Brasil), uma balança analítica da Shimadzu (Barueri, Brasil) e um espectrofotômetro Cary 50 da Agilent Technologies (St. Clair, USA).

Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência, acoplado a um detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD), modelo 1290, da Agilent Technologies (St. Clair, USA). O volume de injeção utilizado foi de 10 μL e as colunas cromatográficas avaliadas foram a Poroshell (St. Clair, USA) e a Kinetex (Torrance, USA).

As condições cromatográficas avaliadas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 Condições cromatográficas avaliadas

Parâmetros	
Comprimento de onda (λ)/nm	243
	260
Coluna cromatográfica	Kinetex (C18) (100A, 150 mm x 4,60 mm, 5 μm, Phenomenex) Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 4,60 mm, 2,7 μm , Agilent)

Composição da fase móvel no modo isocrático	Acetonitrila:água ^a
	Metanol:água^a (Acetonitrila:água) acidificados com ácido fórmico 0,1% (v/v) ^a (Metanol:água) acidificados com ácido fórmico 0,1% (v/v) ^a
Taxa de fluxo / (mL min ⁻¹)	0,2
	0,3
	0,5 0,8
Temperatura da coluna/ °C	25 30

^a100:0; 90:10; 85:15; 80:20; **78:22**; e 75:25 (%v/v); em negrito, as condições cromatográficas ideais.

Otimização da extração ESL-PBT

Esse método de extração é baseado na adição de 4,0 g de amostra de arroz a um frasco de vidro de 22 mL e, em seguida, são adicionados 72 µL de solução de trabalho, contendo florpirauxifen-benzil, na concentração de 5 mg L⁻¹. A mistura foi mantida em repouso por 1h para permitir a completa integração do analito com a matriz. Foram adicionados 4 mL de água e o sistema foi homogeneizado em vórtex por 30 s, em seguida, 8 mL fase extratora foram adicionados e o sistema foi novamente levado ao vórtex por mais 30 s. Então, o sistema foi mantido a – 20 °C por 1h para congelamento completo da fase aquosa e da matriz. Em seguida, em tubo de vidro, foram adicionados 4 mL do extrato e 200 mg do adsorvente para o *clean-up* do extrato. Esse sistema foi agitado em vórtex por 60 s e centrifugado por 5 min a 4000 rpm. Após essa etapa, 3 mL do extrato foram completamente evaporados, ressuspensos em 400 µL de metanol e armazenados a – 20 °C até a análise por HPLC-DAD.

A ESL-PBT foi otimizada avaliando as composições das fases extratoras apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Composição das fases extratoras avaliadas

Experimento	Fases extratoras	Proporção/ mL
A	ACN^a : H₂O	8:4
B	ACN+AF ^b : H ₂ O	8:4
C	ACN+HCl ^c : H ₂ O	8:4
D	ACN+ACE ^d : H ₂ O	(6,5+1,5):4

^aAcetonitrila; ^b0,1% (v/v) solução de ácido fórmico; ^c0,1% (v/v) solução de ácido clorídrico; ^dacetato de etila; em negrito, a condição ótima de extração.

Clean-up dos extratos

Neste estudo, uma etapa adicional de *clean-up* foi inserida, em razão da presença de vários interferentes da matriz. Por isso, foram utilizadas massas de 50 e 100 mg de adsorvente por mL do extrato

da matriz arroz obtido por meio da ESL-PBT otimizado. Foram avaliados os adsorventes: sílica gel, sílica gel funcionalizada com octadecila (C18), florisil, carvão ativado (Act. Charc), alumina e amina primária e secundária (PSA).

Metodologia de validação

A validação foi realizada, por meio da avaliação dos resultados da seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, faixa de linearidade e efeito de matriz, conforme protocolo SANTE (2021). Os testes estatísticos foram realizados considerando o nível de significância de 0,05.

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas do extrato da matriz arroz fortificado com florpirauxifen-benzil, na concentração de $90,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ com o cromatograma do extrato da matriz arroz livre de florpirauxifen-benzil (extrato branco), em seis replicatas independentes (SANTE 2021). A ausência de picos no cromatograma do extrato branco, no mesmo tempo de retenção do florpirauxifen-benzil, indica que o método foi seletivo.

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ foram determinados, por meio de experimentos de fortificação da matriz arroz com a menor quantidade de florpirauxifen-benzil que possa ser detectada e quantificada, respectivamente, usando as condições otimizadas na ESL-PBT. Os LD e LQ foram as concentrações de florpirauxifen-benzil que geraram picos cromatográficos com área três e dez vezes maior, respectivamente, que a área cromatográfica do ruído da linha de base, no mesmo tempo de retenção do florpirauxifen-benzil, do cromatograma do extrato da matriz arroz isenta desse herbicida (extrato branco) (SANTE 2021). O LQ foi confirmado como a menor concentração de fortificação avaliada por seis repetições independentes que atendam o critério estabelecido, ou seja, com desvio-padrão relativo inferior a 20% e taxas de recuperação entre 70 e 120% (SANTE 2021).

Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas, por meio de experimentos de fortificação e recuperação do florpirauxifen-benzil na matriz arroz. A precisão foi determinada sob condições de repetibilidade, usando a concentração de $90 \mu\text{g kg}^{-1}$, com sete repetições independentes, em que os desvios-padrão relativos (DPR) inferiores a 20% foram considerados aceitáveis. A exatidão foi avaliada, usando as concentrações: 5,0; 90,0 e $150,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ com três replicatas independentes para cada nível e as taxas de recuperação com valores entre 70 e 120% foram consideradas aceitáveis (SANTE 2021). Esses parâmetros de validação foram determinados, no mesmo dia, conforme recomendação do protocolo SANTE.

Faixa de linearidade

A faixa de linearidade foi avaliada, por meio de curvas analíticas de calibração do extrato da matriz arroz fortificado com florpírauxifen-benzil, em seis níveis de concentração: 5,0; 30,0; 60,0; 90,0; 120,0 e 150,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com três repetições independentes para cada nível. Os parâmetros da regressão linear foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), com exclusão máxima de 22,2% dos dados (teste de Jackknife). Os resíduos da regressão linear foram avaliados pelos parâmetros de normalidade pelo teste de Ryan-Joiner, homoscedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe e independência pelo teste de Durbin-Watson. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos dados da curva analítica para verificar a significância dos parâmetros da regressão e do desvio de linearidade (Souza e Junqueira 2005; Bazílio et al. 2012).

Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado, utilizando duas curvas analíticas de calibração, sendo uma em solvente (metanol) e a outra em extrato da matriz arroz, ambas contendo o florpírauxifen-benzil, nas concentrações de 5,0; 30,0; 60,0; 90,0; 120,0 e 150,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e, em triplicatas independentes para cada concentração. As duas curvas analíticas foram avaliadas, de acordo com o procedimento de linearidade e o efeito de matriz foi determinado pela Equação 1.

$$\text{Efeito de matriz (\%)} = 100 * \left(\frac{I_{\text{matriz}}}{I_{\text{solvente}}} - 1 \right) \quad (1)$$

Em que: I_{matriz} = é o coeficiente angular da curva analítica no extrato da matriz arroz fortificada com o herbicida; I_{solvente} = é o coeficiente angular da curva analítica para o composto em solvente metanol.

O resultado encontrado foi interpretado da seguinte forma: baixo efeito de matriz (valores encontrados entre - 20% e + 20%); médio efeito de matriz (valores encontrados entre - 50% e - 20% ou entre + 20% e + 50%); alto efeito de matriz (valores encontrados abaixo de - 50% ou acima de + 50%) (Tomasini et al. 2012; Economou et al. 2009).

Resultados e discussão

Otimização das condições cromatográficas

Florpírauxifen-benzil é o herbicida indicado para o cultivo de arroz irrigado. No entanto o uso desse pesticida na agricultura pode promover a contaminação dos recursos hídricos, do solo e do arroz (USA 2017a; APVMA 2018; MDAR and MassDEP 2019). Portanto o monitoramento desse composto deve ocorrer nessas três matrizes, conforme realizado por um grupo de pesquisadores chineses, que utilizou o método QuEChERS, seguido de análise UPLC-QTOF-MS/MS (Zhou et al. 2022). Da mesma forma, nosso grupo de pesquisa também desenvolveu metodologias de extração, para a determinação desse composto

na água (Vieira et al. 2022) e no solo (Lopes et al. 2023) e, neste estudo, a matriz arroz foi alvo de nossa pesquisa. Nesses três estudos foram avaliadas as condições cromatográficas e as condições ótimas, em cada estudo, podem ser observadas na Tabela 3.

Então, inicialmente, essas condições cromatográficas foram aplicadas, para a determinação desse herbicida, em extratos da matriz arroz. Os cromatogramas obtidos podem ser observados na Figura 1.

Tabela 3 Estudo comparativo das condições cromatográficas para a determinação de florpiauxifen-benzil

Parâmetros	Vieira et al. 2022	Lopes et al. 2023	Zhou et al. 2022			Este estudo
	Água	Solo	Água	Solo	Arroz	Arroz
Técnica	HPLC-DAD ^a	HPLC-DAD	UPLC-QTOF-MS/MS ^b			HPLC-DAD
Coluna cromatográfica	Poroshell C18	Poroshell C18	Waters Cortecstm UPLC C18			Kinetex C18
Temperatura da coluna (°C)	30	30	40			25
Eluição	Isocrática	Isocrática	Isocrática			Isocrática
Composição da fase móvel (% v/v)	ACN ^c :água (100:0)	(ACN:água) com 0,1% AF ^d (85:15)	ACN:água com 0,1% AF (60:40)			Metanol:água (78:22)
Fluxo (mL min ⁻¹)	0,4	0,3	0,3			0,3
Volume de injeção (µL)	20	10	4			10
Comprimento de onda (nm)	243	243	-			260
Tempo de retenção (min)	1,5	2,63	5,60			13,02

^aHPLC-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos; ^bUPLC-QTOF-MS/MS: cromatografia líquida de ultra performace acoplada a um espectrômetro de massa com analisador do tipo quadrupolo-tempo-de-vôo; ^cACN: acetonitrila; ^dAF: ácido fórmico.

É possível observar que os cromatogramas obtidos apresentam muitos picos interferentes provenientes da matriz arroz, dificultando a determinação do pico do florpiauxifen-benzil.

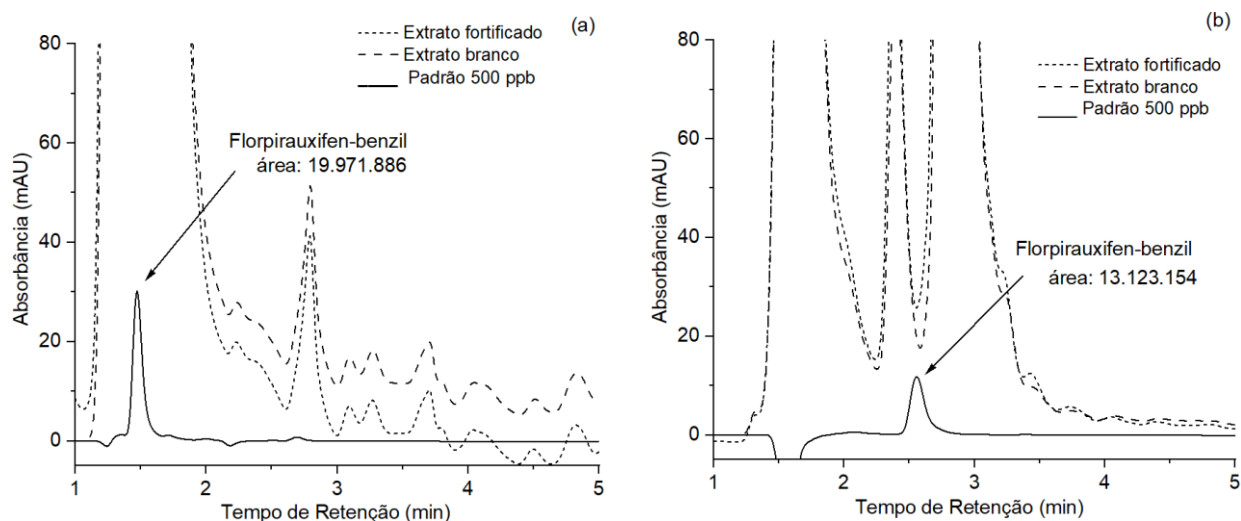


Fig. 1 Cromatograma do extrato da matriz fortificada com florpirauxifen-benzil para a concentração de $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ (.....), cromatograma do extrato da matriz livre de florpirauxifen-benzil (extrato em branco) (- -) e cromatograma do padrão de florpirauxifen-benzil em solvente acetonitrila para a concentração de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ (—). Condições cromatográficas: coluna Poroshell, volume de injeção = $20 \mu\text{L}$, fase móvel acetonitrila:água (100:0), $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, taxa de fluxo = $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 243 \text{ nm}$ (a); coluna Poroshell, volume de injeção = $10 \mu\text{L}$, fase móvel acetonitrila acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico:água (85:15), $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, taxa de fluxo = $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 243 \text{ nm}$ (b).

Portanto foi necessária uma nova otimização das condições cromatográficas, visando à determinação de florpirauxifen-benzil em extrato de arroz. Os parâmetros avaliados podem ser vistos na Tabela 1, e os cromatogramas obtidos podem ser vistos na Figura 2.

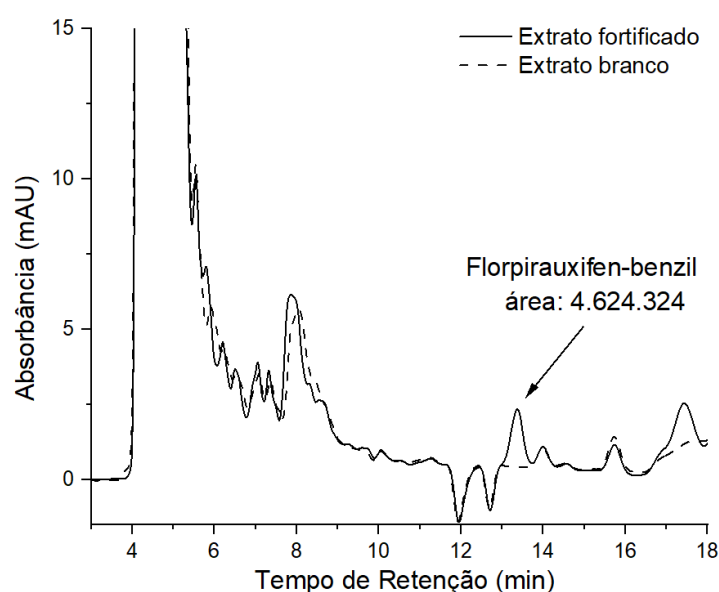


Fig. 2 Cromatograma do extrato da matriz fortificada com florpirauxifen-benzil para a concentração de $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ (—) e cromatograma do extrato da matriz livre de florpirauxifen-benzil (extrato branco) (- -). Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = $10 \mu\text{L}$, taxa de fluxo = $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$ e fase móvel metanol:água (78:22).

O cromatograma obtido mostrou o pico do florpiauxifen-benzil, em um tempo de retenção maior (13,02 min) em que trabalhos anteriores (1,50 a 5,60 min), porém livre de interferentes da matriz arroz. Dessa forma, essa condição cromatográfica foi utilizada neste estudo. É importante destacar que o pico livre de interferência só foi possível, utilizando 260 nm como comprimento de onda, apesar de 243 nm ser o comprimento de onda de absorção máxima (Figura 3).

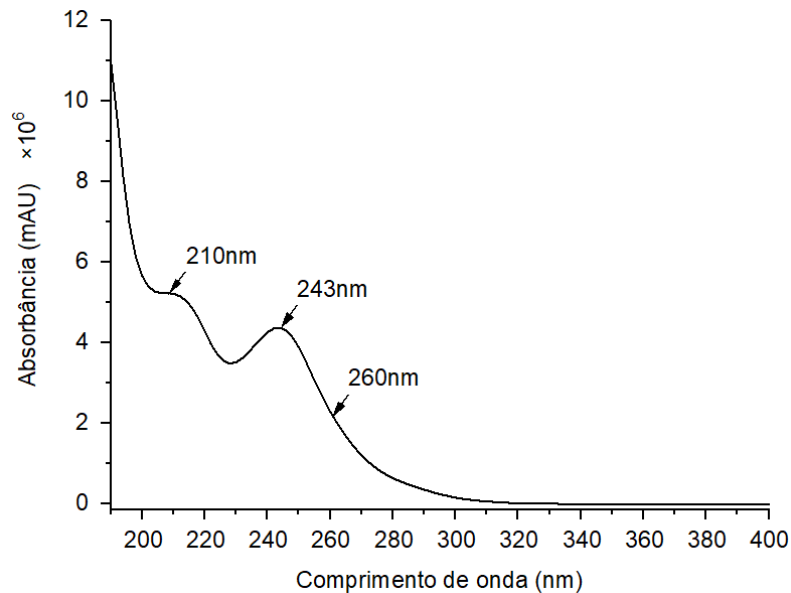


Fig. 3 Espectro de absorção na região ultravioleta da solução padrão de florpiauxifen-benzil em acetoneitrila para a concentração de 1.0 mg L^{-1} .

O próximo passo deste estudo foi determinar as condições ótimas de extração usando o método de ESL-PBT.

Otimização das condições de extração do método ESL-PBT

Quatro fases de extração foram avaliadas neste estudo, como pode ser visto na Tabela 2. As taxas de recuperação e os desvios-padrão relativos (DPR) obtidos, em cada fase extratora, são apresentados na Figura 4.

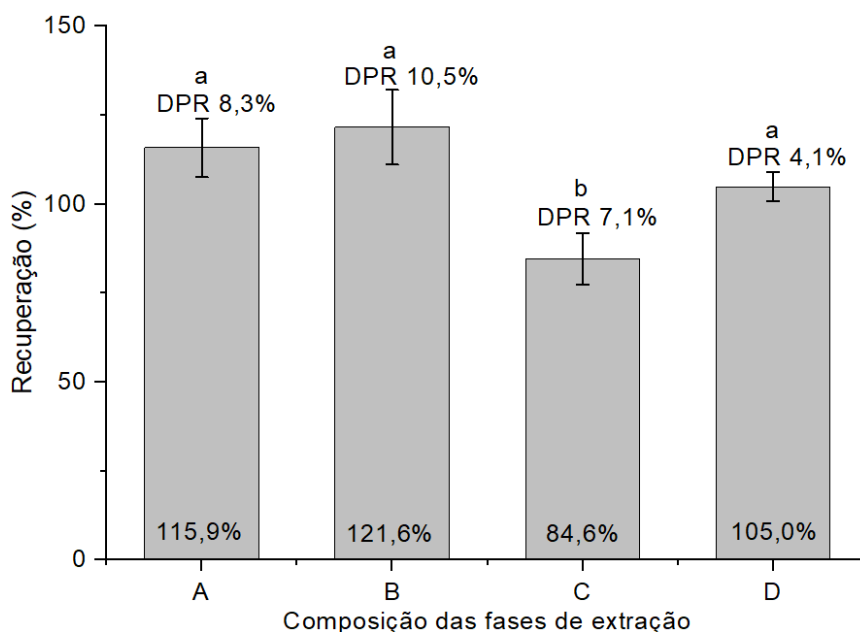


Fig. 4 Porcentagens de extração de florpirauxifen-benzil em quatro diferentes composições de fases extratoras. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente uma das outras pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. (A) acetonitrila:água (8:4 v/v), (B) acetonitrila acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico:água (8:4 v/v), (C) acetonitrila acidificada com 0,1% (v/v) de ácido clorídrico:água (8:4 v/v), (D) acetonitrila + acetato de etila:água (6,5+1,5:4 v/v).

Os resultados revelaram que apenas a fase extratora constituída por acetonitrila acidificada com ácido clorídrico e água diferiu estatisticamente das outras três fases extratoras, pelo teste Turkey. Por isso, os cromatogramas das outras três fases extratoras foram comparados visando selecionar o cromatograma com maior área cromatográfica para o pico do florpirauxifen-benzil e menor número de interferentes da matriz. Os cromatogramas obtidos na avaliação são mostrados na Figura 5.

Os resultados mostraram que o cromatograma obtido, empregando a fase extratora constituída por acetonitrila:água (Figura 5 (a)), apresentou maior área cromatográfica para o pico do florpirauxifen-benzil, por isso, essa fase extratora foi definida para a próxima etapa deste estudo. Essa composição de fase extratora foi recentemente empregada, para extrair florpirauxifen-benzil nas matrizes de água, solo e arroz (Vieira et al. 2022; Zhou et al. 2022) e tem sido empregada com sucesso na extração de outros contaminantes ambientais, como furanos (2,3,7,8-TCDF), dioxinas (2,3,7,8-TCDD) (Sicupira et al. 2019, 2023) e pesticidas organoclorados (Mesquita et al. 2018).

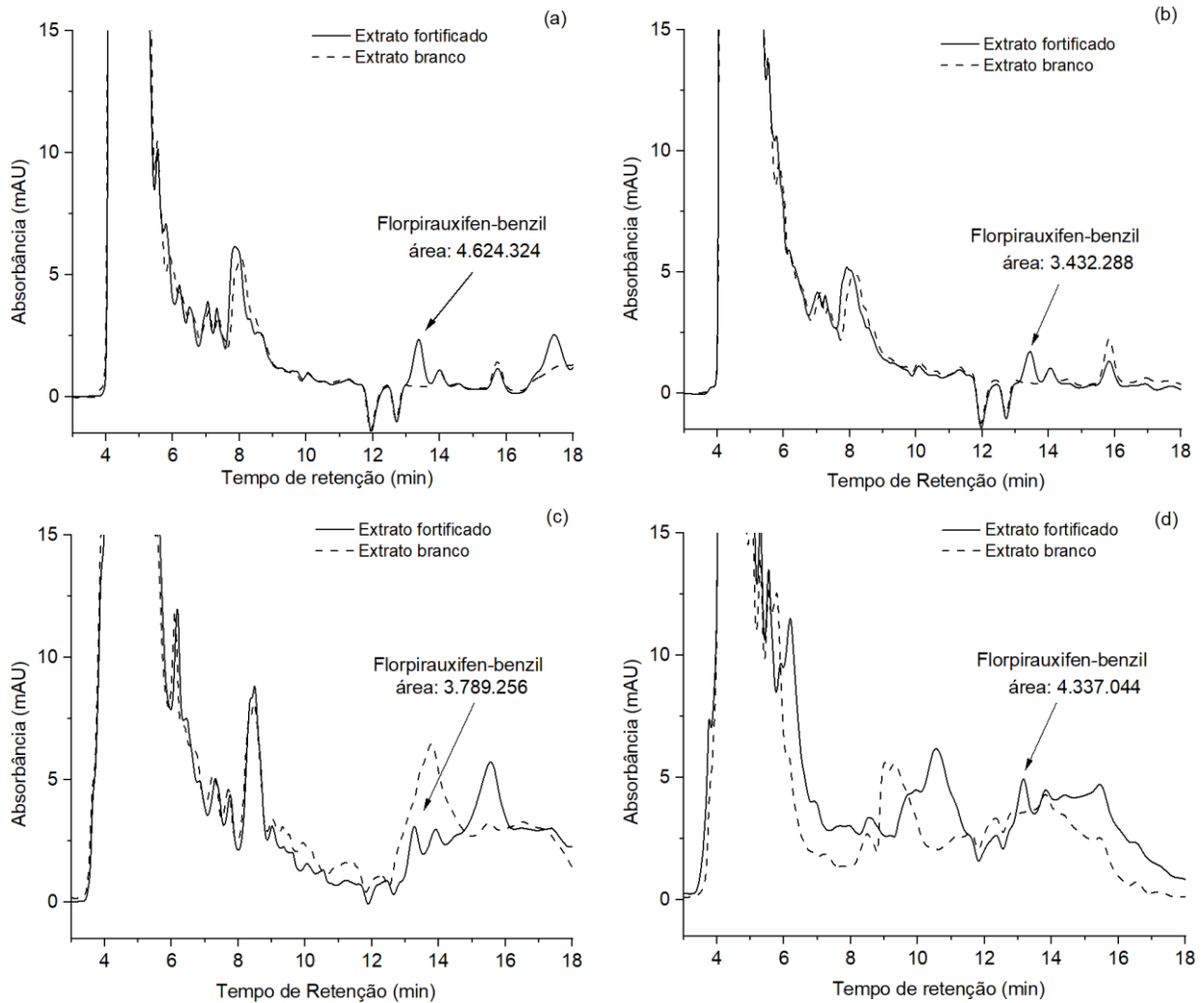


Fig. 5 Cromatograma do extrato da matriz fortificada com florpirauxifen-benzil para a concentração de $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ (—) e cromatograma do extrato da matriz livre de florpirauxifen-benzil (extrato em branco) (- -). Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = $10 \mu\text{L}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, taxa de fluxo = $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$ e fase móvel metanol:água (78:22). (a) acetonitrila:água (8:4 v/v), (b) acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico:água (8:4 v/v), (c) acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido clorídrico:água (8:4 v/v), (d) acetonitrila + acetato de etila:água (6,5+1,5:4 v/v).

Uma das principais características da ESL-PBT é a limpeza prévia dos extratos durante o processo de congelamento. Entretanto, para a matriz arroz, foi necessária uma etapa de *clean-up* adicional, pois, durante a etapa de secagem dos extratos, foi observado o extrato amarelado, indicando um aspecto gorduroso. Por isso, seis adsorventes foram avaliados e as taxas de recuperação e os cromatogramas obtidos em cada condição de *clean-up* são mostrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

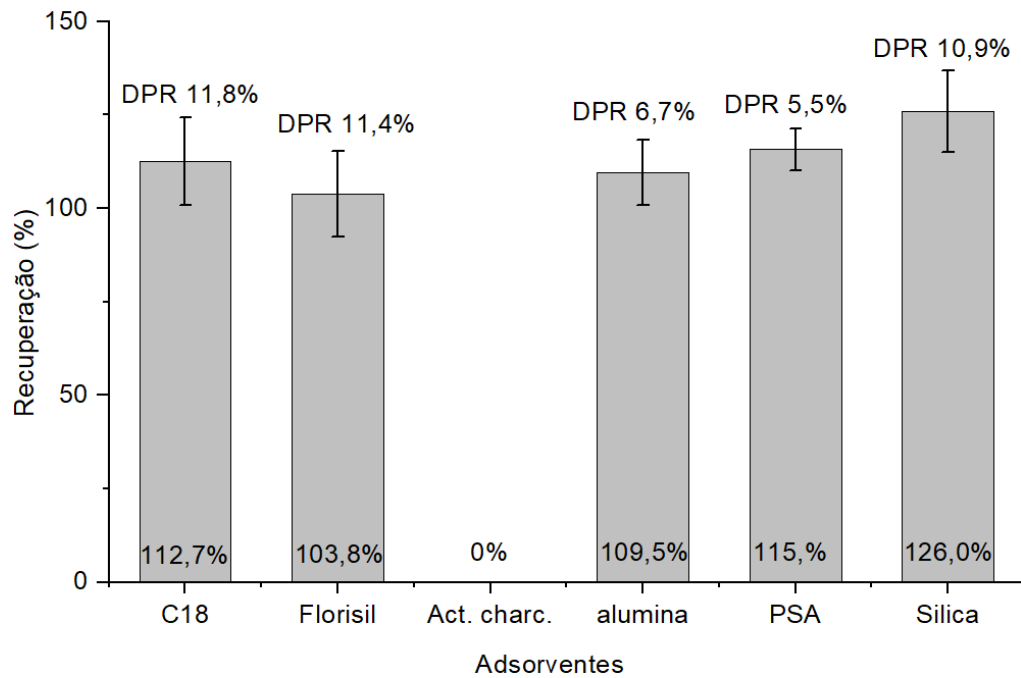


Fig. 6 Porcentagens de extração de flornipiraxifen-benzil da matriz arroz, empregando o método ESL-PBT nas condições otimizadas: fase extratora acetonitrila:água (8:4 v/v) para seis diferentes condições de *clean-up* (sílica gel funcionalizada com octadecila (C18), florisil, carvão ativado (Act. Charc), alumina, amina primária e secundária (PSA) e sílica gel) todos na concentração de 50 mg de adsorvente por mL de extrato da matriz arroz.

Os resultados indicaram que o carvão ativado adsorveu completamente o flornipiraxifen-benzil (ver Figura 7 (c)), resultando em um cromatograma sem o sinal desse composto, ou seja, não é interessante para este estudo. Os cromatogramas obtidos para os extratos, após *clean-up* com C18, alumina e PSA, apresentaram perfis semelhantes, na região do pico do flornipiraxifen-benzil, como pode ser observado nas Figuras 7(a), (d) e (e). Entretanto apenas o cromatograma do extrato submetido ao *clean-up* com alumina resultou em uma linha de base mais horizontal, pico do flornipiraxifen-benzil sem interferentes, maior área cromatográfica absoluta para o pico do flornipiraxifen-benzil, taxa de recuperação e desvio-padrão relativo adequados. Por isso, a alumina foi definida para o *clean-up* dos extratos neste estudo.

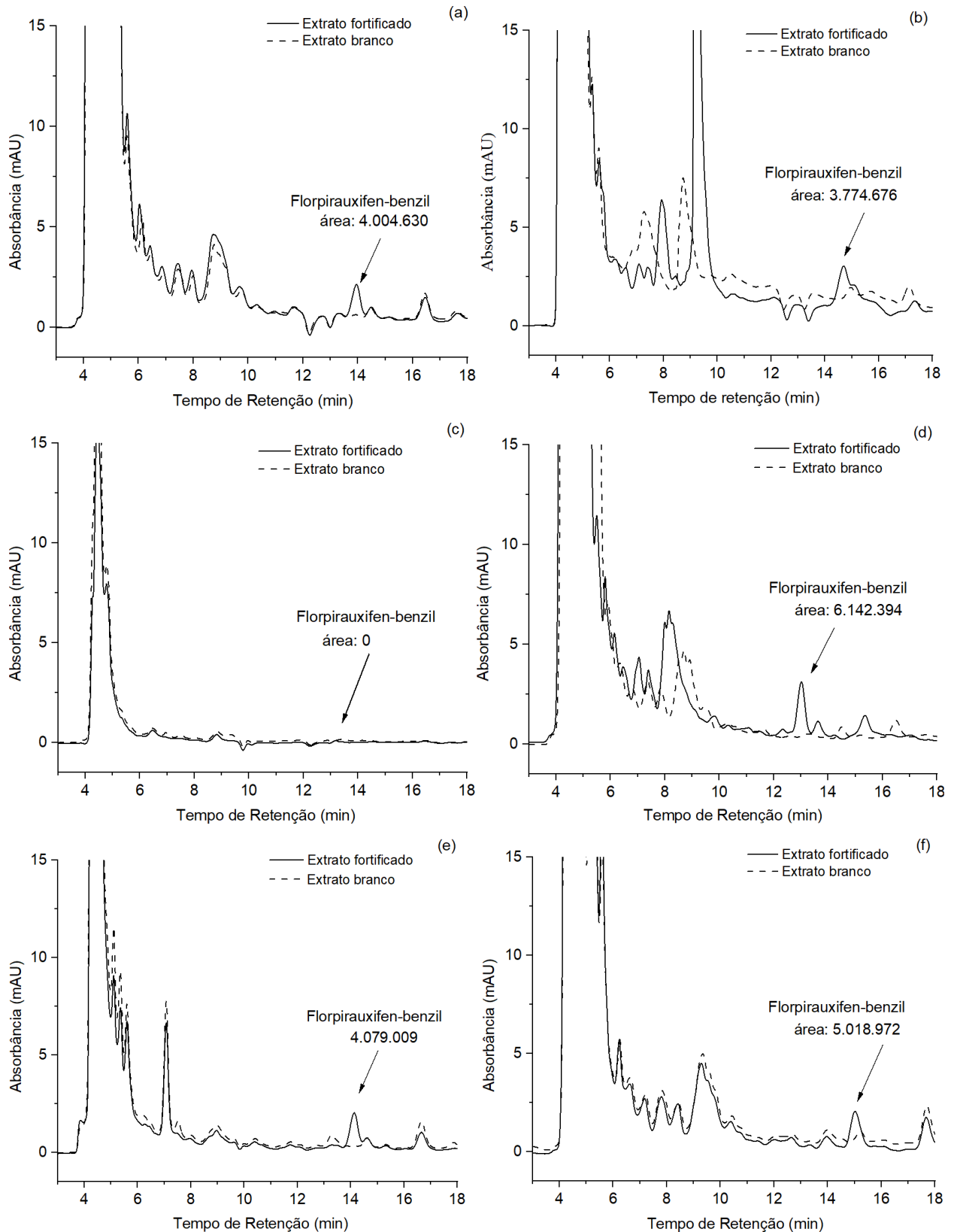


Fig. 7 Cromatograma do extrato da matriz fortificada com florpirauxifen-benzil para a concentração de $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ (—) e cromatograma do extrato da matriz livre de florpirauxifen-benzil (extrato em branco) (- -). Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = $10 \mu\text{L}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, taxa de fluxo = $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$ e fase móvel metanol:água (78:22). *Clean-up* realizado com 50 mg de adsorvente por

mL de extrato da matriz. (a) adsorvente C18, (b) florisil, (c) carvão ativado (Act. Charc), (d) alumina, (e) PSA e (f) sílica gel 60.

A quantidade de adsorvente por mL de extrato da matriz também foi avaliada neste estudo. Nesse sentido, foram avaliadas massas de 50 e 100 mg de alumina para o *clean-up* do extrato do arroz. A taxa de recuperação e desvio-padrão relativos obtidos podem ser vistos na Figura 8.

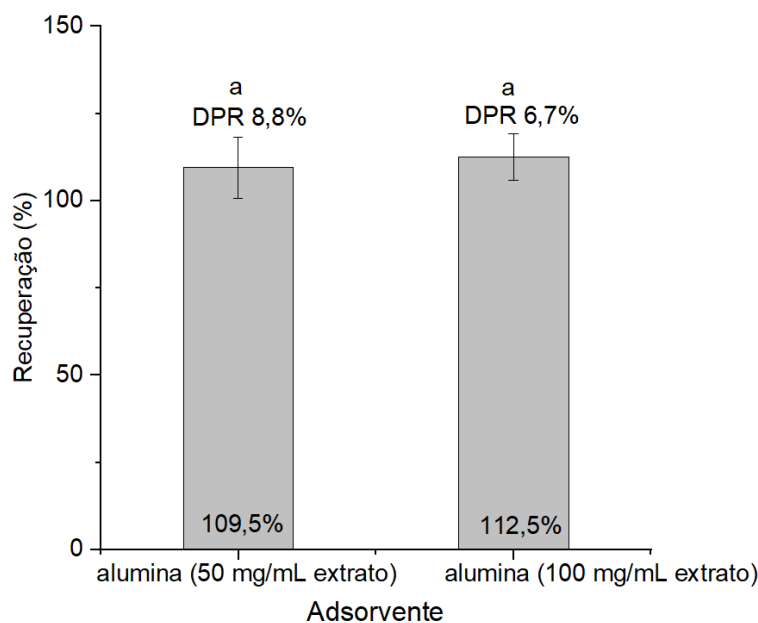


Fig. 8 Porcentagem de extração de florpirauxifen-benzil da matriz arroz, empregando o método ESL-PBT nas condições otimizadas: fase extratora acetonitrila:água (8:4 v/v) e *clean-up* usando o adsorvente alumina nas concentrações de 50 e 100 mg de adsorvente por mL de extrato da matriz arroz.

Os resultados indicaram que as taxas de recuperação não diferiram estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%. Por isso, a massa de adsorvente escolhida para *clean-up* dos extratos de arroz foi definida como 50 mg de adsorvente por mL de extrato da matriz.

Foi realizado um estudo comparativo entre os três métodos de extração desenvolvidos em estudos anteriores e o método otimizado neste estudo, conforme pode ser observado na Tabela 4.

É possível observar que os quatro métodos de extração utilizaram acetonitrila como fase de extração e apresentaram taxas de recuperação próximas a 100% e desvios-padrão relativos inferiores a 20%. Da mesma forma, todos os métodos de extração apresentaram valores de LD e LQ inferiores ao LMR (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em arroz).

A etapa de limpeza foi observada, para as três matrizes pelo método QuEChERS, mas apenas na matriz arroz pelo método ESL-PBT. Esse resultado revela novamente a limpeza anterior realizada durante a fase de congelamento da ESL-PBT.

Tabela 4 Estudo comparativo dos métodos de extração desenvolvidos em estudos anteriores e o método otimizado neste estudo

Parâmetros	Vieira et al. 2022	Lopes et al. 2023	Zhou et al. 2022			Este estudo
	Água	Solo	Água	Solo	Arroz	Arroz
Método de extração	ELL-PBT ^a	ESL-PBT ^b	QuEChERS ^c			ESL-PBT
Fase de extração (mL)	ACN ^d (8:4)	ACN 0,1% AF ^e : água (8:4)	ACN:água (20:5)			ACN:água (8:4)
Volume de solvente (mL)	8	8	20			8
Massa ou volume de amostra (g ou mL)	4	4	5			4
Etapa de <i>clean-up</i>	-	-	5 mg GCB ^f	15 mg GCB	20 mg GCB	50 mg Alumina
Taxa de recuperação (%)	103,3-105,6	108,3-109,1	95,35-112,63			100,4-118,3
DPR ^g (%)	0,2-5,1	1,86-9,30	0,54-8,31			5,66-16,73
LD ^h (µg L ⁻¹)	2	5	0,42	0,48	0,81	3
LQ ⁱ (µg L ⁻¹)	4	20	0,94	1,31	1,58	5

^aELL-PBT: extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura; ^bESL-PBT: extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura; ^cQuEChERS: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*; ^dACN: acetonitrila; ^eAF: ácido fórmico; ^fGCB: carbono grafitizado; ^gDPR: desvio padrão relativo; ^hLD: limite de detecção; ⁱLQ: limite de quantificação.

Pela Tabela 4 também pode-se observar que a ELL-PBT e a ESL-PBT apresentaram o menor volume da fase extratora e quantidade de amostra, em relação ao método QuEChERS, indicando um fator positivo para esses dois métodos.

Após essa etapa, foi realizada a validação analítica da metodologia de extração, conforme protocolo SANTE (SANTE 2021).

Método de validação

A metodologia otimizada foi validada, utilizando as seis figuras de mérito: seletividade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), faixa de linearidade, precisão, exatidão e efeito de matriz (SANTE 2021).

Seletividade

A seletividade da metodologia otimizada foi confirmada pela análise dos cromatogramas do extrato da matriz arroz livre de florpiauxifen-benzil (extrato branco) e do extrato da matriz fortificado com florpiauxifen-benzil. Os cromatogramas obtidos podem ser observados na Figura 9.

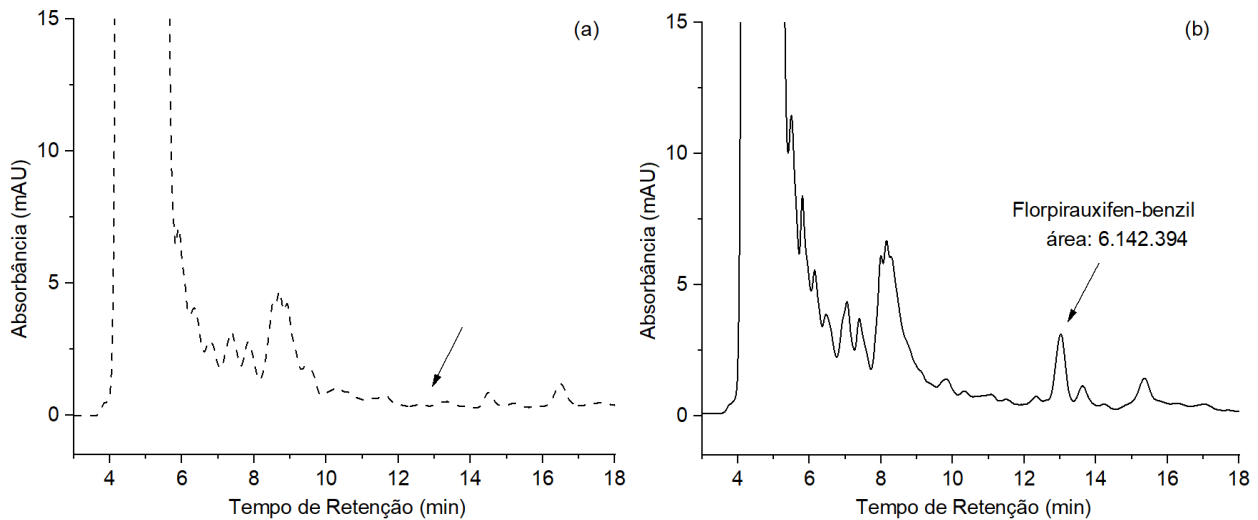


Fig. 9 (a) Cromatograma do extrato da matriz livre do analito (extrato branco) e (b) cromatograma do extrato da matriz fortificada com flupiraxifen-benzil para a concentração de $90 \mu\text{g kg}^{-1}$. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = $10 \mu\text{L}$, fase móvel metanol:água (78:22), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, taxa de fluxo = $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$.

O método foi considerado seletivo, porque não foram observados picos de interferentes, no tempo de retenção do flupiraxifen-benzil.

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ alcançados pela metodologia otimizada podem ser observados na Tabela 5. Esses valores estão abaixo do limite máximo de resíduo (LMR) de flupiraxifen-benzil em arroz definido pelas legislações brasileiras (ANVISA 2022) e Americana (USA 2017b) que foram de 10 e $300 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. De forma similar, os valores atingidos neste estudo também foram inferiores ao LMR definidos pelas legislações Europeia (Arena et al. 2018) e Australiana (APVMA 2018) que definiram $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 5 Resultados do estudo de validação analítica

Faixa de linearidade $\mu\text{g kg}^{-1}$	Equação da reta	R^{2c}	Recuperação \pm DPR ^d (%)			LD ^e $\mu\text{g kg}^{-1}$	LQ ^f $\mu\text{g kg}^{-1}$
			$5,0 \mu\text{g kg}^{-1a}$	$90,0 \mu\text{g kg}^{-1b}$	$150,0 \mu\text{g kg}^{-1a}$		
5,0 – 150,0	$y = 51770x - 205839$	0,9933	$100,4 \pm 16,73$	$118,3 \pm 5,66$	$114,3 \pm 10,75$	3,0	5,0

^aMédia de 3 replicatas; ^bmédia de 7 replicatas; ^ccoeficiente de determinação; ^ddesvio padrão relativo; ^elimite de detecção; ^flimite de quantificação.

Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram simultaneamente confirmadas por experimentos de fortificação e recuperação das amostras de arroz. Os resultados da Tabela 5 revelam que os valores de DPR foram

inferiores a 20% e as taxas de recuperação ficaram entre 70 e 120%. Esses valores demonstraram que a precisão e exatidão do método otimizado está de acordo com as diretrizes do protocolo de validação analítica SANTE (SANTE 2021).

Faixa de linearidade

A faixa de linearidade do método otimizado foi determinada, usando seis concentrações equidistantes com três replicatas independentes para cada nível. A faixa de linearidade inclui o valor da concentração do LQ e a concentração de fortificação da amostra que foi de $90.0 \mu\text{g kg}^{-1}$, como pode ser observado na Figura 10(a).

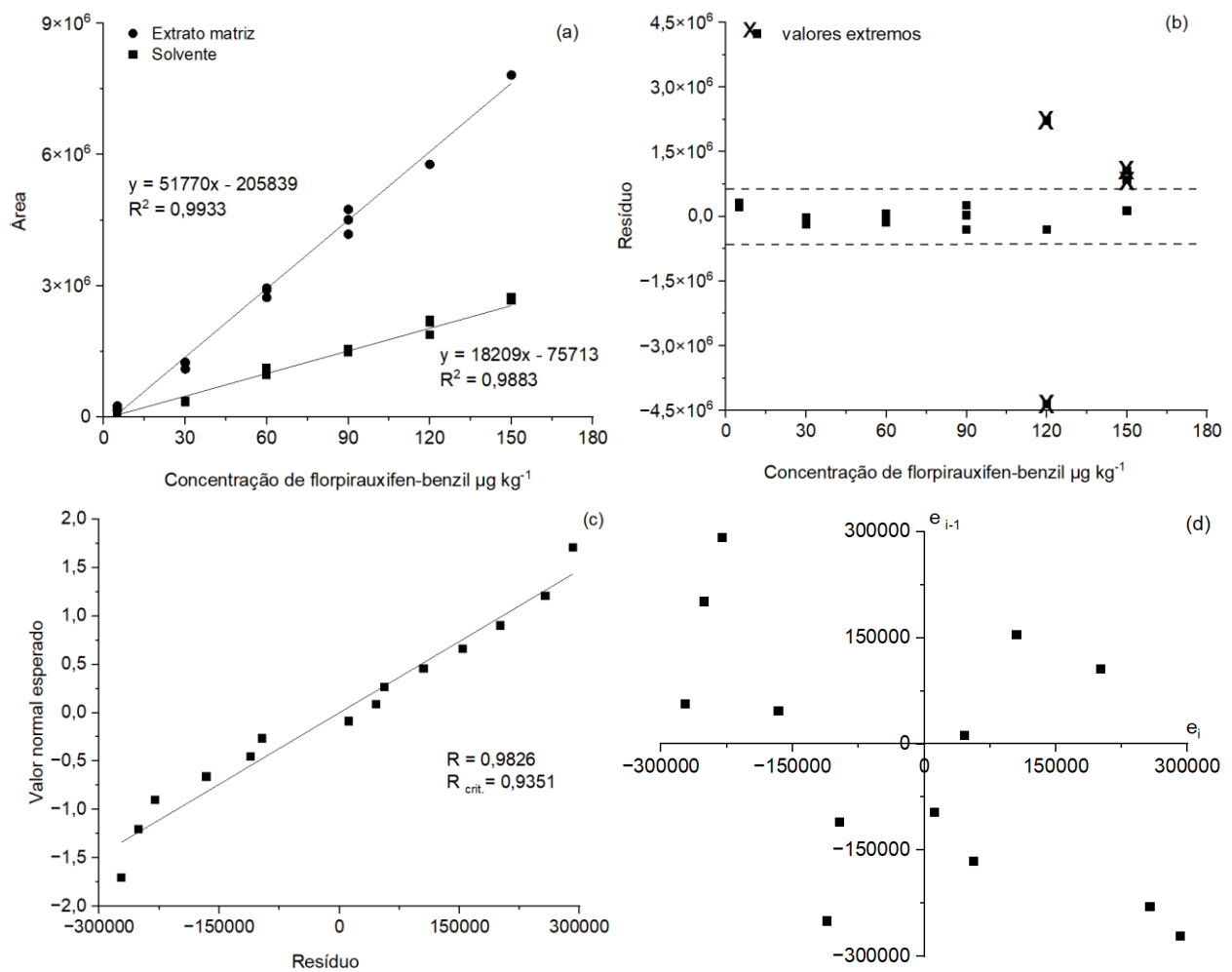


Fig. 10 Gráficos obtidos no estudo de linearidade da metodologia otimizada para florpirauxifen-benzil. (a) Curvas analíticas de calibração deste composto em solvente e extrato da matriz. (b) Resíduos de regressão linear com exclusão dos valores extremos. (c) Probabilidade normal dos resíduos de regressão. (d) Gráfico de autocorrelação dos resíduos de regressão pelo teste de Durbin-Watson. R^2 : coeficiente de determinação; R: coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner; e_i : resíduo.

O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi utilizado, para estimar os parâmetros da regressão linear, obtendo assim os valores de inclinação, interseção e coeficiente de determinação (R^2),

conforme pode ser observado na Tabela 5. O valor de R^2 foi maior que 0,99, indicando a variabilidade dos dados coletados explicados pelo modelo de regressão.

O teste de Jackknife foi aplicado, para os resíduos de regressão e os outliers encontrados foram excluídos, como pode ser observado na Figura 10(b). Em seguida, foram avaliadas a normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos de regressão.

O teste de Ryan-Joiner foi utilizado para avaliar a normalidade dos resíduos de regressão (Figura 10(c)). O coeficiente de correlação (R) encontrado foi maior que o coeficiente de correlação crítico ($R_{crit.}$) obtido por interpolação polinomial ($R = 0,9826 > R_{crit.} 0,9351$). Conclui-se assim, que os resíduos seguiram a distribuição normal ao nível de significância de 0,05.

O teste de Brown-Forsythe que determina a existência de diferenças entre as variâncias residuais, por meio de uma adaptação do teste de Levene, foi utilizado para avaliar a homoscedasticidade dos resíduos de regressão. O valor estatístico para o T de Levene (TL) encontrado foi menor que o valor crítico ao nível de significância de 0,05 ($TL = 1,54 < T_{crit. (0,975)} = 2,18$), confirmando a homoscedasticidade.

O teste de Durbin-Watson foi utilizado, para avaliar a independência dos resíduos da regressão; o valor estatístico (d) calculado para o teste foi maior que o valor calculado para o limite crítico superior (d_u) ($d = 2,71 > d_u = 1,35$) e não foi observada autocorrelação ao nível de significância de 0,05. Observou-se uma distribuição aleatória dos resíduos, nos quatro quadrantes, demonstrando sua independência, conforme pode ser observado na Figura 10(d).

A avaliação da linearidade seguiu os procedimentos propostos por Souza e Junqueira (2005) e Bazílio et al. (2012). Os dados foram ajustados ao modelo linear, para a faixa avaliada de 5,0 a 150,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 5), em que foram observados regressão significativa e desvio de linearidade não significativo ao nível de significância de 0,05. Conclui-se que o MMQO foi adequado para os dados estudados.

Efeito de matriz

O efeito de matriz calculado, na determinação de flupiraxifen-benzil em arroz, foi de 184,3%. Esse valor é classificado como um efeito de matriz muito elevado. Esse resultado foi diferente do encontrado em estudo recente, usando o mesmo sistema de análise e detecção (HPLC-DAD), para a determinação do flupiraxifen-benzil em solo, pois foi verificado baixo efeito de matriz (-3,34%) (Lopes et al. 2023) e nenhum efeito de matriz nas análises desse herbicida para a matriz água (Vieira et al. 2022).

Vale ressaltar que o arroz é considerado uma matriz complexa por sua composição química rica em carboidratos, lipídeos e pigmentos que podem ser coextraídos juntamente com o analito alvo e, assim, interferirem no sinal cromatográfico (Pinho et al. 2009). Isso pode ser comprovado, por meio de vários estudos anteriores, que relataram efeito de matriz significativo para a matriz arroz (Rebelo et al. 2016; Mardani et al. 2021; Li et al. 2019; Mondal et al. 2017; Sefiloglu et al. 2021). Diferentes métodos de análise foram utilizados nesses estudos, para quantificar pesticidas no arroz, como os herbicidas ciclosulfamuron, tiobencarbe, cicloxidime, imazapir, imazapique (Rebelo et al. 2016), foransulfurom (Mardani et al. 2021); os inseticidas tetraniliprole (Li et al. 2019), cartap, fenpropatrina (Mardani et al. 2021), malationa (Mondal et al. 2017) e clorpirifós (Sefiloglu et al. 2021); e o fungicida procloraz (Mardani et al. 2021). Todos estes estudos comprovam que a matriz arroz apresenta comumente efeito de matriz elevado.

Conclusão

A metodologia de ESL-PBT foi otimizada e validada, para a determinação de florniraxifen-benzil em amostras de arroz, usando o HPLC-DAD. Essa metodologia se apresentou de fácil execução, rápida, sensível e eficaz, para a determinação de florniraxifen-benzil em amostras de arroz, pois o limite de quantificação encontrado foi inferior ao LMR definido pelas legislações brasileira e internacional para a matriz arroz. Por todos estes motivos, essa metodologia demonstrou ser uma alternativa promissora para o monitoramento de florniraxifen-benzil em amostras de arroz.

Agradecimentos Os autores são gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Laboratório de Química Instrumental (LQI-UFMG) e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela infraestrutura disponibilizada.

Contribuição dos Autores J. C. S. Lopes: preparo das amostras, realização das análises no HPLC-DAD, investigação, validação, redação e edição do manuscrito original. L. C. Sicupira: apoio técnico à pesquisa, preparo de figuras, revisão, edição e supervisão da versão final. G. P. de Pinho: forneceu revisão crítica e sugestões, para melhorar a pesquisa, supervisionou e ajudou na revisão do manuscrito. F. O. Silvério: realizou a revisão, edição, supervisão, administração do projeto, captação de recursos e coordenou a pesquisa. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento Este estudo foi financiado em parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (306551/2022-5) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-02736-21 and APQ-00472-22). Os autores agradecem ao Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG) pelo suporte financeiro na forma de bolsas de pesquisa.

Disponibilidade dos Dados Todos os dados que apoiam os resultados deste estudo estão disponíveis no artigo e em seus arquivos de informação suplementares.

Declarações

Aprovação Ética Esse artigo não contém estudos com participantes humanos ou animais.

Interesses Conflitantes Os autores declaram não haver interesses conflitantes.

Consentimento Livre e Esclarecido O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

Referências

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2022) Florpirauxifen-benzil. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/f/4376json-file-1/view>. Acesso em 5 Maio 2023.

APVMA Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (2018) On the evaluation of the new active florpyrauxifen-benzyl (Rinskor™) in the product GF-3301 herbicide. <https://apvma.gov.au/node/29096>. Acesso em 3 Abril 2023.

Arena M, Auteri D, Barmaz S et al (2018) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance florpyrauxifen (variant assessed florpyrauxifen-benzyl). *EFSA J* 16:5378-5399. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5378>.

Bazilio FS, Bomfim MVJ, Almeida RJ, Abrantes SMP (2012) Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. *Revista Analytica* 59:60-67.

Economou A, Botitsi H, Antoniou S, Tsipi D (2009) Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216:5856-5867. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.031>.

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2021) Cultivo do arroz-Estatística de produção. [https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/pre-producao/socioeconomia/estatistica-de-producao#:~:text=Em%20primeiro%20lugar%20est%C3%A1%20a,\(19%20milh%C3%B5es%20de%20toneladas\)](https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/pre-producao/socioeconomia/estatistica-de-producao#:~:text=Em%20primeiro%20lugar%20est%C3%A1%20a,(19%20milh%C3%B5es%20de%20toneladas)). Acesso em 30 Maio 2023.

Li W, Zhang Y, Jia H, Zhou W, Li B, Huang H (2019) Residue analysis of tetraniliprole in rice and related environmental samples by HPLC/MS. *Microchem J* 150:104168. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104168>.

Lopes JCS, Sicupira LC, Silvério FO (2023) Extraction method for determining florpyrauxifen-benzyl herbicide in soil. *J Braz Chem Soc* 34:302-308. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220108>.

Mardani Z, Shakoori A, Peiravian F, Nouri L, Salamzadeh J (2021) Development of a liquid chromatography-mass spectrometry technique for evaluation of multi-class pesticides in rice samples. *Iran J Pharm Res* 20:165-174. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.113071.14095>.

MDAR Massachusetts Department of Agriculture and MassDEP Massachusetts Department of Environmental Protection (2019) Review of florpyrauxifen-benzyl for application to massachusetts lakes and ponds. https://www.mass.gov/doc/florpyrauxifen-benzyl/download?_ga=2.139085427.1949808461.1686704084-1027380426.1686704084. Acesso em 30 Abril 2023.

Mesquita TCR, Santos RR, Cacique AP, De Sá LJ, Silvério FO, Pinho GP (2018) Easy and fast extraction methods to determine organochlorine pesticides in sewage sludge, soil, and water samples based at low temperature. *J Environ Sci Health B* 53:199-206. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1405626>.

Mondal R, Kole RK, Bhattacharyya A (2017) Validation of multiresidue method for analysis of 31 pesticides in rice using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J AOAC Int* 100:1094-1101. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0377>.

Pereira NGF, Silvério FO, Pinho GP (2020) Optimisation, validation and application of the solid-liquid extraction with low-temperature purification followed by gas chromatography-mass spectrometry for determination of phthalates in sewage sludge. *Int J Environ An Ch* 100: 968-980. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1646735>.

Pinho GP, Neves AA, Queiroz MELR, Silvério FO (2009) Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Quim Nova* 32:987-995. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400030>.

Ramalho MB, Durães AFS, Silvério FO, Pinho GP (2020) Determination of three cresol isomers in sewage sludge by solid-liquid extraction with low temperature purification and gas chromatography-mass spectrometry. *J Environ Sci Health B* 55:184-192. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1678952>.

Rebello AM, Dolzan MD, Heller M, Deschamps FC, Abate G, Micke GA, Grassi MT (2016) Simultaneous determination of herbicides in rice by QuEChERS and LC-MS/MS using matrix-matched calibration. *J Braz Chem Soc* 27:186-193. <https://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150269>.

SANTE/11312/2021 European Commission (2021) Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. <https://www.accredia.it/documento/guidance-sante-11312-2021-analytical-quality-control-and-method-validation-procedures-for-pesticide-residues-analysis-in-food-and-feed/>. Acesso em 3 Abril 2023.

Sefiloglu FO, Tezel U, Balcioglu IA (2021) Validation of an analytical workflow for the analysis of pesticide and emerging organic contaminant residues in paddy soil and rice. *J Agric Food Chem* 69:3298-3306. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06111>.

Sicupira LC, Tiago JPF, Pinho GP, Silvério FO (2019) Simultaneous Determination of 2,3,7,8-TCDD and 2,3,7,8-TCDF in Water Samples by LLE-LTP and HPLC-DAD. *J Braz Chem Soc* 30:284-1292. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190024>.

Sicupira LC, Freitas LVP, Pinho GP, Silvério FO (2023) Simultaneous Determination of a Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxin and Dibenzo-p-Furan in Environmental Water by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) and a Modified QuEChERS Procedure with High-Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detection (HPLC-DAD). *Anal Lett* 56:2309-2328. <https://doi.org/10.1080/00032719.2023.2166521>.

Souza SVC, Junqueira RG (2005) A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal Chim Acta* 552:25-35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.043>.

Tomasini D, Sampaio MRF, Caldas SS, Buffon JG, Duarte FA, Primel EG (2012) Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* 99:380-386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.068>.

US Food and Drug Administration (2017a) Final registration decision on the new active ingredient florpyrauxifen-benzyl. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2016-0560-0065>. Acesso em 3 Abril 2023.

US Food and Drug Administration (2017b) Florpyrauxifen-benzyl; Pesticide Tolerances. <https://www.federalregister.gov/documents/2017/10/06/2017-21614/florpyrauxifen-benzyl-pesticide-tolerances>. Acesso em 5 Junho 2023.

Vieira LHS, Sicupira LC, Cacique AP, Silvério FO (2022) Optimization and validation of LLE-LTP to determine florpyrauxifen-benzyl herbicide in water samples by HPLC-DAD. *J Environ Sci Health B Pestic Food Contam Agric Wastes* 57:697-709. <https://doi.org/10.1080/03601234.2022.2099202>.

Zhou R, Dong Z, Bian C, Wu T, Zhou W, Li Y, Li B (2022) Florpyrauxifen-benzyl in paddy field environment: its residue analysis, dissipation dynamics, storage stability, dietary risk assessment and decontamination. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4008164>. Acesso em 3 Abril 2023.

5 CONCLUSÃO

A ESL-PBT, seguida pela análise por HPLC-DAD, foi otimizada e validada para a determinação de flupiraxifen-benzil em amostras de solo e arroz. Essa metodologia mostrou ser fácil de executar, rápida, sensível e eficaz. Em comparação com o método QuEChERS, esse método apresentou menor número de etapas, diminuição no uso de solventes e de amostras. Até o momento, não há relatos de trabalhos que utilizaram essa metodologia de extração e análise para a determinação do composto estudado. O limite de quantificação alcançado foi inferior ao máximo aceitável pela legislação brasileira, para a matriz arroz e menor que os alcançados, para outros agrotóxicos no caso da matriz solo. A legislação brasileira ainda não dispõe de um método para monitoramento ambiental para o flupiraxifen-benzil e, portanto, essa metodologia pode ser considerada uma alternativa promissora.