

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

Brenda Maria Silva Santos

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO A BAIXA
TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO DO HERBICIDA HALAUXIFEN-METIL EM ÁGUA**

Brenda Maria Silva Santos

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO A BAIXA
TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO DO HERBICIDA HALAUXIFEN-METIL EM ÁGUA**

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

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério

Coorientadora: Profa. Dra. Gevany Paulino de Pinho

Santos, Brenda Maria Silva.

S237o
2024

Otimização e validação da extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura para determinação do herbicida halauxifen-metil em água [manuscrito]/ Brenda Maria Silva Santos. Montes Claros, 2024.
65 f.: il.

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

Orientador: Flaviano Oliveira Silvério

Banca examinadora: Junai Carvalho de Souza Lopes, Janaina Teles de Faria, Ivan Pires de Oliveira, Charles Martins Aguilar, Flaviano Oliveira Silvério.

Inclui referências: f. 24-29 f.61-64

1. Herbicidas -- Teses. 2. Arilpicolinato -- Teses. 3. Recursos hídricos -- Desenvolvimento -- Teses. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência -- Teses. I. Silvério, Flaviano Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 632.9

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 05 dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte e quatro, às 13:00 horas, sob a Presidência do Professor Flaviano Oliveira Silvério, D. Sc. (Orientador – UFMG/ICA) e com a participação das Professoras Junai Carvalho de Souza Lopes, D. Sc. (IFNMG/Montes Claros) e Janaína Teles de Faria, D. Sc. (UFMG/ICA), e dos Professores Ivan Pires de Oliveira, D. Sc. (UFMG/ICA) e Charles Martins Aguilar, D. Sc. (UFMG/ICA), reuniu-se, presencialmente, a Banca de Defesa de Dissertação de **Brenda Maria Silva Santos**, aluna do Curso de Mestrado em Produção Vegetal. Após avaliação da defesa de Dissertação da referida aluna, a Banca Examinadora procedeu à publicação do resultado da defesa de Dissertação intitulada: **“OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO DO HERBICIDA HALAUXIFEN-METIL EM ÁGUA”**, 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 Mestrado 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, 05 de dezembro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 JUNAI CARVALHO DE SOUZA LOPES
Data: 08/12/2024 09:43:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Junai Carvalho de Souza Lopes
Membro

Documento assinado digitalmente
 IVAN PIRES DE OLIVEIRA
Data: 05/12/2024 23:38:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ivan Pires de Oliveira
Membro

Documento assinado digitalmente
 JANAINA TELES DE FARIA
Data: 06/12/2024 09:11:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Janaína Teles de Faria
Membro

Documento assinado digitalmente
 CHARLES MARTINS AGUILAR
Data: 06/12/2024 08:44:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Charles Martins Aguilar
Membro

Documento assinado digitalmente
 FLAVIANO OLIVEIRA SILVERIO
Data: 05/12/2024 23:33:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Flaviano Oliveira Silvério
Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, rendo toda a minha gratidão ao meu mestre Deus, por me conceder a graça de concluir mais uma etapa tão sonhada da minha vida. A ele toda honra e toda glória, pois esteve ao meu lado em cada momento, em cada desafio, guiando-me com seu amor e sabedoria, e cuidando de cada detalhe.

À minha mãe, Maria Aparecida, mulher forte, meu profundo agradecimento. Sua presença, ainda que à distância, foi constante em meu coração. Obrigado por todo o carinho, pelas palavras de motivação e por me ensinar a seguir em frente, por me ensinar os valores da vida, a não desistir dos meus sonhos. Você é o exemplo de coragem que me inspira a cada dia.

Ao meu pai, Luciano, aos meus irmãos Luciney e Sidney, sou imensamente grata por todo o apoio e compreensão ao longo dessa jornada. Vocês sempre estiveram comigo, torcendo e acreditando no meu potencial.

Ao meu orientador Flaviano e à coorientadora Gevany: sou profundamente grata pela orientação e dedicação ao longo dessa jornada. Suas valiosas contribuições e o acompanhamento foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e para o sucesso deste projeto. A cada um de vocês, meu muito obrigado pela paciência, pelos ensinamentos e pelo apoio incondicional.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, muito obrigado por caminharem ao meu lado durante essa trajetória. O convívio com cada um de vocês, o apoio mútuo e as experiências compartilhadas contribuíram para tornar essa fase da minha vida ainda mais rica e significativa. Agradeço ao Sandro pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho, sua ajuda foi fundamental para êxito deste trabalho.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido, que foi essencial para a realização deste trabalho. Agradeço também à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por proporcionar uma infraestrutura acadêmica de excelência, e ao Laboratório de Pesquisa em Agroquímica (LPA) e o Laboratório de Química Instrumental (LQI) por oferecerem as condições necessárias para o desenvolvimento das pesquisas.

Por fim, agradeço a todos os amigos e familiares que, de uma forma ou de outra, estiveram ao meu lado, torcendo e oferecendo apoio durante essa trajetória. Meu sucesso também é de vocês.

“Consagre ao Senhor tudo que você faz, e os planos seus
serão bem-sucedidos.”

Provérbios 16:3.

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO DO HERBICIDA HALAUXIFEN-METIL EM ÁGUA

RESUMO

O halauxifen-metil, herbicida pré-emergente do grupo químico arilpicolinato e com modo de ação como mimetizador de auxina, foi autorizado no Brasil em 2021 para o combate de plantas daninhas em culturas de milho e soja. Em outros países como Canadá, Austrália e Estados Unidos, este herbicida também é empregado em culturas de vários cereais. Até o momento, são escassos estudos sobre metodologias para quantificação desse herbicida em água. O presente estudo teve como objetivo a otimização e validação da extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (ELL-PBT) para determinar o herbicida halauxifen-metil em água, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD). Inicialmente, uma solução padrão de trabalho a 4 mg L^{-1} foi preparada e analisada em espectrofotômetro de absorção na região ultravioleta e visível, para identificar os comprimentos de onda de máxima absorbância. Em seguida, foram avaliadas as condições cromatográficas, incluindo o comprimento de onda, fase móvel, fluxo da fase móvel, coluna cromatográfica, temperatura da coluna e volume de injeção. Os parâmetros da técnica ELL-PBT foram avaliados, considerando a composição da fase extratora, tempo de congelamento e força iônica. Em seguida, o método foi validado de acordo com o protocolo SANTE. A ELL-PBT foi aplicada para o monitoramento do processo de fotodegradação deste herbicida em meio aquoso, na presença e na ausência de luz solar. Os resultados apontaram que as condições cromatográficas ideais foram estabelecidas com comprimento de onda de 250 nm, fase móvel de acetonitrila e água na proporção de 80:20 v/v, coluna Kinetex, fluxo de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de 30°C e volume de injeção de $10 \text{ }\mu\text{L}$. As condições ótimas de extração incluíram $7,5 \text{ mL}$ de acetonitrila, $0,5 \text{ mL}$ de diclorometano, 90 min de congelamento e $0,2 \text{ g}$ de NaCl. A validação do método revelou que a ELL-PBT foi seletiva, com limite de quantificação de $0,448 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. A faixa de linearidade foi observada entre $0,448 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ e $120 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, com a precisão confirmada por meio do desvio padrão relativo entre 2,40% e 11,51%, e exatidão validada por meio de taxas de recuperação entre 86,60% e 110,91%. O efeito de matriz encontrado foi de -11,19%. O estudo de fotodegradação deste herbicida em meio aquoso revelou que o tempo de meia-vida, nestas condições foi de 6 dias e a degradação sob incidência de luz solar em aproximadamente 50 dias. O método proposto mostrou eficiência no monitoramento de halauxifen-metil, com valor obtido na quantificação abaixo do limite máximo de resíduo estabelecido para água em herbicidas da mesma classe. Além disso, o resultado obtido neste estudo foi similar ao método proposto na literatura para este herbicida nesta matriz.

Palavras-chave: CLAE-DAD; Monitoramento de Herbicida; Arilpicolinato; ELL-PBT; Recursos Hídricos.

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF LIQUID-LIQUID EXTRACTION WITH PARTITION AT LOW TEMPERATURE TO DETERMINE THE HERBICIDE HALAUXIFEN-METHYL IN WATER

ABSTRACT

The halauxifen-methyl, a pre-emergent herbicide of the arylpicolinate chemical group and with a mode of action as an auxin mimic, was authorized in Brazil in 2021 to combat weeds in corn and soybean crops. In other countries such as Canada, Australia, and the United States, this herbicide is also used in crops of various cereals. To date, there are few studies on methodologies for quantifying this herbicide in water. The present study aimed to optimize and validate liquid-liquid extraction with low-temperature partitioning (LLE-LTP) to determine the herbicide halauxifen-methyl in water, using high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). Initially, a standard working solution at 4 mg L^{-1} was prepared and analyzed in an absorption spectrophotometer in the ultraviolet and visible regions, to identify the wavelengths of maximum absorbance. Then, the chromatographic conditions were evaluated, including wavelength, mobile phase flow, chromatographic column, column temperature, and injection volume. The parameters of the LLE-LTP technique were adjusted, considering the composition of the extracting phase, freezing time and ionic strength. The method was then validated according to the SANTE protocol. In the photodegradation analysis, 4 mL of water collected from a river were added to each of the 48 vials, fortifying the water to a concentration of $120 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Part of the samples was exposed to sunlight, while another part was protected with aluminum foil and stored in a sealed box. The samples were subjected to extraction and chromatographic analysis every five days, with two analyses performed every ten days. The results indicated that the ideal chromatographic conditions were established with a wavelength of 250 nm, a mobile phase of acetonitrile and water in a ratio of 80:20 v/v, Kinetex column, flow rate of 0.2 mL min^{-1} , column temperature of $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and injection volume of $10 \text{ } \mu\text{L}$. The optimal extraction conditions included 7.5 mL of acetonitrile, 0.5 mL of dichloromethane, 90 min of freezing and 0.2 g of NaCl. Method validation revealed that LLE-LTP was selective, with a limit of quantification of $0.448 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. The linearity range was observed between $0.448 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ and $120 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, with precision confirmed by means of the relative standard deviation between 2.40% and 11.51%, and accuracy validated by means of recovery rates between 86.60% and 110.91%. The matrix effect found was -11.19%. The photodegradation study of this herbicide in aqueous medium revealed that the half-life under these conditions was 6 days and the degradation under sunlight in approximately 50 days. The proposed method showed efficiency in monitoring halauxifen-methyl, with a value obtained in the quantification below the maximum residue limit established for water in herbicides of the same class. Furthermore, the result obtained in this study was similar to the method proposed in the literature for this herbicide and this matrix.

Keywords: HPLC-DAD; Herbicide Monitoring; Arylpicolinate; LLE-LTP; Water Resources.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

3 REVISÃO DE LITERATURA	15
Figura 1 - Países consumidores de agrotóxicos no mundo	15
Figura 2 - Liberação de agrotóxico no Brasil série histórica de 2000 - 2023	16
Figura 3 - Agrotóxicos mais comercializados no Brasil	16
5 ARTIGO	30
Figura 1 - Estrutura química da molécula do halauxifen-metil.....	33
Figura 2 - Espectro de absorção na região do ultravioleta da solução padrão de halauxifen-metil em acetonitrila na concentração de 4 mg L ⁻¹	39
Figura 3 - Cromatogramas do extrato da matriz fortificado na concentração de 10 µg L ⁻¹ , usando os comprimentos de onda. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = 10 µL, fase móvel acetonitrila: água = 80:20, Temperatura = 30 °C, fluxo = 0,2 mL min ⁻¹ A) 211 nm e B) 250 nm ·	39
Figura 4 - Cromatogramas do extrato da matriz fortificado na concentração de 10 µg L ⁻¹ usando diferentes composições da fase móvel. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = 10 µL, temperatura = 30 °C, λ = 250 nm fluxo = 0,2 mL min ⁻¹ . A) 100% acetonitrila; B) 90% acetonitrila: 10% água; C) 80% acetonitrila: 20% água; D) 100% acetonitrila com AF; E) (90% acetonitrila: 10% água) com AF; F) (80% acetonitrila: 20% água) com AF; G) 100 % metanol; H) 90 % metanol: 10% água; I) 80 % metanol: 20 água; J) 100 % metanol com AF ; K) (90% metanol: 10% água) com AF; L) (80 % metanol: 20% água) com AF. (----) extrato branco (___) extrato fortificado. .	41
Figura 5 - Cromatogramas do extrato da matriz fortificado na concentração de 10 µg L ⁻¹ diferentes colunas cromatográficas. Condições cromatográficas: volume de injeção = 10 µL, temperatura = 30 °C, fase móvel acetonitrila: água = 80:20, λ = 250 nm, fluxo = 0,2 mL min ⁻¹ . A) Coluna Kinetex B) Coluna Poroshell C) Coluna Zorbax.....	44
Figura 6 - Cromatogramas do extrato da matriz fortificado na concentração de 10 µg L ⁻¹ obtidos sob os fluxos da fase móvel. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = 10 µL, temperatura = 30 °C, fase móvel acetonitrila: água = 80:20, λ = 250 nm. A) 0,2 mL min ⁻¹ B) 0,4 mL min ⁻¹ C) 0,6 mL min ⁻¹ D) 0,8 mL min ⁻¹ . (----) extrato branco (___) extrato fortificado	45
Figura 7 - Cromatogramas do extrato da matriz fortificado na concentração de 10 µg L ⁻¹ sob as temperaturas da coluna cromatográfica. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = 10 µL, fase móvel acetonitrila: água = 80:20, λ = 250 nm, fluxo = 0,2 mL min ⁻¹ . A) 30 °C B) 35 °C C) 40 °C. (----) extrato branco (___) extrato fortificado	46
Figura 8 - Cromatogramas do extrato da matriz fortificado na concentração de 10 µg L ⁻¹ obtidos com volume de injeção. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, fase móvel acetonitrila: água = 80:20, temperatura = 30 °C, λ = 250 nm, fluxo = 0,2 mL min ⁻¹ . A) 10 µL B) 20 µL. (----) extrato branco (___) extrato fortificado.	47
Figura 9 - Cromatogramas do extrato da matriz fortificado na concentração de 10 µg L ⁻¹ . Condições cromatográficas otimizadas: λ = 250 nm, coluna Kinetex, composição da fase móvel 80% acetonitrila e 20% água, fluxo da fase móvel 0,2 mL min ⁻¹ , temperatura 30 °C e volume de injeção = 10 µL.....	48
Figura 10 - Porcentagens de recuperação de halauxifen-metil em diferentes composições da fase extratoras. As barras com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.....	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 11 - Cromatogramas de extratos da matriz fortificados com halauxifen-metil na concentração $90 \mu\text{g L}^{-1}$, empregando as fases extratoras. A) 8 mL ACN; B) 8 mL ACN+AF; C) 6 mL ACN+2 mL AE; D) 7,5 mL ACN+0,5 mL DCM. (----) extrato branco (___) extrato fortificado. 49
- Figura 12 - Porcentagens de recuperação de halauxifen-metil usando diferentes tempos de congelamento. As barras com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. 50
- Figura 13 - Cromatograma do extrato da matriz fortificada com halauxifen-metil na concentração de $90 \mu\text{g L}^{-1}$, empregando os tempos de congelamento. A) 60 min B) 90 min C) 120 min. (----) extrato branco (___) extrato fortificado. 51
- Figura 14 - Porcentagens de recuperação de halauxifen metil usando diferentes quantidades de NaCl. As barras com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. 52
- Figura 15 - Cromatograma do extrato da matriz fortificada com halauxifen-metil na concentração de $90 \mu\text{g L}^{-1}$, empregando quantidades diferentes de NaCl A) 0 g B) 0,05 g C) 0,1 g D) 0,2 g. (----) extrato branco (___) extrato fortificado. 53
- Figura 16 - Cromatogramas do extrato da matriz isento de halauxifen-metil (extrato branco) e do extrato da matriz fortificada com halauxifen metil a $90 \mu\text{g L}^{-1}$. (----) extrato não fortificado (___) extrato fortificado. 54
- Figura 17 - Gráficos obtidos no estudo da linearidade da ELL-PBT. (A) Curvas analíticas de halauxifen-metil em solvente e extratos da matriz. (B) Resíduos da regressão linear após a exclusão dos *outliers* (teste de Jackknife). (C) Probabilidade normal dos resíduos de regressão para o halauxifen metil (D) Autocorrelação dos resíduos de regressão para o halauxifen-metil ei: resíduo; R^2 : coeficiente de determinação; R: coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner; d: Estatísticas de Durbin-Watson. 57
- Figura 18 - Gráfico das concentrações obtidas nas análises realizadas em diferentes dias de solução de halauxifen-metil a $120 \mu\text{g L}^{-1}$ com (A) presença de luz solar e (B) ausência de luz solar. 59

LISTA DE TABELAS

3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
Tabela 1 - Classificação ambiental de agrotóxico de acordo com a toxicidade.....	17
Tabela 2 - Características físico-químicas do halauxifen-metil.	18
Tabela 3 - Classificação do herbicida quanto ao modo de ação na planta	19
Tabela 4 - Subdivisão do Grupo O mimetizador de auxina	20
5 ARTIGO	30
Tabela 1 - Parâmetros avaliados na otimização das condições cromatográficas.	35
Tabela 2 - Parâmetros avaliados de forma univariada da ELL-PBT de halauxifen-metil em água	36
Tabela 3 - Resultados da validação do método otimizado para determinação de halauxifen-metil em amostras de água.....	55
Tabela 4 - Comparação do LMR estabelecidos entre países para o herbicida halauxifen-metil em produtos de origem vegetal.....	56
Tabela 5 - Comparação entre o método validado adotado neste estudo e na literatura ´para determinação do halauxifen-metil em amostras de água	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Agrotóxico no Brasil e no mundo.....	15
3.2 Impactos ao meio ambiente pelo uso de agrotóxico	17
3.3 Herbicida Halauxifen-metil.....	18
3.4 Técnicas de extração para determinação do halauxifen-metil	21
3.4.1 Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura.....	22
3.5 Análise cromatográfica.....	23
4 REFERÊNCIAS	24
5 ARTIGO	30
5.1 Otimização e validação da extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura para determinação do herbicida halauxifen-metil em água	30
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A população mundial atualmente é de aproximadamente 9,7 bilhões de pessoas, para 2050 a estimativa é que haja um aumento de 2 bilhões de pessoas (ONU, 2022). Aliada a este cenário mundial de crescimento populacional e com intuito de manter a produção estabilizada de alimentos, os agrotóxicos se tornam fundamentais na agricultura moderna. Neste sentido, em específico os herbicidas contribuem, para o aumento da produção de alimentos agrícolas, reduzindo a competição de plantas daninhas. Apesar de ser utilizado neste controle, a aplicação desses herbicidas apresenta risco de contaminação através da deriva desses resíduos via pulverização, escoamento, derramamento, lixiviação e descarte inadequado (DAS *et al.*, 2021).

Neste cenário, em 2021, foi autorizado no Brasil o halauxifen-metil, um herbicida pertencente ao grupo arilpicolinato, para o controle de plantas daninhas em culturas de soja e milho (ANVISA, 2021). Em outros países, este herbicida também foi liberado para culturas do trigo, cevada e centeio (APMVA, 2015; HEALTH CANADÁ, 2014). Quanto à classificação de periculosidade ambiental, este composto foi classificado em nível III, indicando ser moderadamente tóxico ao meio ambiente (ANVISA, 2021).

Devido a sua recente liberação, os órgãos de monitoramento brasileiro não disponibilizaram métodos de extração validados para quantificação desse herbicida em água. Entretanto, entre os métodos atualmente utilizados para determinação de agrotóxicos em matrizes ambientais e alimentares, destacam-se o QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), a extração em fase sólida (EFS), a extração sólido-líquido com purificação a baixa temperatura (ESL-PBT) e a extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (ELL-PBT). Esses métodos têm se mostrado alternativas promissoras na extração de agrotóxicos, devido à sua eficiência, menor consumo de solventes, versatilidade na extração de diferentes analitos, e elevada taxa da recuperação (RODRIGUES *et al.*, 2021; AMBROSIO *et al.*, 2022).

Embora o halauxifen-metil tenha sido quantificado pela técnica QuEChERS em trigo, palha de trigo e solo (ZHAO *et al.*, 2015) e extração em fase sólida (EFS) para quantificação deste herbicida em água (USEPA, 2013), não há métodos validados para extração e monitoramento deste herbicida em nenhuma matriz utilizando a ELL-PBT.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi otimizar e validar a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para determinação do herbicida halauxifen-metil em água empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) para detecção e quantificação do composto e analisar a fotodegradação deste composto em água.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar e validar a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para determinação do herbicida halauxifen-metil em água empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

2.2 Objetivos específicos

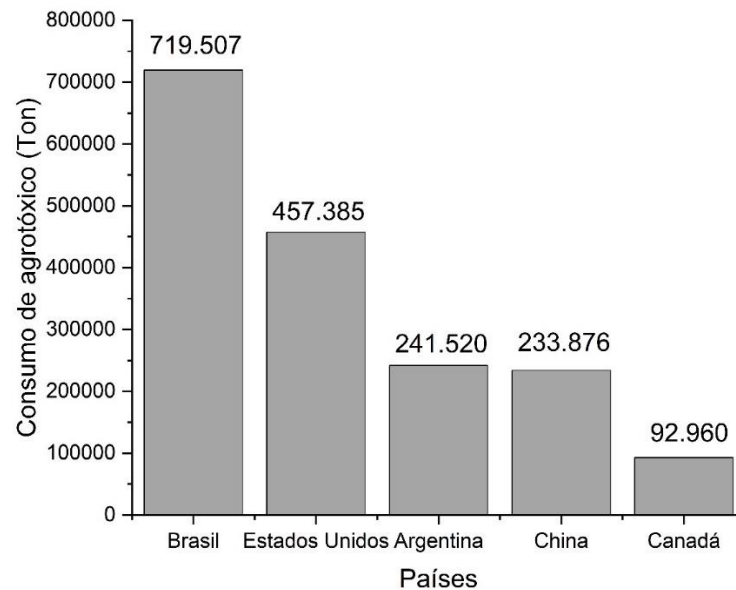
- Otimizar as condições cromatográficas;
- Otimizar as condições de extração empregando a ELL-PBT;
- Validar a ELL-PBT para halauxifen-metil em água;
- Avaliar a fotodegradação do halauxifen-metil em água.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agrotóxico no Brasil e no mundo

O Brasil tem se destacado como o maior consumidor de agrotóxicos no mundo, impulsionado principalmente por seu amplo setor agrícola. Outros grandes consumidores de agrotóxicos incluem os Estados Unidos, China, Argentina e Canadá (FAO, 2021) (Figura 1).

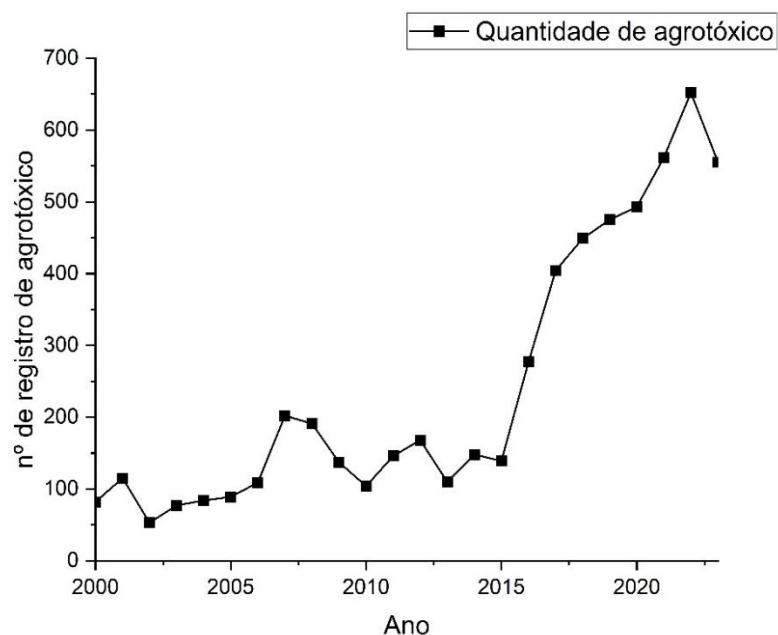
Figura 1. Países consumidores de agrotóxicos no mundo.



Fonte: Adaptado FAO (2021).

Nos últimos anos, o Brasil aprovou um número recorde de agrotóxicos, refletindo sua importância como um dos maiores exportadores agrícolas do mundo. Desde 2000, o número de registros de novos produtos cresceu gradualmente, alcançando o ápice em 2022, com 652 liberações, o maior valor da série histórica. Em 2023, esse número reduziu para 555 agrotóxicos autorizados conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2. Liberação de agrotóxico no Brasil série histórica de 2000- 2023.

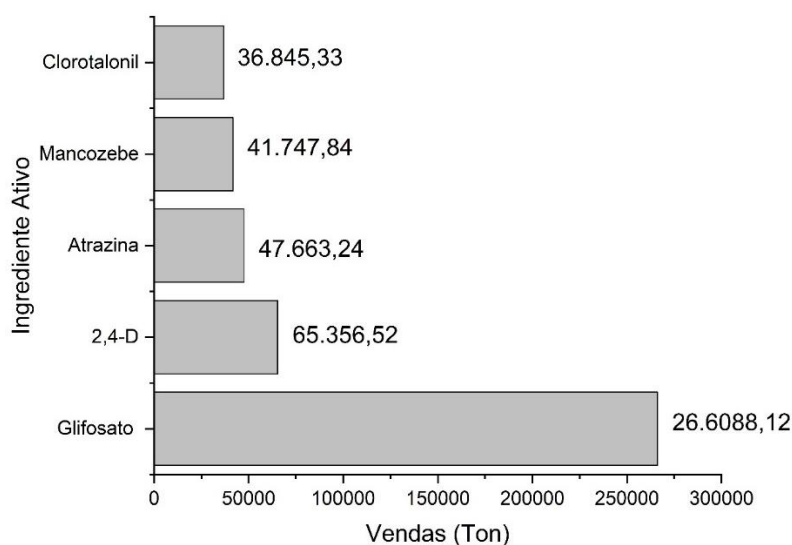


Fonte: Adaptado MAPA (2023).

Os agrotóxicos são divididos em categorias de acordo com seu uso e ação específica: herbicidas (controlam plantas daninhas), inseticidas (combatem insetos que podem atacar as culturas), fungicidas (controlam fungos e doenças fúngicas nas plantas), nematicidas (agem no controle de nematoides), acaricidas (utilizados para controlar ácaros) e rodenticidas (combatem roedores) (SHARMA *et al.*, 2019; AVRAM *et al.*, 2014).

Entre os agrotóxicos mais vendidos no Brasil, os herbicidas Glifosato, 2,4-D, e Atrazina destacam-se por seu uso extensivo no controle de plantas invasoras conforme a Figura 3.

Figura 3. Agrotóxicos mais comercializados no Brasil.



Fonte: Adaptado IBAMA, 2022.

Os agrotóxicos também são classificados de acordo com sua periculosidade ambiental, sendo identificados por uma faixa de cor que indica o nível de risco. Essa classificação segue critérios de toxicidade tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação ambiental de agrotóxico de acordo com a toxicidade

Classe	Descrição	Faixa de cor
I	Produto Extremamente Tóxico	
II	Produto Altamente Tóxico	
III	Produto Moderadamente Tóxico	
IV	Produto Pouco Tóxico	
V	Produto Improvável de causar dano agudo	

Fonte: Adaptado ANVISA, 2019.

Com base nas vendas de agrotóxicos no Brasil, a distribuição por classe de toxicidade em 2023 foi a seguinte: Classe I: 23.499,29 toneladas, Classe II: 311.926,76 toneladas, Classe III: 382.726,14 toneladas, Classe IV: 10.972,43 toneladas. Esses dados mostram que a maioria dos produtos comercializados pertence às Classes II e III, o que reflete uma tendência de uso de produtos com toxicidade moderada a alta no mercado agrícola (MAPA, 2022).

3.2 Impactos ao meio ambiente pelo uso de agrotóxico

A contaminação dos recursos hídricos com agrotóxico pode ocorrer por meio do escoamento de áreas agrícolas, descarte inadequado de resíduos ou derramamentos acidentais, representando uma ameaça à vida aquática e às fontes de água potável (MATEO-SAGASTA *et al.*, 2017).

A contaminação dos recursos hídricos na região Sul do Brasil foi identificada através de análise cromatográfica de 18 princípios ativos, sendo o inseticida imidacloprido o de maior incidência e concentração, seguido pelos herbicidas clomazone e quincloraque (DE OLIVEIRA LUCAS *et al.*, 2020).

Os agrotóxicos podem ser degradados através da hidrólise, fotólise e biodegradação (KATAGI, 2018). Os fatores que afetam a degradação dos agrotóxicos incluem a atuação de microrganismos no solo, água e ar, os quais desempenham um papel essencial nesse processo. Além disso, a umidade, a temperatura e as propriedades do solo, como pH, teor de matéria orgânica e níveis de umidade, influenciam diretamente a taxa de degradação dos pesticidas (PANDA *et al.*, 2018).

As propriedades como solubilidade em água e pressão de vapor são fatores cruciais na avaliação do impacto ambiental dos produtos de transformação de pesticidas (BOUAKKADIA *et al.*, 2021). Essas propriedades físico-químicas influenciam significativamente a distribuição e o destino dos agrotóxicos no ambiente. Agrotóxicos com alta solubilidade em água têm maior propensão a lixiviar para águas subterrâneas, representando riscos à qualidade da água (KIEFER *et al.*, 2019). Em contrapartida, pesticidas com baixa pressão de vapor tendem a volatilizar menos para a atmosfera, o que reduz o potencial de transporte a longas distâncias e a poluição atmosférica (HARNLY *et al.*,

2009).

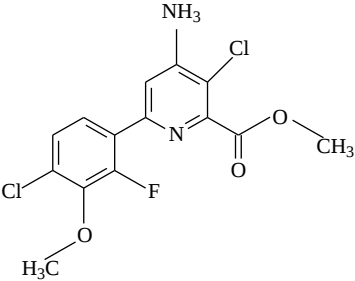
Agrotóxicos altamente solúveis e voláteis tendem a se difundir e dispersar mais facilmente em corpos d'água e na atmosfera, causando perdas não intencionais e ampla disseminação no ambiente (ARTUSIO *et al.*, 2021).

Por isso desenvolver metodologias de extração para quantificação de agrotóxicos em matrizes ambientais e alimentares é importante para monitoramento e fiscalização dos órgãos competentes.

3.3 Herbicida Halauxifen-metil

Desenvolvido pela empresa Corteva Agriscience, o halauxifen-metil é um herbicida pré emergente, autorizado para combater plantas daninhas em culturas agrícolas de milho e soja (ANVISA, 2021), trigo, cevada, centeio e tritcale (HEALTH CANADÁ, 2014). Na antiga classificação da HRAC (*Herbicide Resistance Action Committee*) o halauxifen-metil pertencia ao subgrupo ácido piridinocarboxílico, e atualmente está inserido ao grupo químico arilpicolinato, possui alta solubilidade em água, baixa volatilidade, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Características físico-química do halauxifen-metil.

Parâmetros	Descrição
CAS	943831-98-9
Estrutura química	
Grupo químico	ácido arilpicolinato
Nome químico	methyl 4-amino-3-chloro-6-(4-chloro-2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridine-2-carboxylate
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ FN ₂ O ₃
Massa molecular	345,16 g mol ⁻¹
Pressão de vapor 25 °C	1,1 x10 ⁻¹⁰ mm Hg
Solubilidade em água	1,66; 1,67 e 1,69 mg L ⁻¹ 20 °C para pH 5, 7,9;
Constante Henry	1,23 x10 ⁻⁶ Pa m ³ mol ⁻¹ para pH 5 1,22 x 10 ⁻⁶ Pa m ³ mol ⁻¹ para pH 7 1,20 x 10 ⁻⁶ Pa m ³ mol ⁻¹ para pH 9
Log KoW	3,75; 3,76 e 3,92 para pH for 5, 7, 9
pKa	2,8

Kow: Coeficiente de partição octanol/água; pKa: constante de dissociação ácida.

Fonte: APVMA, 2014.

Este herbicida possui modo de ação de mimetizadores de auxinas. Os herbicidas mimetizadores de auxinas pertencem ao grupo “O” pela classificação da *Herbicide Resistance Action Committee (HRAC)*, conforme descrito na Tabela 3. Os mimetizadores de auxinas atuam no metabolismo da planta, se assemelhando ao hormônio natural denominado ácido indol-acético (AIA). Ao ser utilizado como herbicida, o halauxifen-metil provoca em plantas suscetíveis sintomas semelhantes aos de outros herbicidas auxínicos, como epinastia, deformações, necrose e, eventualmente, a morte da planta (MCCAULEY *et al.*, 2018).

Tabela 3. Classificação de herbicidas quanto ao modo de ação na planta

HRAC	Grupo HRAC	Modo de ação
1	A	Inibição da Acetil CoA Carboxilase (ACCase)
2	B	Inibição da Acetolactato Sintase (ALS)
3	K1	Inibição da montagem de microtúbulos
4	O	Mimetizador de auxina
5	C1,2	Inibição da Fotossíntese em PS II - Serina D1 264 ligantes (e outros não-histidina 215 ligantes)
6	C3	Inibição da Fotossíntese em PS II – D1 Aglutinantes de histidina 215
9	G	Inibição do Fosfato de Shiquimato de Enolpiruvil Sintase (EPSPS)
10	H	Inibição da Glutamina Sintetase (GS)
12	F1	Inibição da Fitoeno Dessaturase (PDS)
13	F4	Inibição de Fosfato de Desoxi-D-Xilulose Sintase (DXPS)
14	E	Inibição da Protoporfirinogênio Oxidase (PPO)
15	K3	Inibição de ácidos graxos de cadeia muito longa Síntese (VLCFA)
18	I	Inibição da Diidropteroato Sintase (DHPS)
19	P	Inibidores do transporte de auxina
22	D	PS I Desvio de elétrons
23	K2	Inibição da organização dos microtúbulos
24	M	Desacopladores
27	F2	Inibição do piruvato de hidroxifenil Dioxigenase (HPPD)
28	None	Inibição da Diidroorotato Desidrogenase (DHODH)
29	L	Inibição da síntese de celulose

30	Q	Inibição da tioesterase de ácidos graxos (FAT)
31	R	Inibição da Proteína Serina Treonina Fosfatase (STPP)
32	S	Inibição da Solanesil Difosfato Sintase (SDPS)
33	T	Inibição do Homogentizado Solanesiltransferase (HST)
Ø	Z	Modo de ação desconhecido

Fonte: Adaptado HRAC, 2024.

O modo de ação do halauxifen-metil nas plantas ocorre na interrupção da homeostase do ácido indol-3-acético (AIA) desregulando o equilíbrio hormonal das plantas, resultando em efeitos profundos em processos fisiológicos. A superprodução de etileno e ácido abscísico (ABA) pode, de fato, ser causada pela superexpressão dos genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS) e 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase (NCED), responsáveis pela biossíntese de etileno e ABA, ocasionando a senescência e a morte da planta (XU *et al.*, 2022).

O grupo “O” possui uma divisão de acordo com o grupo químico de cada herbicida (Tabela 4). A ação de controle das plantas daninhas pelas auxinas sintéticas ocorre devido ao aumento da concentração dessas substâncias que se tornam fitotóxica para a planta. No entanto, a plantas não dispõem de mecanismos eficientes para regular de maneira rápida as auxinas sintéticas em comparação com as auxinas naturais. Com a elevada concentração desse hormônio ocorre uma reação generalizada que estimula as auxinas naturais, ocasionando lesões e, conseqüentemente, a morte da planta (GROSSMANIN, 2010; QUARESHY *et al.*, 2018).

Tabela 4. Subdivisão do Grupo O mimetizador de auxina

Grupo Químico	Herbicidas
Fenoxicarboxilatos	Clomeprop, Dichlorprop, 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético), MCPA (ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético), Mecoprop (ácido (RS)-2-(4-cloro-2-metilfenoxi)propanoico) , 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), 2,4-DB (ácido (2,4-diclorofenoxi)butírico) e MCPB (Ácido 4-(4-cloro-2-metilfenoxi)butanoico).
6-Cloropicolinatos	Aminipyralid, Clopyralid e Picloram.
6-Arilpicolinatos	Florpyrauxifen e Halauxifen
Piridiloxicarboxilatos	Fluroxypyr e Triclopyr
Benzoatos	Cholamben e Dicamba
Quinolinacarboxilatos	Quinmerac e Quinclorac

Fonte: Adaptado HRAC, 2024.

A ANVISA estabeleceu parâmetros de segurança para o uso de agrotóxicos, como a Ingestão Diária Aceitável (IDA), que é a quantidade máxima de uma substância que pode ser consumida

diariamente, sem representar risco à saúde. Para o herbicida estudado, a IDA é de $0,019 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corporal por dia. Além disso, o Nível Aceitável de Exposição Ocupacional (NAEO), que determina a quantidade segura à qual trabalhadores podem ser expostos sem efeitos adversos, é de $0,0578 \text{ mg kg}^{-1}$ por dia. A Dose de Referência Aguda (DRfA), que mede o risco de exposição aguda, não foi estabelecida para esse produto específico (ANVISA, 2021).

Em termos de classificação toxicológica, o herbicida se enquadra nas seguintes faixas de toxicidade: Toxicidade aguda oral e cutânea: $> 500 \text{ mg kg}^{-1}$, o que significa que doses acima desse valor podem causar efeitos tóxicos graves; Toxicidade aguda inalatória: $> 5,39 \text{ mg L}^{-1}$ (ANVISA, 2021).

Além disso, o herbicida é classificado como suspeito de provocar câncer na categoria de carcinogenicidade. Essa classificação implica que há evidências sugestivas, embora não conclusivas, de que o produto pode estar relacionado ao desenvolvimento de câncer em humanos (ANVISA, 2021).

3.4 Técnicas de extração para determinação do halauxifen-metil

Dentre as técnicas de extração que têm sido empregues para quantificação de herbicida em matrizes ambientais, o QuEChERS foi validada para o monitoramento de resíduos de halauxifen-metil em solo, trigo e palha de trigo (ZHAO *et al.*, 2015) e a extração em fase sólida (EFS) foi empregada para a determinação de halauxifen-metil em água (USEPA, 2013).

A técnica QuEChERS que em inglês significa (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) que significa rápida, simples, econômica, eficaz, robusta e segura, tem sido amplamente aplicada na análise de agrotóxicos, poluentes orgânicos persistentes e compostos farmacêuticos em matrizes complexas, como solo, água e alimentos. Devido à sua simplicidade, baixo custo, menor número de etapas, alta eficiência e seletividade, a técnica permite a utilização de menores quantidades de amostras e solventes orgânicos, além de realizar extrações simultâneas e a limpeza dos extratos ao mesmo tempo, otimizando o processo analítico (FREITAS *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2018).

Na sua forma tradicional, essa técnica consiste em adicionar em um tubo de centrífuga, 10 g de amostra, 10 mL de acetonitrila ou outro solvente extrator. O sistema é homogeneizado em vórtex e, em seguida, adicionam-se 1 g de NaCl e 4 g de MgSO_4 , resultando no efeito *salting out*. Esse efeito melhora a recuperação dos analitos ao diminuir a solubilidade dos mesmos na fase aquosa e reduzir o volume desta fase, facilitando a extração de compostos apolares. Após a adição de um padrão interno, realiza-se a etapa de *Clean-up* por extração em fase sólida dispersiva (D-SPE). Nessa etapa, uma mistura de amina primária e secundária (do inglês *Primary Secondary Amine - PSA*) e MgSO_4 (25 mg:150 mg por mL de extrato) é adicionada, seguida de centrifugação, o que ajuda a remover coextrativos polares (PRESTES *et al.*, 2009).

A EFS (extração em fase sólida) é uma técnica de preparação de amostras utilizada para isolar e concentrar analitos de interesse em matrizes. A técnica que consiste na interação entre os analitos da amostra líquida e uma fase sólida (sorvente) contida em um cartucho. Uma amostra líquida passa pela fase sólida, onde os analitos de interesse são retidos por interações físicas ou químicas (como adsorção, troca iônica ou partição). Após a retenção dos analitos, ocorre uma etapa

de eluição com um solvente para que eles sejam liberados da fase sólida e possam ser analisados por técnicas cromatográficas (NAKHJAVAN, BLAND e KHOSRAVIFARD, 2021; SALAMAT *et al.*, 2024).

Apesar do baixo consumo de solventes, fácil manuseio e alto fator de concentração (SOUSA *et al.*, 2021; YEGANEH *et al.*, 2023), a técnica apresenta como desvantagem o elevado custo dos cartuchos utilizados.

3.4.1 Extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura

A técnica de extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (ELL-PBT) foi inicialmente utilizada na década de 1960 para a extração e quantificação de dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) em extratos de plantas (ANGLIN; MCKINLEY, 1960). A partir de então, essa técnica tem sido amplamente empregada para a extração de diferentes compostos químicos em matrizes ambientais e alimentares. Entre os compostos frequentemente analisados, destacam-se organoclorados, organofosforados, piretroides, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), carbamatos e 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).

O princípio fundamental dessa técnica envolve a separação de analitos com base na diferença de solubilidade entre duas fases líquidas imiscíveis, geralmente água e um solvente orgânico. Na ELL-PBT, a amostra é misturada com um solvente orgânico. Após a mistura da amostra com o solvente orgânico, o sistema é congelado a uma temperatura – 20 °C, por 1 hora, formando uma fase aquosa congelada, enquanto a fase orgânica permanece líquida. O analito de alvo migra para a fase orgânica, que é separada da fase sólida (AMBROSIO *et al.*, 2022; FREITAS, FAÊDA *et al.*, 2023; LOPES; SILVÉRIO; SICUPIRA, 2023; SILVA *et al.*, 2023; VIEIRA *et al.*, 2022).

A ELL-PBT tem demonstrado eficiência na extração de analitos com menos interferentes, pois a maioria dos contaminantes fica retida na fase aquosa congelada (FREITAS *et al.*, 2021; LOPES; SILVÉRIO; SICUPIRA, 2023; MORAIS *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2022). Trata-se de uma técnica versátil, amplamente utilizada em análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) quanto Cromatografia em fase Gasosa (CG) (VIEIRA *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2023). Além disso, é uma técnica simples, permite a realização de quantidade maior de extrações, utiliza menor número de etapas, amostra e solventes, utiliza solventes de baixa toxicidade (FREITAS *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2018).

No entanto, o uso dessa técnica para a determinação do herbicida ainda é limitado e, até o momento, não foram encontrados estudos que aplicassem a ELL-PBT para o halauxifen-metil em nenhuma matriz.

3.5 Análise cromatográfica

A análise cromatográfica é um método amplamente utilizado em diversas áreas científicas para separação, identificação e quantificação de componentes em misturas, como matrizes ambientais, alimentares, biológicas e farmacêuticas (SILVA; COLLINS, 2011).

A escolha do equipamento ideal para cada análise depende de vários parâmetros como a

presença ou ausência de grupos funcionais na estrutura da química da molécula, das propriedades físico químicas da molécula como a volatilidade, estabilidade térmica e solubilidade em água ou em solvente orgânico.

Por isso, para o herbicida halauxifen-metil que não é uma molécula volátil, mas é um composto estável nas condições ambientais e que apresenta grupos cromóforos em sua estrutura química, o mais adequado é a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência. (ZHAO *et al.*, 2015, USEPA, 2013).

4 REFERÊNCIAS

AMBROSIO, Isabela S. et al. Development and validation of a solid–liquid extraction with low-temperature partitioning method for the determination of fipronil in turtle eggshell. **Microchemical Journal**, v. 178, p. 107393, 2022.

ANDRADE, Valéria F. et al. Fast extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxin and polychlorinated dibenzofuran in sewage sludge and soil samples. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 4, p. 267-273, 2017.

ANGLIN, Constance; MCKINLEY, W. P. Insecticide residues, procedure for cleanup 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.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos>. Acesso em: 13 jun. 2024.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Monografia de agrotóxicos autorizadas H20 Halauxifeno-metil, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h-i/h20-halauxifeno-metil-a-partir-de-29-10.pdf/view>. Acesso em: 15 jun. 2024.

APVMA, (Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority). PUBLIC RELEASE SUMMARY on the Evaluation of the New Active Constituent Halauxifen-methyl in the Product GF-2685 Herbicide APVMA Product Number 65055. 2015. Disponível em: <https://www.apvma.gov.au/>. Acesso em 21 de Jul. 2024.

ARTUSIO, Fiora et al. Alginate nanohydrogels as a biocompatible platform for the controlled release of a hydrophilic herbicide. **Processes**, v. 9, n. 9, p. 1641, 2021.

AVRAM, Sorin et al. Quantitative estimation of pesticide-likeness for agrochemical discovery. **Journal of cheminformatics**, v. 6, p. 1-11, 2014.

BARBOSA, Érica Soares et al. Otimização e validação da extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura de HPAs em lodo de esgoto. **Química Nova**, v. 37, p. 404-410, 2014.

BOUAKKADIA, Amel et al. Use of GA-ANN and GA-SVM for a QSPR study on the aqueous solubility of pesticides. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 86, n. 7-8, p. 673-684, 2021.

COSTA, Luma Soares et al. Determining pyroxasulfone herbicide in honey samples using liquid-liquid extraction with low temperature purification (LLE-LTP). **Talanta**, v. 273, p. 125870, 2024.

DAS, Sushovan et al. Effect of Soil Type and Temperature on Persistence and Dissipation Kinetics of a New Readymix Formulation of Fomesafen+ Quizalofop-ethyl. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 107, p. 961-966, 2021.

DE FREITAS, Jéssika Faêda et al. Evaluation of imazalil dissipation/migration in postharvest papaya using low-temperature partition extraction and GC–MS analysis. **Food Chemistry**, v. 418, p. 135969, 2023.

DE FREITAS, Lucas Victor Pereira et al. Determination of DDT in honey samples by liquid–liquid extraction with low-temperature purification (LLE-LTP) combined to HPLC-DAD. **Analytical Methods**, v. 13, n. 16, p. 1955-1964, 2021.

DE OLIVEIRA LUCAS, Evandro et al. Contaminação dos recursos hídricos por agrotóxicos na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e242997128-e242997128, 2020.

DO REGO, Eliane Cristina Pires et al. The validation of a new high throughput method for determination of chloramphenicol in milk using liquid–liquid extraction with low temperature partitioning (LLE-LTP) and isotope-dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry (ID-LC-MS/MS). **Analytical Methods**, v. 7, n. 11, p. 4699-4707, 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization. Pesticide use. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/grapher/pesticide-usetonnes?tab=chart>> Acesso em: 18 Set. 2024.

FREITAS, Romenique da Silva de et al. 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, p. 238-243, 2014.

GOULART, Simone M. et al. Determination of carbamates in beverages by liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1154-1165, 2012.

HARNLY, Martha E. et al. Pesticides in dust from homes in an agricultural area. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 23, p. 8767-8774, 2009.

HEALTH CANADA. Proposed Registration Document PRD2014-12 – Halauxifen-methyl. Ottawa:

Health Canada Pest Management Regulatory Agency, 2014. 107. Disponível em: <https://publications.gc.ca/collections/collection_2014/sc-hc/H113-9-2014-12-eng.pdf> Acesso em: 15 Mai. 2024).

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 16 Set. 2024.

KATAGI, Toshiyuki. Direct photolysis mechanism of pesticides in water. **Journal of pesticide science**, v. 43, n. 2, p. 57-72, 2018.

KHAN, Bilal Ahmad et al. Pesticides: impacts on agriculture productivity, environment, and management strategies. In: **Emerging contaminants and plants: Interactions, adaptations and remediation technologies**. Cham: Springer International Publishing. p. 109-134, 2023.

KIEFER, Karin et al. New relevant pesticide transformation products in groundwater detected using target and suspect screening for agricultural and urban micropollutants with LC-HRMS. **Water Research**, v. 165, p. 114972, 2019.

LOPES, Junai C. S.; SICUPIRA, Lázaro C.; SILVÉRIO, Flaviano O. Extraction method for determining floryprauxifen-benzyl herbicide in soil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, n. 02, p. 302-308, 2023.

LUDWIG-MÜLLER, Jutta et al. Two auxinic herbicides affect brassica napus plant hormone levels and induce molecular changes in transcription. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1153, 2021.

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: 29 Out. 2024.

MATEO-SAGASTA, Javier et al. Water pollution from agriculture: a global review. Executive summary. 2017.

MCCAULEY, Cara L.; JOHNSON, William G.; YOUNG, Bryan G. Efficacy of halauxifen-methyl on glyphosate-resistant horseweed (*Erigeron canadensis*). **Weed Science**, v. 66, n. 6, p. 758-763, 2018.

MESQUITA, Tayane CR et al. 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.

MORAIS, Elisa Helena da Costa *et al.* Determination of thiamethoxam, triadimenol and deltamethrin in pineapple using SLE-LTP extraction and gas chromatography. **Food Control**, v. 42, p. 9–17, 2014.

NAKHJAVAN, Bahar; BLAND, Jason; KHOSRAVIFARD, Maryam. Optimization of a multiresidue analysis of 65 pesticides in surface water using solid-phase extraction by LC-MS/MS. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6627, 2021.

ONU (Organização Das Nações Unidas), 2022. Perspectiva Global Reportagens Humanas. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2022/06/1794212>. Acesso em: 5 ago. 2023.

PANDA, Jigisha; KANJILAL, Tiyaasha; DAS, Sumona. Optimized biodegradation of carcinogenic fungicide Carbendazim by *Bacillus licheniformis* JTC-3 from agro-effluent. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 45-57, 2018.

PINHO, Gevany Paulino de *et al.* Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, p. 909-913, 2010.

PINHO, Gevany Paulino *et al.* Pesticide determination in tomatoes by solid–liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food chemistry**, v. 121, n. 1, p. 251-256, 2010.

PRESTES, Osmar D. *et al.* 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, p. 1620-1634, 2009.

RIVERA-BECERRIL, Facundo *et al.* Impact of a pesticide cocktail (fenhexamid, folpel, deltamethrin) on the abundance of Glomeromycota in two agricultural soils. **Science of the Total Environment**, v. 577, p. 84-93, 2017.

RODRIGUES, Alessandra Aparecida Zinato *et al.* The efficacy of washing strategies in the elimination of fungicide residues and the alterations on the quality of bell peppers. **Food Research International**, v. 147, p. 110579, 2021.

RODRIGUES, Rogério P. *et al.* Otimização da extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de carbofurano em cucurbita pepo I (“abobrinha”) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 41, n. 2, p. 213-218, 2018.

SALAMAT, Qamar *et al.* Recent Advancement and Prospects of Novel Nanomaterial-Based Solid-Phase Extraction (SPE) Techniques. *Analytical Letters*, p. 1-41, 2024

SANTOS, Silas de Souza et al. Simultaneous determination of aldrin and mirex in honey by liquid–liquid extraction with low-temperature purification combined with GC–MS. **Food Analytical Methods**, v. 15, n. 10, p. 2744-2755, 2022.

SHARMA, Anket et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, p. 1-16, 2019.

SILVA, Carla Grazieli Azevedo da; COLLINS, Carol H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, p. 665-676, 2011.

SILVA, Gleison Luis O. et al. Optimization and Validation of the Miniaturized Solid-Liquid Extraction with Low Temperature Purification (SLE-LTP) Method for Determining Fluopyram in Sandy, Clayey and Medium-Textured Soil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, p. 582-589, 2023.

SILVEIRA, Taciana Maria et al. Study of analytical techniques to determine chlorpyrifos in the surface waterways of the rural zone of Ouro Branco, Brazil: a case study. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, p. 1-15, 2016.

SILVÉRIO, Flaviano Oliveira et al. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, p. 2052-2056, 2012.

SOUSA, Jonas et al. Pesticide residues in groundwater and surface water: Recent advances in solid-phase extraction and solid-phase microextraction sample preparation methods for multiclass analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 168, p. 106359, 2021.

USEPA. Pesticide Analytical Methods: ECM for Halauxifen-methyl & Degradates in Water - MRID 48557787. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-analytical-methods/ecm-halauxifen-methyl-degradates-water-mrid-48557787>. 2013. Acesso em: 19 ago. 2024.

VIEIRA, Luís H. S et al. Optimization and validation of LLE-LTP to determine florpyrauxifen-benzyl herbicide in water samples by HPLC-DAD. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 57, n. 9, p. 697-709, 2022.

WOODCOCK, Ben A. et al. Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. **Science**, v. 356, n. 6345, p. 1393-1395, 2017.

XU, Jiaqi et al. Mode of action of a novel synthetic auxin herbicide halauxifen-methyl. **Agronomy**, v. 12, n. 7, p. 1659, 2022.

YEGANEH, Mojtaba et al. A comprehensive systematic review and meta-analysis on the extraction of pesticide by various solid phase-based separation methods: a case study of malathion. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 103, n. 5, p. 1068-1085, 2023.

ZHAO, Huanhuan et al. Simultaneous determination of three herbicides in wheat, wheat straw, and soil using a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 7, p. 1164-1171, 2015.

5 ARTIGO

5.1 Otimização e validação da extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura para a determinação do herbicida halauxifen-metil em água

Este artigo foi elaborado conforme as normas do periódico "Journal of Environmental Science and Health, Part B".

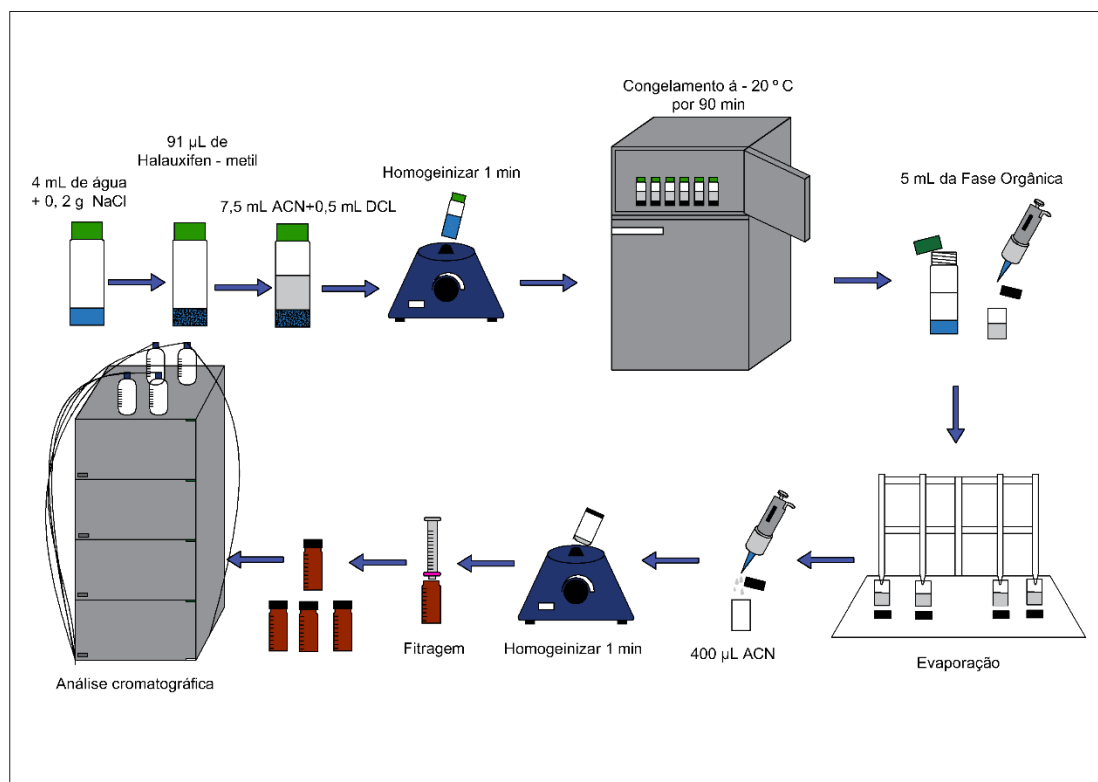
Otimização e Validação da Extração Líquido-Líquido com Partição a Baixa Temperatura para a Determinação do Herbicida Halauxifen-metil em Água

Brenda Maria Silva Santos,¹Sandro Braga Soares,¹ Gevany Paulino de Pinho¹ , Flaviano Oliveira Silvério^{1*}

¹Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, 39404-547, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

***Autor correspondente:** flavianosilverio@ufmg.br (F.O. Silvério), +55 38 2101 7770.

Resumo gráfico



RESUMO

Halauxifen-metil é um herbicida pré-emergente usado para controlar plantas daninhas em culturas de milho e soja. Este herbicida foi autorizado para comercialização no Brasil em 2021, no entanto, estudos envolvendo o desenvolvimento de métodos de extração para este herbicida em matrizes ambientais são raros, até o momento. Portanto, o presente estudo teve como objetivo otimizar e validar a extração líquido-líquido com partição de baixa temperatura (LLE-LTP) para determinar halauxifen-metil em água usando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). As condições cromatográficas ideais foram estabelecidas com comprimento de onda de 250 nm, fase móvel composta por acetonitrila e água na proporção de 80:20 v/v, coluna Kinetex, fluxo da fase móvel de 0,2 mL min⁻¹, temperatura de 30°C e volume de injeção de 10 µL. As condições ótimas de extração incluíram 7,5 mL de acetonitrila, 0,5 mL de diclorometano, 90 min de congelamento e adição de 0,2 g de NaCl. A validação do método indicou que a ELL-PBT foi seletiva, com limite de quantificação de 0,448 µg L⁻¹. A linearidade foi observada na faixa de 0,448 µg L⁻¹ a 120 µg L⁻¹, com precisão confirmada por desvio padrão relativo entre 2,40% e 11,51%, e exatidão validada por taxas de recuperação variando entre 86,60% e 110,91%. O efeito matriz encontrado foi de -11,19%. O estudo de fotodegradação deste herbicida em meio aquoso demonstrou tempo de meia vida de 6 dias e degradação sob incidência de luz solar em aproximadamente 50 dias. O método proposto mostrou-se eficiente para o monitoramento de halauxifen-metil em água, configurando-se como uma ferramenta viável para uso por órgãos oficiais de fiscalização. Embora não haja limite máximo de resíduos (LMR) específico para este herbicida, o valor obtido está em conformidade com os LMRs de herbicidas da mesma classe para essa matriz.

Palavras-chave: ELL-PBT, CLAE-DAD, arilpicolinatos, agrotóxicos, mimetizador de auxinas.

INTRODUÇÃO

O halauxifen-metil é um herbicida pré-emergente pertencente ao grupo químico arilpicolinatos.^[1] Este herbicida foi autorizado para comercialização no Brasil em 2021, para aplicação em culturas de soja e milho,^[2] e para cereais como trigo, centeio e cevada em outros países.^[3,4] A estrutura química deste composto é apresentada na Figura 1.

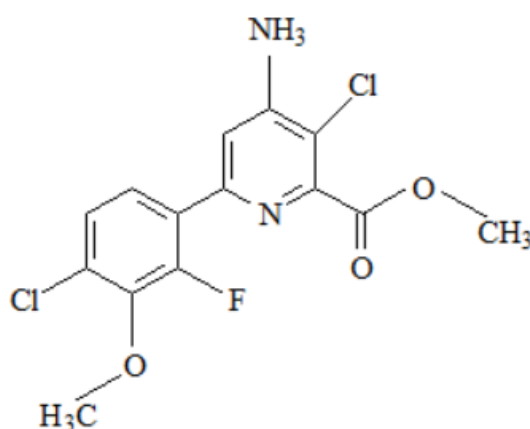


Figura 1. Estrutura química da molécula do halauxifen-metil.

Este herbicida foi classificado no nível III de periculosidade ambiental, sendo considerado medianamente tóxico ao meio ambiente e com potencial cancerígeno, podendo causar toxicidade por via oral, cutânea e inalatória.^[2] Além disso, o halauxifen-metil possui mecanismo de ação de mimetizador das auxinas, classificado como grupo O pelo Comitê de Ação para Resistência a Herbicidas.^[1,3] Os compostos pertencentes a este grupo, simulam a ação das auxinas, que são hormônios vegetais naturais, podendo interferir nos processos normais de crescimento das plantas alvo, causando crescimento desordenado, deformidades e, eventualmente, a morte da planta.^[5]

Apesar da autorização para seu uso em diversos países, as diretrizes e normativas para metodologias de extração e quantificação dos resíduos desse herbicida em água ainda são limitadas pelas agências regulamentadoras. Até o momento, a extração em fase sólida (EFS), seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (em inglês, *High Performance Liquid Chromatography to tandem Mass Spectrometry-HPLC-MS/MS*), foi utilizada para determinar o halauxifen-metil em água,^[6] enquanto o método QuEChERS, seguido de análise por HPLC-MS/MS, foi aplicado para a determinação do halauxifen-metil em solo, trigo e palha de trigo.^[7] No entanto, a técnica ELL-PBT seguida da análise em cromatografia líquida de alta eficiência

com detector de arranjo de iodos (CLAE-DAD), em inglês *High Performance Liquid Chromatography With Iodine Array Detector - HPLC-DAD*, ainda não foi validada para a determinação do halauxifen-metil.

Entre as técnicas atualmente empregadas, a ELL-PBT tem se destacado pela simplicidade na execução da técnica e pelas elevadas taxas de recuperação dos analitos alvo. Além disso, a ELL-PBT facilita a automação do processo, minimizando a intervenção do analista no preparo das amostras, o que aumenta a consistência e segurança das análises.^[8]

De modo geral, os métodos convencionais de preparação de amostras, como a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS), utilizam elevados volumes de solventes orgânicos que podem ser prejudiciais tanto à saúde quanto ao meio ambiente.^[9,10] A ELL-PBT utiliza volumes significativamente menores de solventes, o que não só reduz os custos operacionais, mas também minimiza os impactos ambientais associados ao descarte de solventes tóxicos.^[11,8]

Diante do exposto, objetivou-se nesta pesquisa otimizar e validar a ELL-PBT para determinação do herbicida halauxifen-metil em água utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjos de diodo (CLAE-DAD).

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e Solução

O padrão de halauxifen metil com 99,9% pureza (m/m) foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). A acetonitrila (ACN) grau HPLC foi adquirida da J.T. Baker (Phillipsburg, EUA). Os solventes PA, o acetato de etila (AE), diclorometano (DCM), foram adquiridos da Dinâmica (Diadema, Brasil), acetonitrila (ACN) da Êxodo Científica (Sumaré, Brasil), ácido fórmico (FA) da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). O cloreto de sódio foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os solventes foram filtrados em membrana de PTFE de 0,22 µm de poro que foi adquirida da Filtrilo (Colombo, Brasil). Foram preparadas soluções de trabalho na concentração de 4 mg L⁻¹, em acetonitrila grau HPLC, e armazenadas em frasco âmbar a - 20 °C.

Equipamentos

Neste estudo foram utilizados os seguintes equipamentos: vórtex da Scilogex (Rocky Hill, EUA), bomba de vácuo da Prismatec (Itu, Brasil), balança analítica da Shimadzu (Barueri, Brasil), micropipetas Labmate Pro 20 – 200 ± 0,1 µL, 100 – 1000 ± 1 µL e 1000 – 5000 ± 5 µL da HTL

(Warszawa, Polônia), geladeira Electrolux DC34 (Curitiba, Brasil), espectrofotômetro Cary 50 da Agilent Technologies (St. Clair, EUA) e o equipamento de cromatografia líquida de alta performance com detecção por arranjo de díodos HPLC–DAD, modelo 1290, Agilent Technologies (St. Clair, EUA).

Análise cromatográficas

A solução de trabalho na concentração de 4 mg L⁻¹ foi submetida a análise no espectrofotômetro para determinação dos comprimentos de onda de máxima absorbância. As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta performance com detecção por arranjo de díodos. Na etapa de otimização das condições cromatografias foram avaliados o comprimento de onda, a composição da fase móvel no modo isocrático, três colunas cromatográficas, o fluxo da fase móvel, a temperatura de análise e o volume de injeção (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros avaliados na otimização das condições cromatográficas

Parâmetros estudados	Níveis avaliados
Comprimento de onda	211 nm 250 nm
Composição da fase móvel no modo isocrático	ACN: água* (ACN: água) com 0,1% (v/v) de ácido fórmico* Metanol: água* (Metanol: água) com 0,1% (v/v) de ácido fórmico*
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) Zorbax Eclipse C18 column (50 mm x 2,1mm, 1,8 µm, Agilent)
Fluxo da fase móvel	0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mL min ⁻¹
Temperatura da coluna	30; 35 e 40 °C
Volume de injeção	10 e 20 µL

*100:00; 90:10; 80:20 (v/v).

Otimização da ELL-PBT

A ELL-PBT consiste em adicionar em um frasco de vidro de 22 mL, 4 mL de água ultrapura e 8 mL da fase extratora. Em seguida, fortifica-se com 91 µL da solução de trabalho de halauxifen-metil e homogeniza-se por 1 min, em vórtex. O sistema é submetido ao congelamento a -20 °C por 60 min. Posteriormente, retiram-se 5 mL do sobrenadante, que são completamente evaporados, e ressuspendido em 400 µL da fase móvel selecionada. A mistura é novamente homogeneizada, em vórtex, por 1 min, filtrada em membrana de PTFE com poros de 0,22 µm e, então, submetida à análise cromatográfica.

Em seguida, as condições de extração foram otimizadas por meio da avaliação de quatro tipos de fases extratoras, três tempos de congelamento e pela adição de sal inorgânico como pode ser observado na Tabela 2. Para a análise estatística, foram utilizados o software R Studio e o teste de médias de Tukey ao nível de 5% de significância, e os gráficos e cromatogramas foram plotados no programa OriginPro versão 2024.

Tabela 2. Parâmetros avaliados de forma univariada da ELL-PBT de halauxifen-metil em água

Parâmetros estudados	Níveis avaliados
Composição de Fase extratora	8 mL ACN
	8 mL ACN + AF
	6 mL ACN + 2 mL AE
	7,5 mL ACN + 0,5 mL DCM
Tempo de congelamento	60, 90 e 120 min
Adição de NaCl	0; 0,05; 0,1 e 0,2 g

ACN = acetonitrila; AF = 0,1% (v/v) de ácido fórmico; AE = acetado de etila; DCM = Diclorometano.

VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método foi validado utilizando o protocolo de validação SANTE,^[12] no qual foram avaliados os parâmetros de seletividade, limite de quantificação, linearidade, exatidão, precisão e efeito de matriz.

Seletividade

No parâmetro de seletividade, comparou-se o cromatograma do extrato da matriz fortificada com halauxifen-metil com o cromatograma do extrato da matriz isenta do analito (extrato branco). O método pode ser considerado seletivo quando o cromatograma do extrato branco não apresentar

sinais de interferentes, no tempo de retenção do analito alvo.

Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi determinado a partir de experimentos de extração com amostras de água fortificadas com diferentes concentrações de halauxifen-metil. O LQ foi definido como a menor concentração que pode ser quantificada com exatidão e precisão, e que apresentar área cromatográfica dez vezes maior que a do ruído da linha de base do cromatograma do extrato branco, no mesmo tempo de retenção do halauxifen-metil.

Linearidade

A faixa linear foi determinada construindo uma curva de calibração analítica, com cinco pontos equidistantes a partir do LQ, em que as áreas cromatográficas foram obtidas a partir da análise dos extratos da matriz fortificados com halauxifen-metil nas concentrações de 0,448, 30, 60, 90 e 120 $\mu\text{g L}^{-1}$, com três repetições independentes para cada nível. Os parâmetros da regressão linear foram estimados utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Os valores extremos, identificados pelo teste Jackknife, foram excluídos quando necessário, respeitando o limite de 22,2 % dos dados. Os testes de Ryan-Joiner, Brown e Forsythe, e Durbin e Watson foram avaliados para confirmar a homocedasticidade, independência e normalidade dos resíduos da regressão, respectivamente. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a significância de 0,05 % da regressão e do desvio de linearidade.^[13]

Exatidão e Precisão

A exatidão foi avaliada através de experimentos de fortificação e recuperação em três concentrações: 0,448, 90,0 e 120,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, com três repetições independentes para cada nível. O método poderá ser considerado exato se a recuperação do analito estiver na faixa de 70% a 120%.

A precisão foi verificada adicionalmente utilizando a concentração de 90,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ com sete repetições. O método poderá ser considerado preciso se o desvio padrão relativo (DPR) for inferior ou igual a 20%.

Efeito Matriz

Para a determinação do efeito de matriz foram construídas duas curvas de calibração com o

analito alvo, sendo que uma das curvas foi obtida utilizando a solução de halauxifen-metil em solvente (ACN) e a outra curva foi obtida utilizando a solução de halauxifen-metil preparada em extrato da matriz. Ambas as curvas de calibração apresentaram cinco concentrações equidistantes, 0,448, 30, 60, 90 e 120 $\mu\text{g L}^{-1}$, com três repetições independentes para cada nível. Os parâmetros de regressão linear foram estimados utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Para determinar o efeito de matriz foi empregada a equação 1:

Equação 1:

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

Onde:

α_{matriz} = é a inclinação da curva de calibração de halauxifen-metil em extrato da matriz.

α_{solvente} = é a inclinação da curva de calibração de halauxifen-metil em solvente acetonitrila.

Para a interpretação do resultado obtido foi considerado: 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%); e alto efeito de matriz (valores encontrados abaixo de - 50 e acima de + 50%).

[14,15]

Avaliação da fotodegradação do halauxifen-metil em meio aquoso

Neste estudo, foi realizado um experimento para avaliar a estabilidade do halauxifen-metil em água sob condições ambientais simuladas. Foram utilizados 48 frascos de vidro de 22 mL, cada um preenchido com 4 mL de água superficial coletada no Rio Jequitinhonha sob coordenadas geográficas 16°41'16.86"S 42° 7'7.47"O e fortificados com concentração inicial de 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ do herbicida. Dos frascos, 24 foram expostos à luz solar, enquanto os outros 24 frascos foram mantidos em local sombreado, protegidos da luz com papel alumínio e os frascos foram armazenados em uma caixa vedada. As extrações e análises cromatográficas foram realizadas a cada cinco dias, e as duas últimas análises a cada dez dias ao longo de um período de 50 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização das condições cromatográficas

O primeiro parâmetro avaliado na otimização das condições cromatográficas foi o melhor

comprimento de onda para determinação do halauxifen-metil. O espectro de absorção na região do ultravioleta e visível deste herbicida pode ser observado na Figura 2.

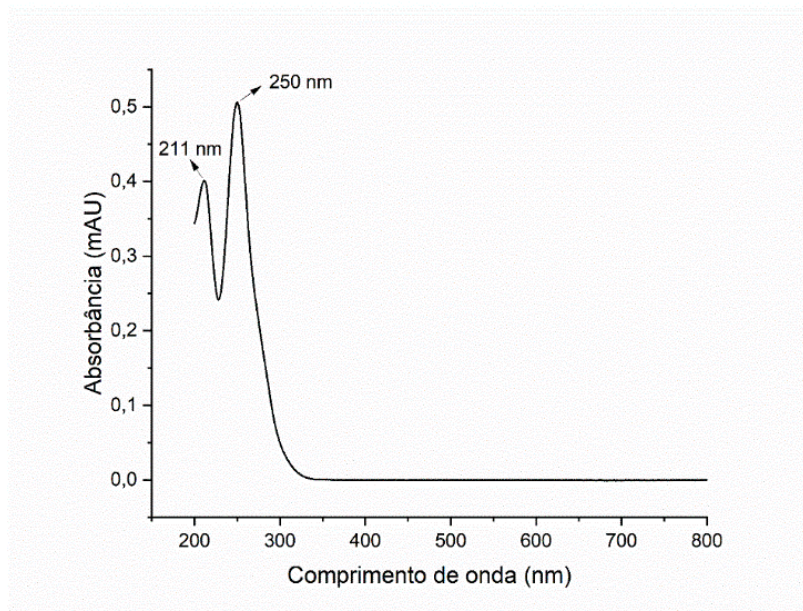


Figura 2. Espectro de absorção na região do ultravioleta e visível da solução padrão de halauxifen-metil, em acetonitrila, na concentração de 4 mg L^{-1} .

O espectro obtido revelou que a maior absorbância foi observada em 211 e 250 nm. Por isso, as análises cromatográficas por HPLC-DAD foram realizadas nesses dois comprimentos de onda, como pode ser observado na Figura 3. Estudos anteriores encontraram maiores absorbância nos comprimentos de ondas de 212 nm e 249 nm para este herbicida. [3,16]

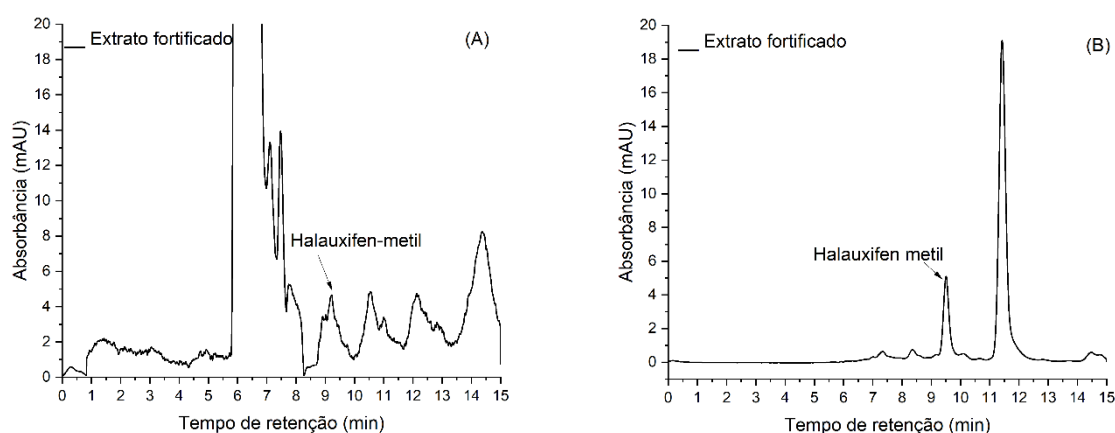
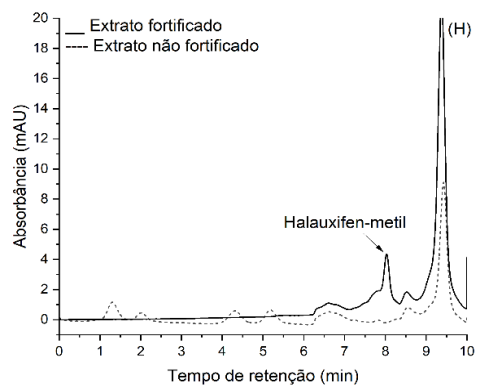
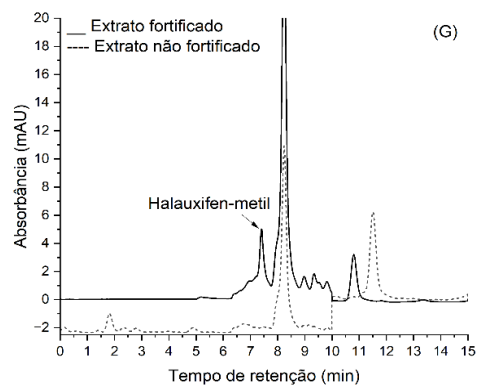
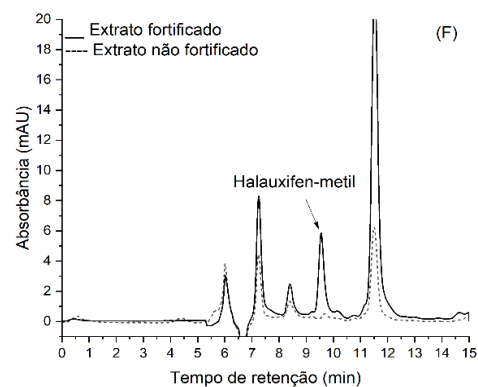
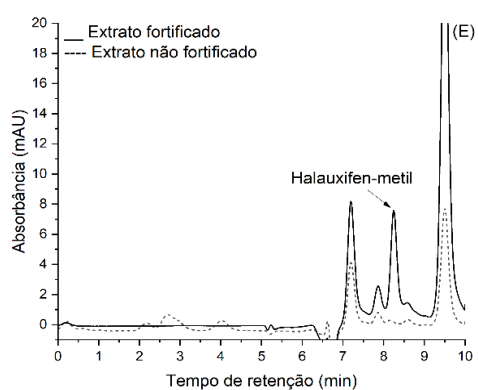
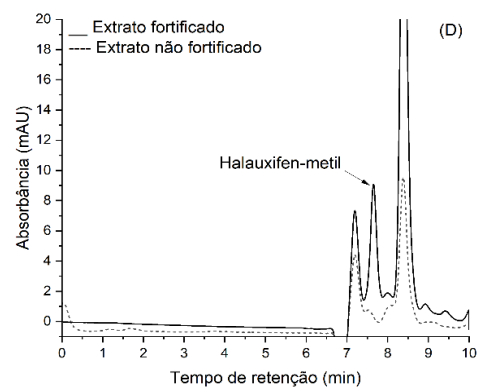
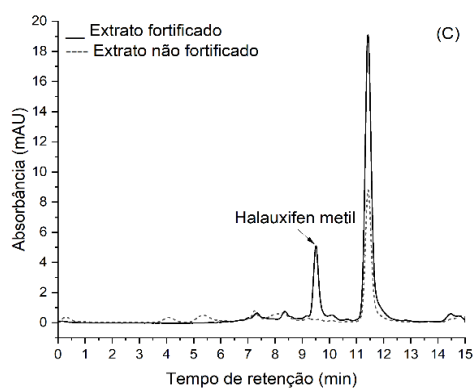
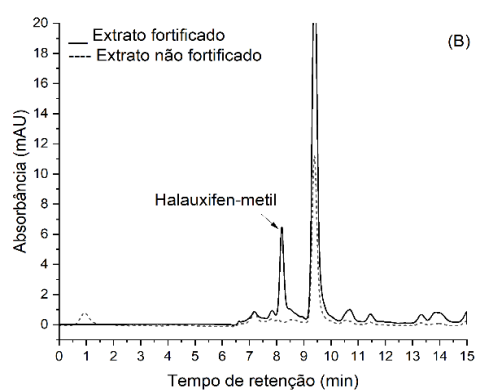
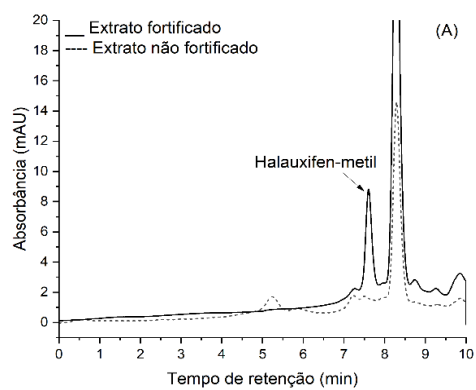


Figura 3. Cromatogramas do extrato da matriz fortificado com halauxifen-metil na concentração de $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, usando os comprimentos de onda. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = $10 \text{ } \mu\text{L}$, fase móvel acetonitrila: água = 90:10, Temperatura = $30 \text{ } ^\circ\text{C}$, fluxo = $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ A)

211 nm e B) 250 nm.

O cromatograma obtido em 211 nm apresentou maior quantidade de sinais atribuídos a interferentes, e menor intensidade do sinal do halauxifen-metil. Já o cromatograma obtido em 250 nm apresentou o sinal do halauxifen-metil mais intenso e com maior área cromatográfica. Por isso, este comprimento de onda foi selecionado para determinação do halauxifen-metil em amostras de água.

A próxima etapa deste trabalho foi a definição da melhor fase móvel. Para isso, 12 composições de fases móveis foram avaliadas como pode ser observado na Tabela 1. Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 4.



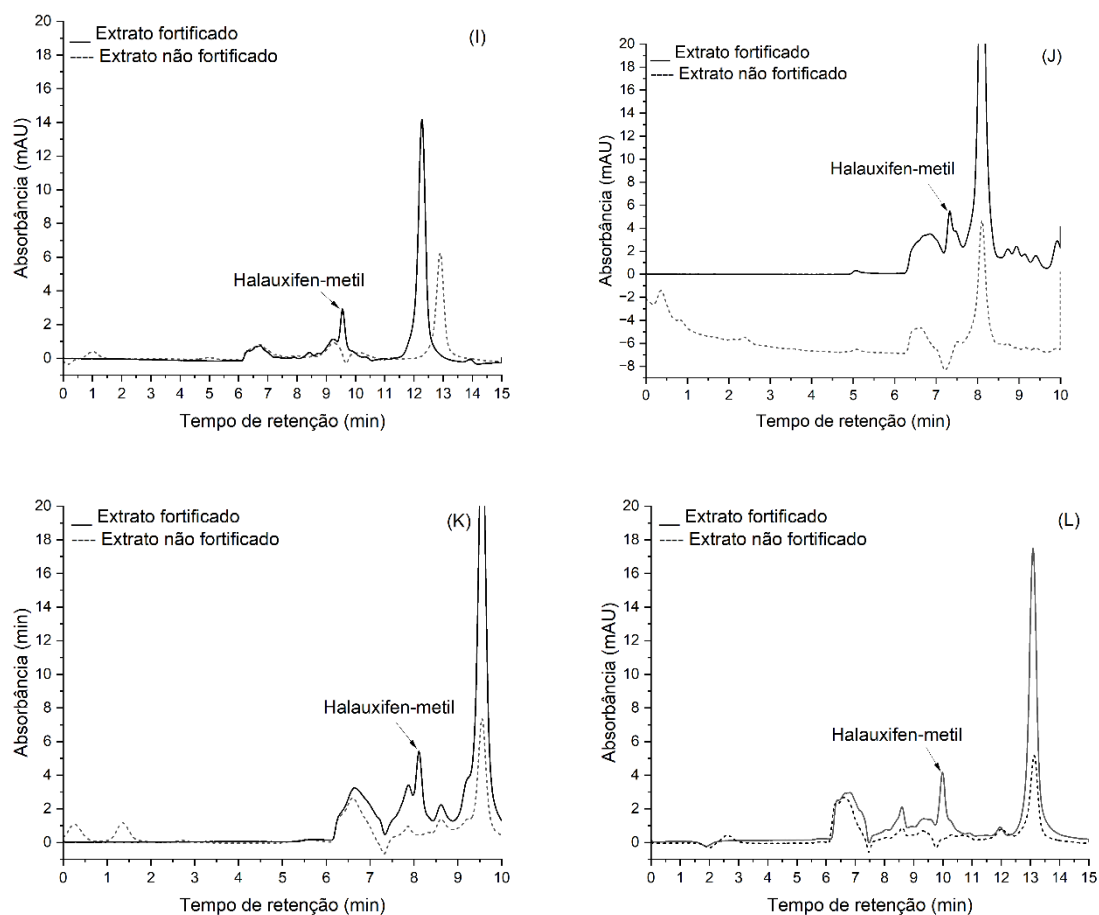


Figura 4. Cromatogramas do extrato da matriz fortificado com halauxifen-metil na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ usando diferentes composições da fase móvel. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = $10 \mu\text{L}$, Temperatura = 30°C , $\lambda = 211 \text{ nm}$ fluxo = $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. A) 100% acetonitrila; B) 90% acetonitrila: 10% água; C) 80% acetonitrila: 20% água; D) 100% acetonitrila com AF; E) (90% acetonitrila: 10% água) com AF; F) (80% acetonitrila: 20% água) com AF; G) 100 % metanol; H) 90 % metanol: 10% água; I) 80 % metanol: 20 água; J) 100 % metanol com AF ; K) (90% metanol: 10% água) com AF; L) (80 % metanol: 20% água) com AF. (----) extrato branco (___) extrato fortificado.

A fase móvel utilizando acetonitrila apresentou cromatogramas com melhor resolução e menor quantidade de interferentes (Figura 4A, 4B e 4C). A proporção 90:10 obteve maior intensidade do sinal, porém com a presença de sinal de interferente próximo ao analito alvo (Figura 4B). Das três proporções, a combinação de acetonitrila: água na proporção 80:20 gerou um cromatograma com a menor quantidade de interferentes (Figura 4C). Por essa razão, essa fase móvel nesta proporção foi

selecionada para as próximas etapas deste estudo.

A adição de ácido fórmico na fase móvel não gerou benefícios para o cromatograma, pois o número de sinais de interferentes aumentou nestes cromatogramas, como pode ser observado nas Figuras 4D, 4E e 4F.

Estudos anteriores utilizaram como fase móvel o metanol e a água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, no modo gradiente.^[6] Por isso, esta composição de fase móvel também foi avaliada neste estudo, tanto acidificada quanto não acidificada. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 4G a 4L. Os resultados indicaram uma redução na resolução cromatográfica e na intensidade do sinal do halauxifen-metil, e o aumento do número de sinais atribuídos a interferentes nos cromatogramas (Figura 4G ao 4L). Desta forma, as fases móveis contendo metanol em sua composição, não se apresentaram como boas opções para este estudo.

A próxima etapa deste estudo foi avaliação da melhor coluna cromatográfica. Por isso, foram avaliadas três tipos de colunas, como descrito na Tabela 1. Os cromatogramas obtidos em cada coluna são apresentados na Figura 5.

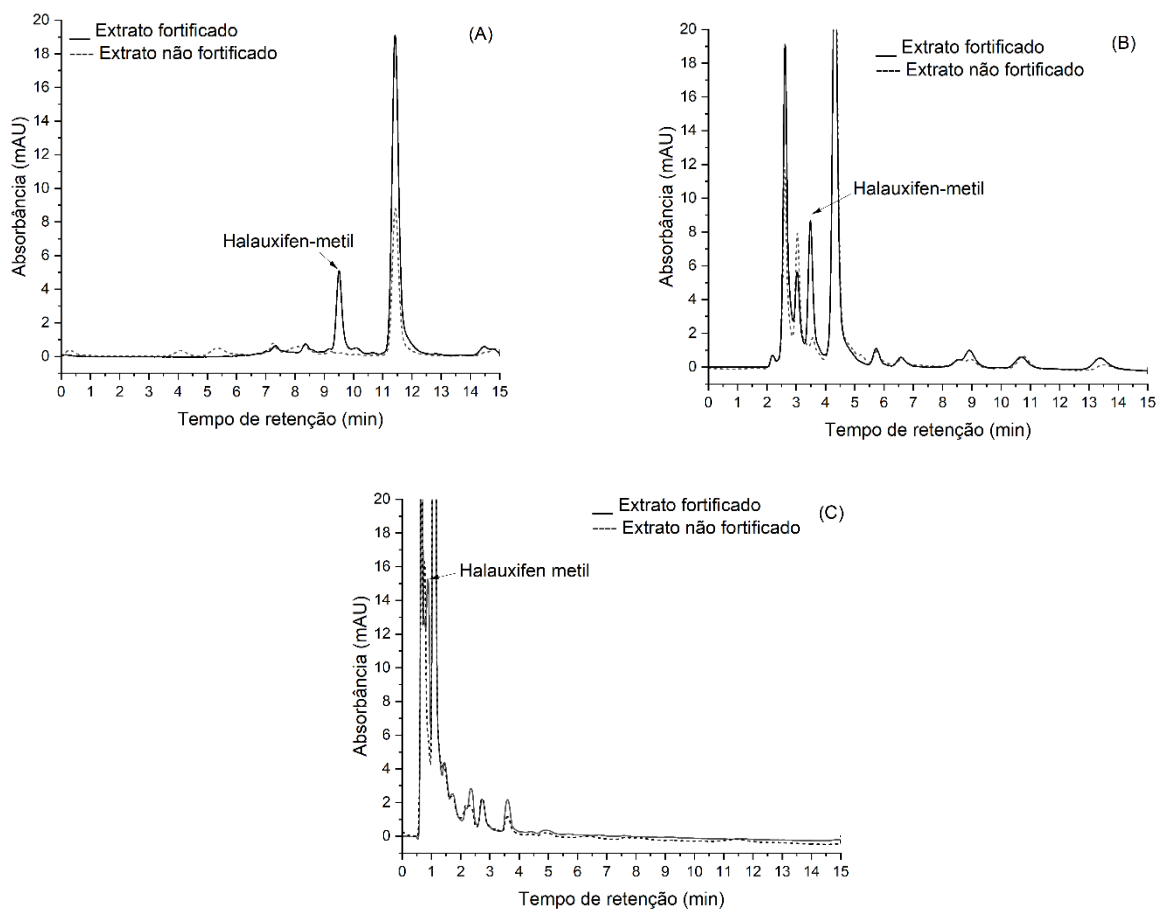


Figura 5. Cromatogramas do extrato da matriz fortificado com halauxifen-metil na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ obtidos com diferentes colunas cromatográficas. Condições cromatográficas: volume de injeção = $10 \mu\text{L}$, Temperatura = 30°C , fase móvel acetonitrila: água = 80:20, $\lambda = 211 \text{ nm}$, fluxo = $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. A) Coluna Kinetex B) Coluna Poroshell C) Coluna Zorbax. (----) extrato branco (___) extrato fortificado.

O cromatograma obtido usando a coluna Kinetex apresentou maior tempo de retenção para o halauxifen-metil, porém com menor quantidade de sinais de interferentes e com maior resolução cromatográfica. Já os cromatogramas obtidos com as colunas Poroshell e Zorbax apresentaram maior quantidade de sinais de interferentes próximos ao sinal do halauxifen-metil, prejudicando a separação cromatográfica (Figuras 5B e 5C). Portanto, a coluna Kinetex foi selecionada para a próxima etapa deste estudo.

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

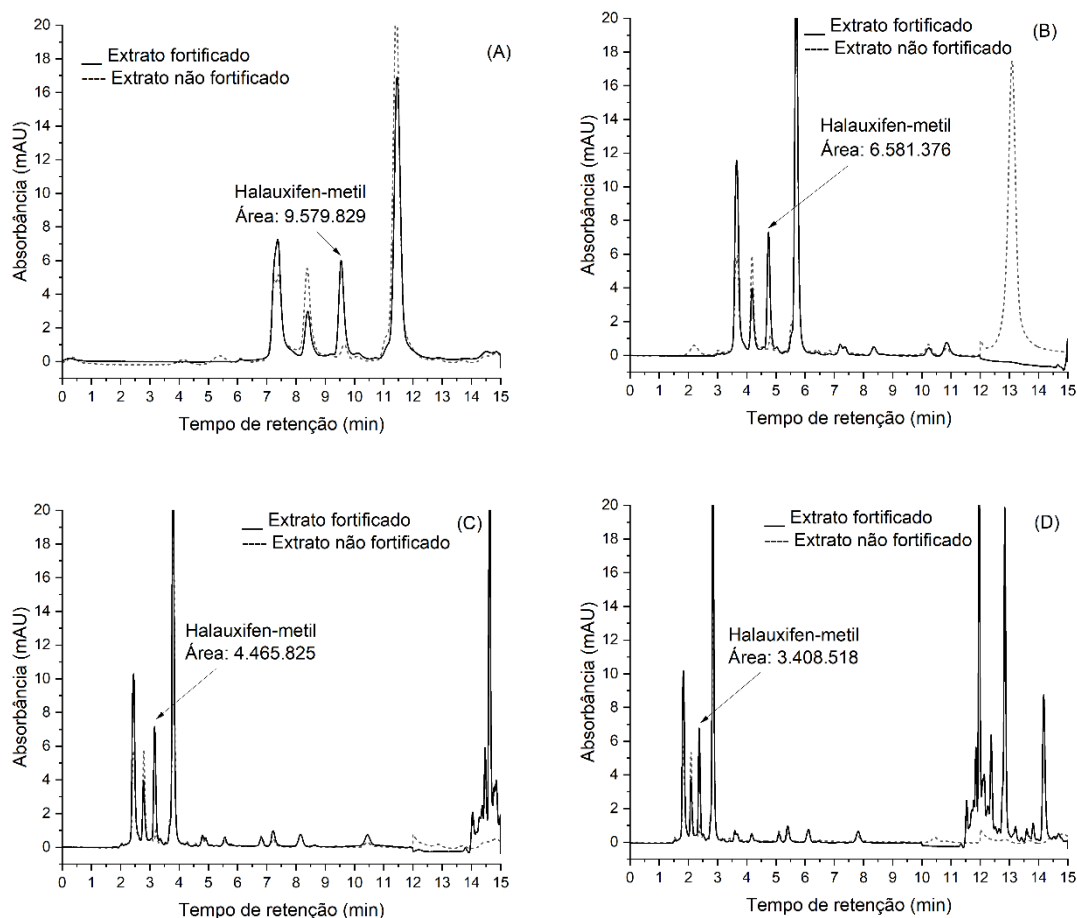


Figura 6. Cromatogramas do extrato da matriz fortificado com halauxifen-metil na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtidos sob os fluxos da fase móvel. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = 10 μL , temperatura = 30 °C, fase móvel acetonitrila: água = 80:20, λ = 250 nm A) 0,2 mL min⁻¹ B) 0,4 mL min⁻¹ C) 0,6 mL min⁻¹ D) 0,8 mL min⁻¹. (----) extrato branco (___) extrato fortificado.

Pode-se observar que o cromatograma obtido com fluxo de 0,2 mL min⁻¹ apresentou melhor separação do sinal e resultou em uma maior área cromatográfica (Figura 6A). Já os cromatogramas das Figuras 6B, 6C e 6D apresentaram menor tempo de retenção para o halauxifen-metil, porém com menores áreas cromatográficas. Por isso, o fluxo de 0,2 mL min⁻¹ foi escolhido para este estudo.

O próximo parâmetro avaliado foi a temperatura da coluna cromatográfica em três níveis como descrito na Tabela 1. Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 7.

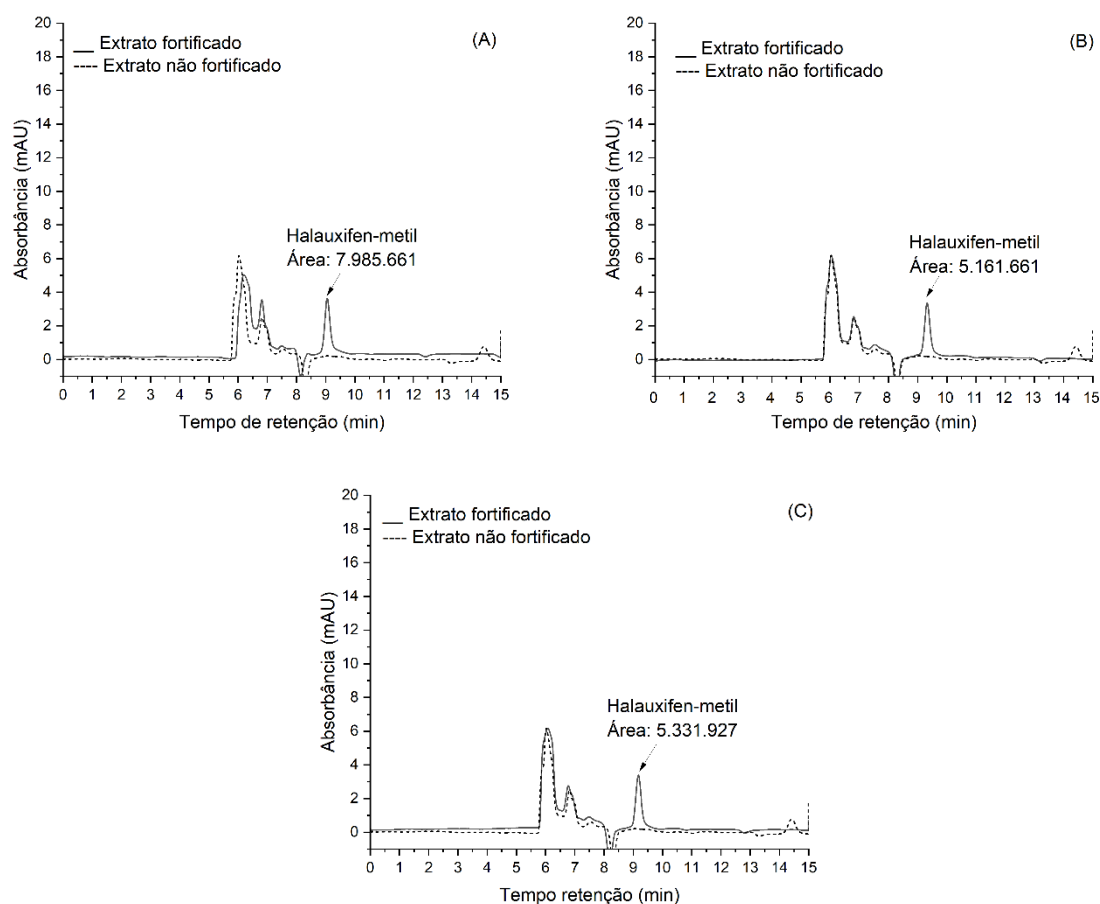


Figura 7. Cromatogramas do extrato da matriz fortificado com halauxifen-metil na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ sob as temperaturas da coluna cromatográfica. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, volume de injeção = $10 \mu\text{L}$, fase móvel acetonitrila: água = 80:20, $\lambda = 250 \text{ nm}$, fluxo = $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. A) 30°C B) 35°C C) 40°C . (----) extrato branco (___) extrato fortificado

Os cromatogramas obtidos não apresentaram diferença significativa em todas as temperaturas avaliadas, porém o cromatograma obtido na temperatura de 30°C apresentou maior área cromatográfica para o sinal do halauxifen-metil. Similarmente, estudos anteriores também avaliaram a temperatura da coluna a 30°C e 35°C , ambas temperaturas não interferiram no resultado.^[17] Portanto foi definido a menor temperatura, ou seja, a temperatura de 30°C , conforme a Figura 7A.

O último parâmetro cromatográfico avaliado foi o volume de injeção, em dois níveis como descrito na Tabela 1. Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 8.

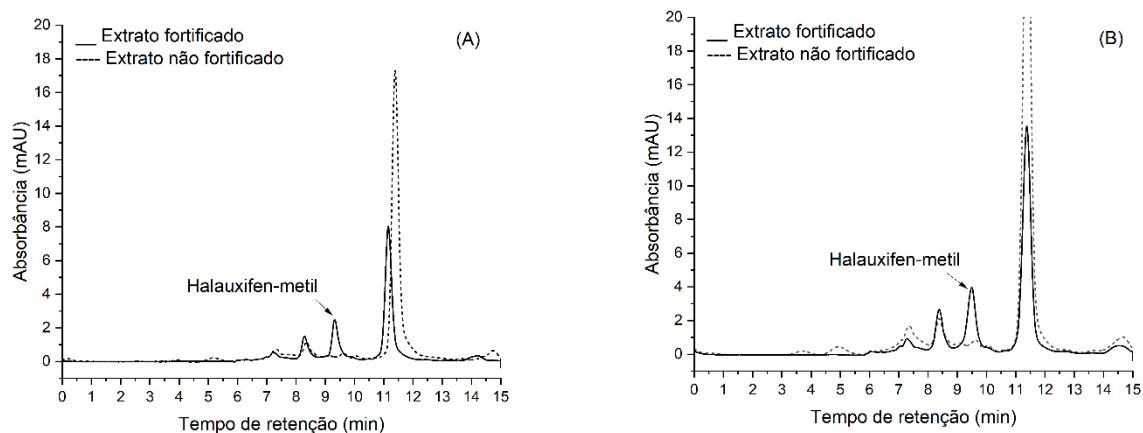


Figura 8. Cromatogramas do extrato da matriz fortificado com halauxifen-metil na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ obtidos com volume de injeção. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, fase móvel acetonitrila: água = 80:20, temperatura = 30°C , $\lambda = 250 \text{ nm}$, fluxo = $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. A) $10 \mu\text{L}$ B) $20 \mu\text{L}$. (----) extrato branco (___) extrato fortificado.

Os resultados obtidos não revelaram diferenças significativas entre os cromatogramas obtidos (Figura 8) e, por essa razão, o volume de injeção de $10 \mu\text{L}$ foi definido para este estudo.

Após otimização de todos estes parâmetros, as condições cromatográficas ótimas foram aplicadas, e o cromatograma obtido apresentou o sinal do halauxifen-metil em 9,5 min, como pode ser observado na Figura 9. Estudos anterior obtiveram tempo de retenção de 12 min para este herbicida em água.^[6]

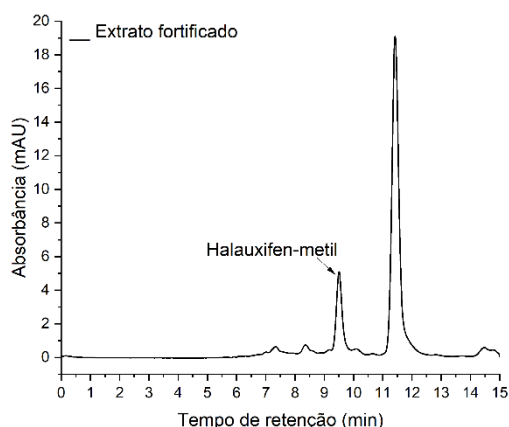


Figura 9. Cromatogramas do extrato da matriz fortificado com halauxifen-metil na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Condições cromatográficas otimizadas: $\lambda = 250 \text{ nm}$, coluna Kinetex, composição da fase móvel 80% acetonitrila e 20% água, fluxo da fase móvel $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e volume de injeção = $10 \mu\text{L}$.

Otimização das condições ELL-PBT

Fase extratora

Foram avaliadas quatro opções de fases extratoras como descrito na Tabela 2. Estas fases extratoras foram escolhidas para este estudo por terem apresentado taxas de recuperação elevadas, em estudos anteriores, empregando esta técnica de extração.^[18,19,20,17] As porcentagens de recuperação de halauxifen-metil em cada fase extratora podem ser observadas na Figura 10.

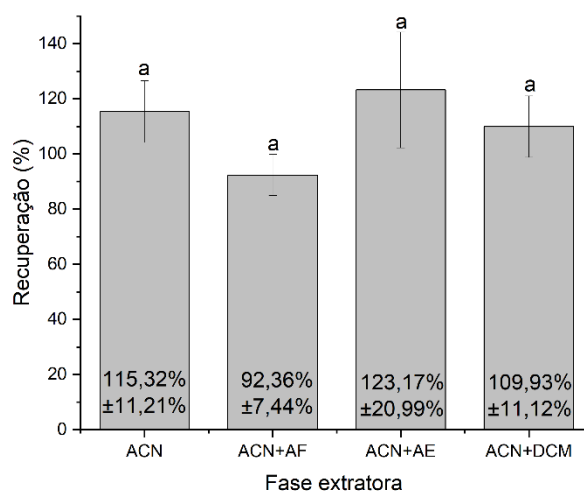


Figura 10. Porcentagens de recuperação de halauxifen-metil em diferentes composições da fase

extratoras. As barras com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Das quatro fases extratoras estudadas, apenas a fase extratora constituída por acetonitrila e acetato de etila (6,5:1,5 v/v) ACN+AE não apresentou taxa de recuperação dentro dos limites exigidos pelos protocolos de validação, ou seja, acima de 120% e DPR maior que 20%. As porcentagens de recuperação das outras três fases extratoras não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. Por isso, foi realizada uma comparação entre os cromatogramas de extratos, da matriz fortificada com halauxifen-metil, utilizando cada fase extratora, como pode ser observado na Figura 11.

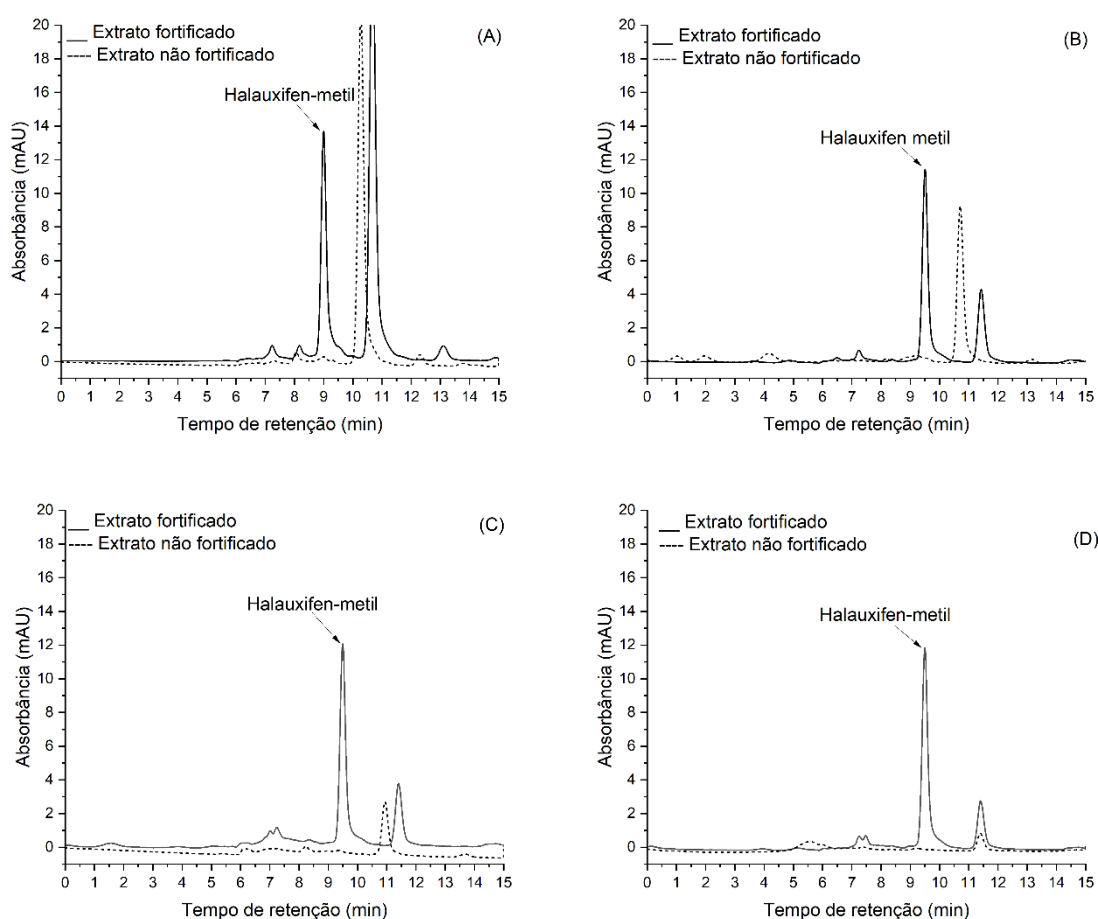


Figura 11. Cromatogramas de extratos da matriz fortificada com halauxifen-metil na concentração $90 \mu\text{g L}^{-1}$, empregando as fases extratoras. A) 8 mL ACN; B) 8 mL ACN+AF; C) 6 mL ACN+2 mL AE; D) 7,5 mL ACN+0,5 mL DCM. (----) extrato branco (___) extrato fortificado.

Entre os quatro cromatogramas obtidos, pode-se observar que o cromatograma obtido com a fase extratora constituída por acetonitrila e diclorometano apresentou menor número de sinais de interferentes e linha de base com menor ruído próximo do tempo de retenção do halauxifen-metil, por isso, esta fase extratora foi escolhida para as próximas etapas deste estudo.

Tempo de congelamento

Em seguida, o tempo de congelamento da fase extratora foi avaliado como descrito na Tabela 2. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 12.

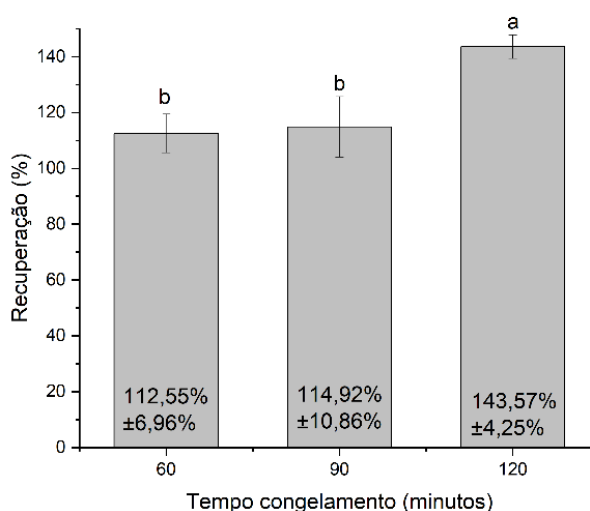


Figura 12. Porcentagens de recuperação de halauxifen-metil usando diferentes tempos de congelamento. As barras com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

As taxas de recuperação obtidas com tempo de 120 min não atenderam aos protocolos de validação, pois apresentaram elevadas porcentagens de recuperação. Entretanto, as taxas de recuperação obtidas com 60 e 90 minutos não diferiram estatisticamente e atenderam aos protocolos de validação. Por isso, foi realizada uma avaliação do perfil cromatográficos destes dois extratos. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 13.

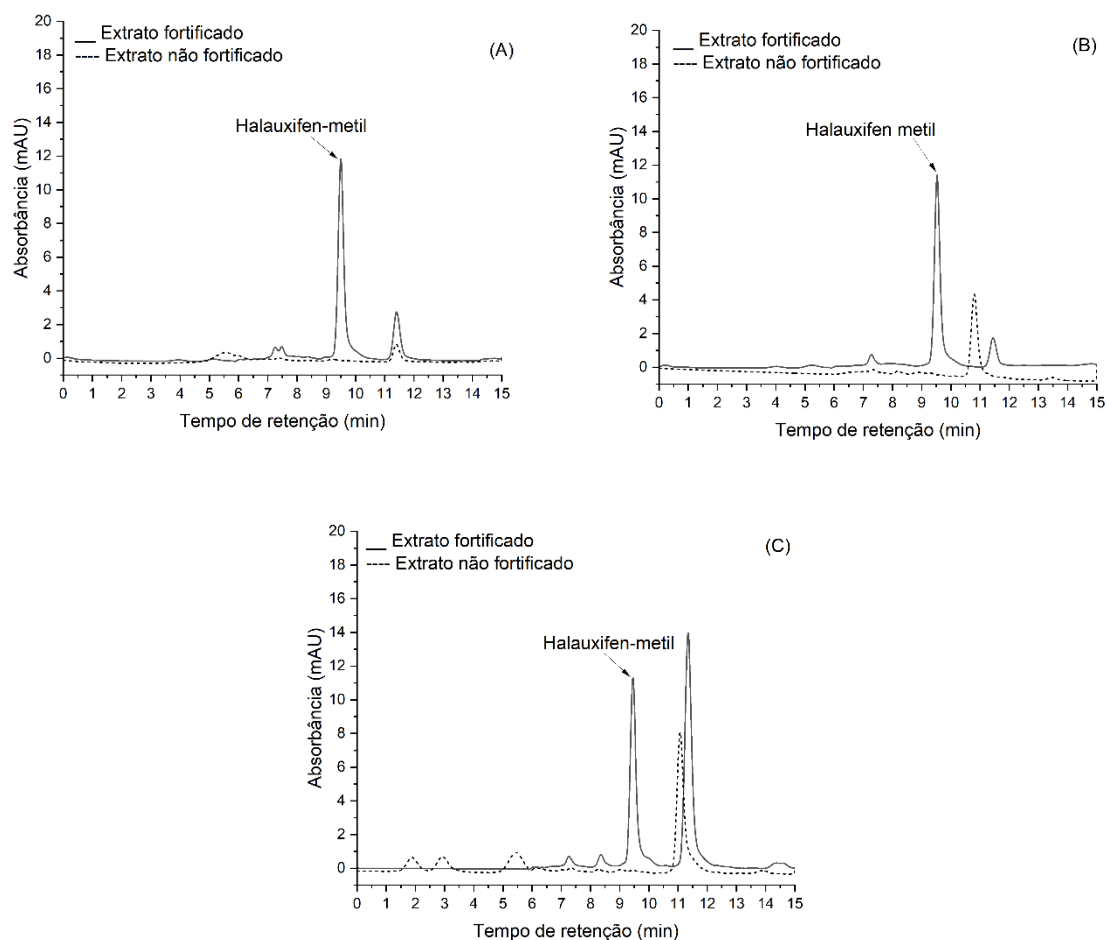


Figura 13. Cromatogramas do extrato da matriz fortificada com halauxifen-metil na concentração de $90 \mu\text{g L}^{-1}$, empregando os tempos de congelamento. A) 60 min B) 90 min C) 120 min. (----) extrato branco (—) extrato fortificado.

Os cromatogramas obtidos foram muito semelhantes. No entanto, o extrato congelado por 90 min apresentou congelamento total ao adicionar sal inorgânico, enquanto o extrato congelado por 60 min não congelou completamente, com a mesma adição de sal. Portanto, optou-se pelo tempo de congelamento de 90 min para este estudo. A adição de sal ao sistema aquoso pode interferir no congelamento completo da água e aumentar o tempo necessário para a extração do analito.^[21]

Força Iônica

Posteriormente, a força iônica foi avaliada em quatro níveis, como descrito na Tabela 2. Os resultados de recuperação obtidos em cada condição estão apresentados na Figura 14.

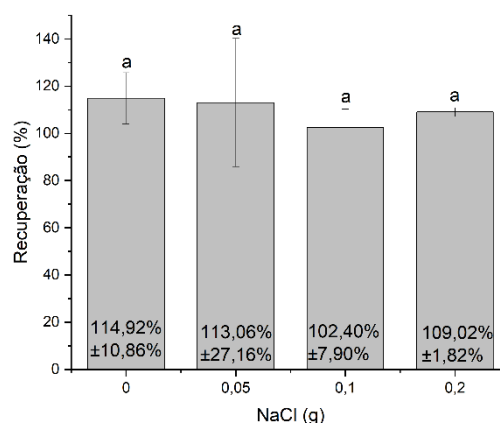


Figura 14. Porcentagens de recuperação de halauxifen-metil usando diferentes quantidades de NaCl. As barras com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Apesar da condição usando 0,05 g de NaCl ter gerado um desvio padrão elevado e a condição utilizando 0,2 g de NaCl ter gerado o menor valor de desvio padrão, os resultados apontaram que não houve diferença estatística entre as quatro taxas de recuperação, pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. Por isso, foi realizada uma avaliação dos cromatogramas dos quatro extratos obtidos, como pode ser observado na Figura 15.

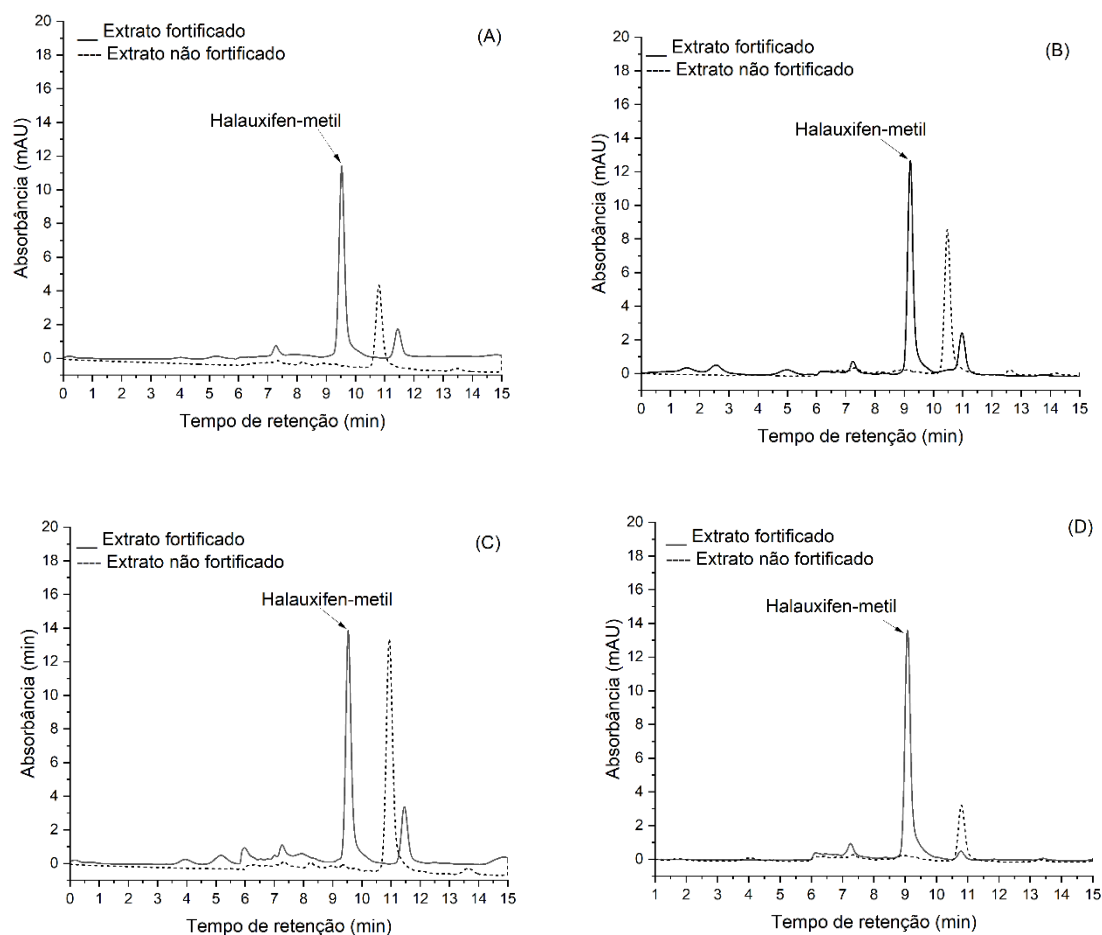


Figura 15. Cromatogramas dos extratos da matriz fortificada com halauxifen-metil na concentração de $90 \mu\text{g L}^{-1}$, empregando quantidades diferentes de NaCl A) 0 g B) 0,05 g C) 0,1 g D) 0,2 g. (----) extrato branco (___) extrato fortificado.

Pode-se observar que o cromatograma do extrato obtido sem adição de NaCl apresentou um sinal cromatográfico do halauxifen-metil menos intenso em relação às condições que apresentaram adição de NaCl. Já as condições que usaram 0,05 g e 0,1 g de NaCl geraram uma linha de base com mais ruídos e com sinais de interferentes mais intenso. Por outro lado, a condição empregando 0,2 g de NaCl apresentou uma linha com menos ruído e o sinal do interferente menos intenso. A adição de sais inorgânicos pode melhorar a extração do analito, pois a água tende a se ligar mais fortemente aos íons dos sais. Esse processo faz com que os íons sejam solvatados pelas moléculas de água, o que facilita a transferência do analito para a fase extratora.^[21] Diante deste cenário, esta última condição foi selecionada para este estudo.

Desta forma, a condição ótima para a ELL-PBT de halauxifen-metil em água deve utilizar a

acetonitrila com diclorometano (7,5:0,5 v/v) como fase extratora, usando 0,2 g de NaCl e tempo de congelamento de 90 min. Estas condições foram submetidas à etapa de validação.

Validação do método

Após otimizar as condições cromatográficas e de extração, o método de extração foi validado em termos de seletividade, limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, linearidade e efeito de matriz, de acordo com o protocolo SANTE.^[12]

Seletividade

A seletividade do método otimizado foi confirmada pela comparação do cromatograma do extrato da matriz livre de halauxifen-metil (extrato branco) com o cromatograma do extrato da matriz fortificado com este herbicida. Os cromatogramas obtidos em cada condição podem ser observados na Figura 16.

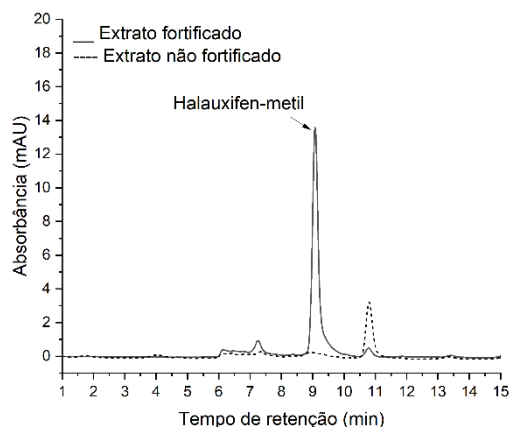


Figura 16. Cromatogramas do extrato da matriz isento de halauxifen-metil (extrato branco) e do extrato da matriz fortificada com halauxifen metil a $90 \mu\text{g L}^{-1}$. (---) extrato não fortificado (___) extrato fortificado.

Pode-se observar que o cromatograma do extrato branco não apresentou sinais cromatográficos, atribuídos a interferentes, no mesmo tempo de retenção da halauxifen-metil, indicando que o método otimizado pode ser considerado seletivo para determinação deste herbicida

em água.

Limite de Quantificação

O valor de LQ obtido, neste estudo, para o método de extração otimizado pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados da validação do método de extração otimizado para determinação de halauxifen-metil em amostras de águas

Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação	R^{2**}	Recuperação $\pm$ DPR (%)			LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
			0,448 $\mu\text{g L}^{-1a}$	90,0 $\mu\text{g L}^{-1b}$	120,0 $\mu\text{g L}^{-1a}$	
0,448 a 120	$Y=282549**X+408238$	0,9952	86,60 $\pm$ 11,51	100,60 $\pm$ 4,45	110,91 $\pm$ 2,4	0,448

^a média de 3 repetições; ^b média de 7 repetições; Y= área cromatográfica do pico do halauxifen-metil; X= Concentração fortificada com halauxifen-metil no extrato da matriz; R^2 = coeficiente de determinação; LQ = limite de quantificação; DPR= desvio padrão relativo;

** Coeficientes angulares significativos $p < 0,05$.

O limite máximo de resíduo (LMR) deste herbicida em água ainda não foi definido por agências reguladoras nacionais ou internacionais. No entanto, para comparação, o LMR de 4,0 $\mu\text{g/L}$ foi estabelecido para o 2,4-D, herbicida do mesmo grupo mimetizador de auxina, em águas de Classe 1 e 2. Esse valor se aplica a águas de Classe 1 (abastecimento doméstico após tratamento simples, proteção de comunidades aquáticas, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e frutas consumidas cruas, e aquicultura) e Classe 2 (abastecimento doméstico após tratamento convencional, proteção de comunidades aquáticas, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e frutíferas, e aquicultura).^[22]

Estudo prévio encontrou o LQ de 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em água para o florypyrauxifen-benzil, um herbicida que pertence ao mesmo grupo químico arilpicolinato do halauxifen-metil.^[17] Similarmente, um estudo realizado para determinar o halauxifen metil em água encontrou um LQ de 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$,^[6] empregando o método de extração em fase sólida seguido pela análise por LC-MS/MS. Para outras matrizes como trigo, palha de trigo e solo, estudos prévios encontraram para este herbicida o LQ de 0,49; 0,70 e 0,14 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.^[7]

Na União Europeia, LMR de pesticidas na água potável são regulados pela Diretiva (UE) 2020/2184, a qual determina o LMR de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada pesticida específico, e o LMR de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a soma de todos os pesticidas detectados e quantificados.^[23]

Ainda não há um consenso mundial sobre o LMR do halauxifen-metil em produtos de origem vegetal e animal, sendo que cada país define seus próprios limites para as culturas aplicadas, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de LMR estabelecidos para o herbicida halauxifen-metil em produtos de origem vegetal em outros países

País	Produtos de origem vegetal	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referência
Austrália	Grãos de cereais	10	APVMA, 2014 ^[16]
	Forragem de grãos de cereais (verde)	200	APVMA, 2014 ^[16]
	Palha de forragem de grãos de cereais (seco)	200	APVMA, 2014 ^[16]
Brasil	Milho	20	ANVISA, 2021 ^[2]
	Soja	20	ANVISA, 2021 ^[2]
Canadá	Cevada	10	APVMA, 2014 ^[16]
	Trigo	10	APVMA, 2014 ^[16]
Estados Unidos	Grãos de cevada	1500	APVMA, 2014 ^[16]
	Feno de cevada	10	APVMA, 2014 ^[16]
	Palha de cevada	10	APVMA, 2014 ^[16]
	Forragem de trigo	500	APVMA, 2014 ^[16]
	Grãos de trigo	10	APVMA, 2014 ^[16]
	Feno de trigo	40	APVMA, 2014 ^[16]
	Palha de trigo	15	APVMA, 2014 ^[16]

APVMA= Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority; ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Como é possível observar, cada país estabeleceu um limite máximo de resíduo para este herbicida, o que pode dificultar a exportação destes produtos entre estes países.

Por outro lado, em relação aos produtos de origem animal como os ovos, leite, carnes de aves e mamíferos e seus respectivos miúdos, apenas a Austrália já estabeleceu o LMR de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ deste herbicida para estes produtos. Entretanto, alguns países como os Estados Unidos e o Canadá estão alinhados com os limites propostos pela Austrália (APVMA, 2014).

Exatidão e Precisão

Os parâmetros de exatidão e precisão foram avaliados, simultaneamente, e os dados obtidos são apresentados na Tabela 3. Pode-se observar que as taxas de recuperação obtidas estão entre 86,6 e 110,9%, confirmando a exatidão do método. Similarmente, os valores de DPR obtidos ficaram abaixo de 11,5%, garantindo a precisão do método, segundo os protocolos de validação.^[12]

Faixa de Linearidade

A faixa de linearidade do método otimizado foi determinada a partir de cinco níveis de concentração equidistantes entre 0,448 á 120,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, com três repetições independentes, conforme pode ser observado na Figura 17.

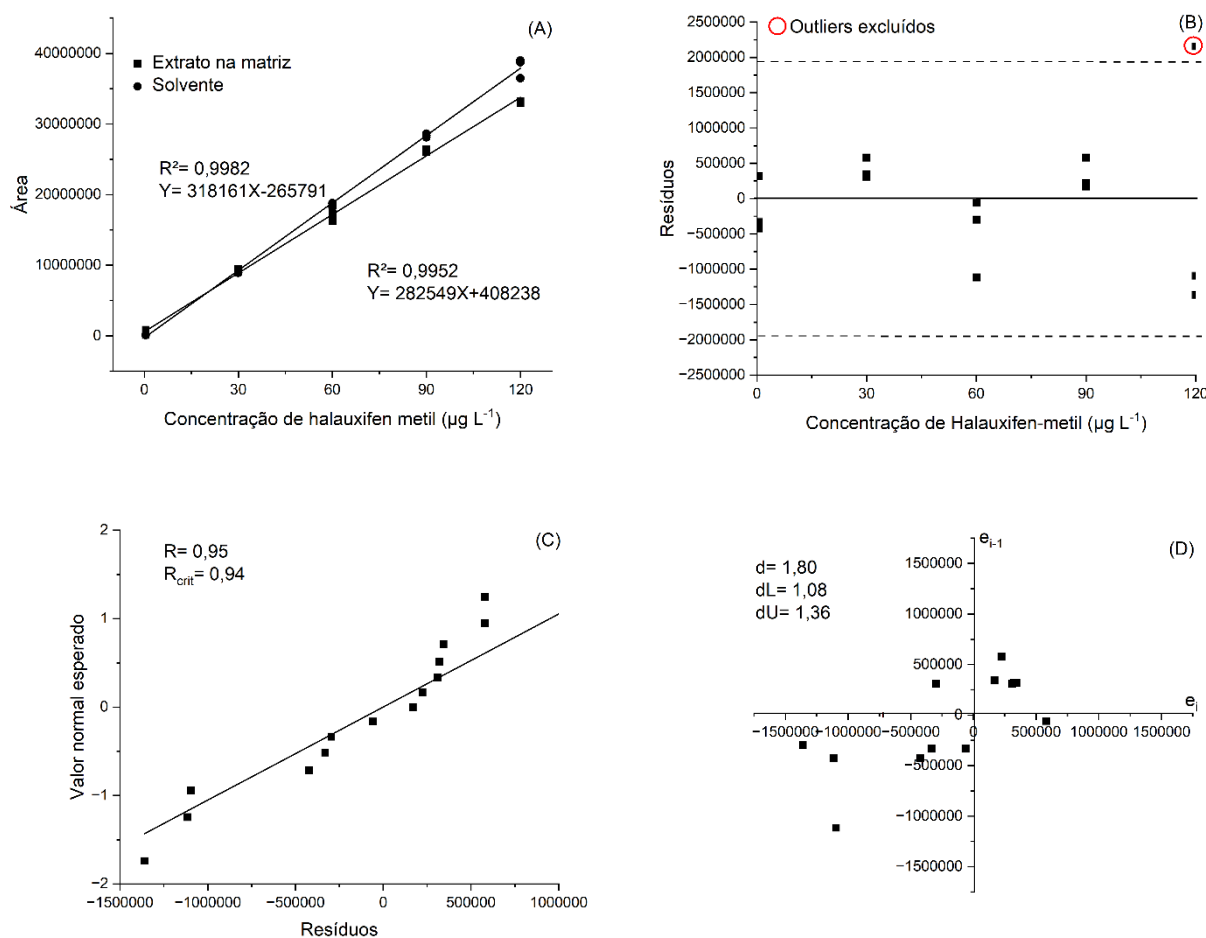


Figura 17. Gráficos obtidos no estudo da linearidade da ELL-PBT. (A) Curvas analíticas de halauxifen-metil em solvente e extratos da matriz. (B) Resíduos da regressão linear após a exclusão dos *outliers* (teste de Jackknife). (C) Probabilidade normal dos resíduos de regressão para o

halauxifen-metil (D) Autocorrelação dos resíduos de regressão para o halauxifen-metil ei: resíduo; R^2 : coeficiente de determinação; R: coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner; d: Estatísticas de Durbin-Watson.

Os parâmetros da regressão linear foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, obtendo-se a inclinação, a intersecção e o coeficiente de determinação (R^2). Pode-se observar que o valor de R^2 foi maior que 0,99, indicando que houve variabilidade nos dados obtidos, o que pode ser explicado pelo modelo de regressão (Figura 17A). O teste Jackknife foi então aplicado aos resíduos da regressão e teve um valor extremo, que foi necessário retirar (Figura 17B).

A distribuição normal dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Ryan-Joiner, resultando no coeficiente de correlação (0,95) superior ao coeficiente de correlação crítico (0,94), obtido pela interpolação polinomial, indicando que os resíduos seguem uma distribuição normal ao nível de significância de 0,05.

A independência dos resíduos da regressão foi demonstrada pelo teste de Durbin e Watson e pela distribuição aleatória dos resíduos nos quatro quadrantes, não sendo encontrada autocorrelação no nível de significância de 0,05. O valor estatístico d (1,80) calculado para o teste foi maior que o valor calculado para o limite crítico superior dU (1,36). Este resultado foi também corroborado pela distribuição homogênea e aleatória dos resíduos da regressão, como pode ser observado na Figura 17D.

O teste de Levene, adaptado por Brown e Forsythe, foi utilizado para verificar a homoscedasticidade dos resíduos da regressão. O valor estatístico encontrado para o t_L (-1,56) foi inferior ao t_{crit} (2,16), indicando ausência de diferença nas variâncias dos resíduos, confirmando a homoscedasticidade.

Dessa forma, a avaliação da faixa linearidade do método de extração otimizado seguiu os procedimentos propostos.^{[13] [24]} O modelo linear para a faixa avaliada de 0,448 a 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ dados foram ajustados (Tabela 3), em que pode se observar a regressão significativa e o desvio de linearidade não significativo ao nível de significância de 0,05, assegurando que MMQO (Métodos dos Mínimos Quadrados Ordinários) foi adequado para os dados estudados.

Efeito de Matriz

O efeito de matriz foi calculado a partir das inclinações das curvas de calibração obtidas com

o extrato da matriz e o solvente (Figura 16A). O valor calculado foi de -11,19%, classificado como baixo, semelhante a estudos anteriores que também não detectaram efeito de matriz para este composto em água.^[6] Isso indica que os componentes da matriz água não interferiram significativamente na resposta analítica do método de extração. Como a água é uma matriz simples e não contém lipídios, carboidratos ou proteínas, o efeito de matriz é considerado não significativo.^[25]

Estudos anteriores corroboram esse resultado, apresentando valores semelhantes de efeito de matriz na determinação de pesticidas em água com a técnica ELL-PBT e análise HPLC-DAD: -14% para dinotefuram,^[26] 8% para fluorpyram^[27] e -7,67% para tolfenpyrad.^[20]

Avaliação da fotodegradação do halauxifen-metil em meio aquoso

A fotodegradação do halauxifen-metil em meio aquoso foi monitorada por 50 dias, tanto sob exposição à luz solar quanto na ausência de luz solar. Os resultados deste monitoramento podem ser observados na Figura 18.

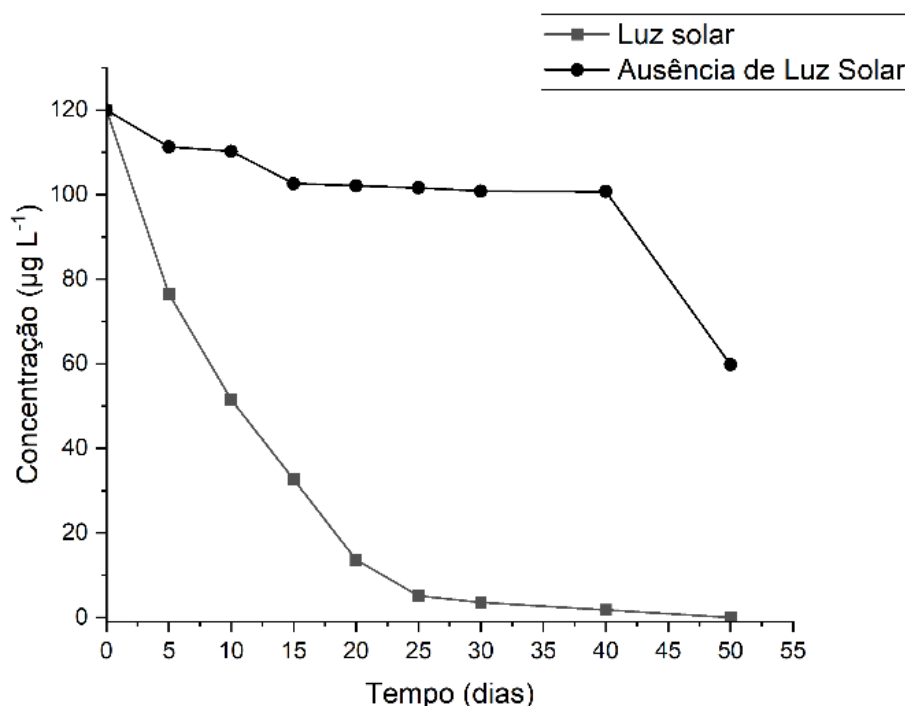


Figura 18. Fotodegradação do halauxifen-metil em meio aquoso na presença de luz solar (■) e na ausência de luz solar (●) .

Os resultados obtidos mostraram que na exposição à luz solar o tempo de meia vida do halauxifen-metil foi de aproximadamente 6 dias. Por outro lado, na ausência de luz solar, o tempo de

meia vida deste herbicida em meio aquoso foi próximo aos 50 dias. Estudos anteriores corroboram que a fotodegradação em água é um importante meio de dissipação desse herbicida, com DT_{50} (tempo de dissipação) variando de 0,003 a 0,005 dias na presença de luz e de 7,43 a 158 dias na ausência de luz.^[3]

Comparação entre métodos

Os resultados deste estudo foram comparados com o único estudo disponível na literatura. Os parâmetros comparados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Comparação entre o método de extração otimizado e validado neste estudo com o método da literatura para determinação do halauxifen-metil na matriz água

Parâmetro	Neste estudo	Referência 1
Análise cromatográfica	HPLC-DAD	LC-MS/MS
Técnica de extração	ELL-PBT	EFS
Nº de etapas	9	7
Volume de solvente/ mL	8,4 mL	8,5 mL
Volume de amostra / mL	4	10
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,448	0,05
Recuperação (%)	86,60 - 110,91%	70-110%
Desvio Padrão Relativo	2,40 - 11,51%	2 -17%
Tempo de retenção	9.5 mim	12 min

HPLC-DAD = High Performance Liquid Chromatography With Iodine Array Detector; LC- MS/MS = Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry; ELL-PBT= Extração Líquido - Líquido com Partição em Baixa Temperatura; EFS = Extração em Fase Sólida; LQ = Limite de Quantificação

Apesar da ELL-PBT ter apresentado menor consumo de amostra e tempo de retenção, ambos os métodos de extração apresentaram resultados semelhantes, e mostraram-se eficientes e atenderam os parâmetros de validação para a determinação deste herbicida em água. Além disso, o HPLC-DAD apresenta baixo custo de manutenção se torna acessível para análises.

CONCLUSÃO

A metodologia otimizada e validada atendeu aos parâmetros estabelecidos pelo protocolo de validação internacional para a determinação do halauxifen-metil em água. Apesar de não ter um LMR para este herbicida em água, o valor alcançado neste estudo está em conformidade aos LMR de herbicidas da mesma classe e para esta matriz. A degradação deste herbicida em águas superficiais, sob incidência de luz solar, ocorreu em 50 dias. Em locais com ausência de luz, como em águas subterrâneas, a degradação é mais lenta.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (306551/2022-5) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro das bolsas de pesquisa. Os autores também são gratos ao Laboratório de Química Instrumental e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela infraestrutura fornecida.

DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS

Os autores confirmam que os dados que sustentam as descobertas deste estudo estão disponíveis no artigo [e/ou] em seus materiais suplementares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] HRAC (Herbicide Resistance Action Committee). <https://hracglobal.com/tools/2024-hrac-global-herbicide-moa-classification> (accessed jun 15, 2024).
- [2] ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Monografia de agrotóxicos autorizadas H20 Halauxifeno-metil, 2021. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h-i/h20-halauxifeno-metil-a-partir-de-29-10.pdf/view> (accessed Jun 15, 2024).
- [3] HEALTH CANADA. *Proposed Registration Document PRD2014-12 – Halauxifen-methyl*. Ottawa: Health Canada Pest Management Regulatory Agency, 2014. 107. https://publications.gc.ca/collections/collection_2014/sc-hc/H113-9-2014-12-eng.pdf (accessed Mai 15, 2024).

- [4] EFSA (European Food Safety Authority). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance halauxifen-methyl (XDE-729 methyl). *EFSA Journal*, 2014, 12, 12, 3913. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2014.3913> (accessed Jun 15, 2024).
- [5] Mc Cauley, C. L.; Johnson, W. G.; Young, B. G. Eficácia do halauxifen-metil em erva-de-cavalo resistente ao glifosato (*Erigeron canadensis*). *Weed Science*, **2018**, 66, 6, 758-763. DOI: 10.1017/wsc.2018.43
- [6] USEPA. Pesticide Analytical Methods: ECM for Halauxifen-methyl & Degradates in Water - MRID 48557787*. 2013. <https://www.epa.gov/pesticide-analytical-methods/ecm-halauxifen-methyl-degradates-water-mrid-48557787>. (accessed Jun 15, 2024).
- [7] Zhao, H.; Xu, J.; Dong, F.; Liu, X.; Wu, Y.; Wu, X.; Zheng, Y. Simultaneous determination of three herbicides in wheat, wheat straw, and soil using a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method with ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, **2015**, 38, 7, 1164-1171. DOI: 10.1002/jssc.201401234
- [8] Goulart, A. C.; Rodrigues, A. A. Z.; Heleno, F. F.; de Faria, A. M.; Goulart, S. M.; de Queiroz, M. E. L. R. Liquid-liquid and solid-liquid extractions with low-temperature partitioning—A review. *Analytica Chimica Acta*, **2024**, 342795. DOI: 10.1016/j.aca.2024.342795
- [9] Sicupira, L. C.; Tiago, J. P.; 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*, **2019**, 30(6), 1284-1292. DOI: 10.21577/0103-5053.20190024
- [10] Watanabe, E. Review of sample preparation methods for chromatographic analysis of neonicotinoids in agricultural and environmental matrices: From classical to state-of-the-art methods. *Journal of Chromatography A*, **2021**, 1643, 462042, 26. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462042
- [11] Silvério, F. O.; Silva, J. G. S.; Aguiar, M. C. S.; Cacique, A. P.; Pinho, G. P. . Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com divisão em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim. Nova* **2012**, 35, 2052–2056. DOI: 10.1590/S0100-40422012001000027.
- [12] Pihlstrom, T.; Fernández-Alba, A. R.; Amate, C. F.; Poulsen, M. E.; Lippold, R.; Anastassiades, M. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and Feed. 2021. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf. (accessed Jan 21, 2024).
- [13] De Souza, S. V. C.; Junqueira, R. G. A. Procedure to Assess Linearity by Ordinary Least Squares

Method. Anal. Chim. Acta **2005**, 552, 25–35. DOI: 10.1016/j.aca.2005.07.043

[14] 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. *Journal of chromatography A*, **2009**, 1216(31), 5856-5867. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.06.031

[15] 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, 380–386. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.05.068

[16] APVMA, (Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority). PUBLIC RELEASE SUMMARY on the Evaluation of the New Active Constituent Halauxifen-methyl in the Product GF-2685 Herbicide APVMA Product Number 65055. <https://www.apvma.gov.au/> (accessed Jul 21, 2024).

[17] Vieira, L. H.; Sicupira, L. C.; Cacique, A. P.; Silvério, F. O. Optimization and validation of LLE-LTP to determine flupyraxifen-benzyl herbicide in water samples by HPLC-DAD. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, **2022**, 57, 9, 697–709. DOI: 10.1080/03601234.2022.2099202

[18] Costa, L. S.; Schettino, C. F.; Sicupira, L. C.; Pinho, G. P. de.; Silvério, F. O. Determining pyroxasulfone herbicide in honey samples using liquid-liquid extraction with low temperature purification (LLE-LTP). *Talanta*, **2024**, 273, 125870, 2024. DOI: 10.1016/j.talanta.2024.125870

[19] Soares, S. B.; Sicupira, L. C.; Pinho, G. P. D.; Silvério, F. O. Extraction Method for Determining Dinotefuran Insecticide in Soil Samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2024**, 35, 6, e-20230190. DOI: 10.21577/0103-5053.20230190

[20] Teófilo, K. R.; Sicupira, L. C.; & Silvério, F. O. Determining Tolfenpyrad in Water Samples Using Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Purification (LLE-LTP). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2024**, 35, 7, e-20240006. DOI: 10.21577/0103-5053.20240006

[21] Freitas, L. V. P.; Alves, L. M. G.; Sicupira, L. C.; de Pinho, G. P.; Silvério, F. O. Determination of DDT in honey samples by liquid-liquid extraction with low-temperature purification (LLE-LTP) combined to HPLC-DAD. *Analytical Methods*, **2021**, 13, 16, 1955–1964. DOI: 10.1039/d1ay00264c

[22] Brasil. Resolução CONAMA No. 357/2005. Dispõe sobre a Classificação dos Corpos de Água e Diretrizes Ambientais para o seu Enquadramento, bem como Estabelece as Condições e Padrões de Lançamento de Efluentes, e dá outras Providências. DOU No. 053, de 18 mar. 2005. http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf . (accessed jun 15, 2024).

- [23] UNIÃO EUROPEIA. Diretiva (UE) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2020, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. *EUR-Lex*, 2020. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj>. (accessed Set 15, 2024).
- [24] 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, 60–67.
- [25] Goulart, S. M.; Alves, R. D.; Neves, A. A.; De Queiroz, J. H.; De Assis, T. C.; De Queiroz, M. E. L. Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. *Analytica Chimica Acta*, **2010**, 671, 41–47. DOI: 10.1016/j.aca.2010.05.003
- [26] Soares, S. B.; Sicupira, L. C.; Pinho, G. P.; Silvério, F. O. Extraction method for determining dinotefuran insecticide in water samples. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **2023**, 58, 5, 413-425. DOI:10.1080/03601234.2023.2220638
- [27] Freitas, L. V. P.; de Paula Terra, G.; de Souza Santos, S.; Sicupira, L. C.; Silvério, F. O. Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low-temperature purification (LLE-LTP) for determining fluopyram fungicide in water samples using HPLC-DAD. *Analytical Method*, **2022**, 14, 30, 2945-2952. DOI: 10.1039/D2AY01004F

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ELL-PBT, seguida pela análise por CLAE-DAD, foi otimizada e validada para determinação de halauxifen-metil em água. Este método demonstrou ser de fácil execução, seguro, seletivo, linear, preciso e exato. O LMR obtido atendeu à legislação vigente para herbicidas da mesma classe em água. Além disso, a fotodegradação foi identificada como um dos principais processos de degradação do halauxifen-metil em água, ocorrendo em aproximadamente 50 dias, com valores abaixo do LMR. O estudo mostrou-se eficaz para o monitoramento ambiental do halauxifen-metil, podendo ser adotado por órgãos de fiscalização.