

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais

Gleysson de Paula Terra

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO PARA
DETERMINAÇÃO DO FLUOPIRAM EM AMOSTRAS DE ÁGUA E SOLO**

Diamantina - MG

Fevereiro de 2023

Gleysson de Paula Terra

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO PARA
DETERMINAÇÃO DO FLUOPIRAM EM AMOSTRAS DE ÁGUA E SOLO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério
Coorientador: Prof. Dr. Lázaro Chaves Sicupira

Diamantina - MG

Fevereiro de 2023

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

T323o Terra, Gleysson de Paula
2023 Otimização e validação de metodologias de extração para
determinação do fluopiram em amostras de água e solo
[manuscrito] / Gleysson de Paula Terra. -- Diamantina, 2023.
109 p.

Orientador: Prof. Flaviano Oliveira Silvério.
Coorientador: Prof. Lázaro Chaves Sicupira.

Tese (Doutorado Multicêntrico em Química) -- Universidade
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-
Graduação em Multicêntrico em Química de Minas Gerais,
Diamantina, 2023.

1. Fluopiram. 2. Extração líquido-líquido. 3. Extração
sólido-líquido. 4. Purificação em baixa temperatura. 5.
Cromatografia. I. Silvério, Flaviano Oliveira . II. Sicupira,
Lázaro Chaves . III. Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Este produto é resultado do trabalho conjunto entre o bibliotecário Rodrigo Martins Cruz/CRB6-
2886

e a equipe do setor Portal/Diretoria de Comunicação Social da UFVJM



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

GLEYSSON DE PAULA TERRA

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO FLUOPIRAM EM AMOSTRAS DE ÁGUA E SOLO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Multicêntrico em química, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nível de Doutorado, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. FLAVIANO OLIVEIRA SILVÉRIO

Data de aprovação 10/02/2023.

Dr. FLAVIANO OLIVEIRA SILVÉRIO (UFMG)

Presidente da Banca

Dra. GIOVANA RIBEIRO FERREIRA (UFVJM)

Membro Interno

Dra. GEVANY PAULINO DE PINHO (UFMG)

Membro Externo

Dra. ARIANE CASTRICINI (EPAMIG)

Membro Externo

Dr. PAULO HENRIQUE FIDÊNCIO (UFVJM)

Membro Interno



Documento assinado eletronicamente por **Ariane Castricini, Usuário Externo**, em 16/02/2023, às 07:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gevany Paulino de Pinho, Usuário Externo**, em 16/02/2023, às 08:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique Fidencio, Servidor (a)**, em 16/02/2023, às 19:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano Oliveira Silvério, Usuário Externo**, em 24/02/2023, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giovana Ribeiro Ferreira, Servidor (a)**, em 24/02/2023, às 12:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0987092** e o código CRC **05758A6D**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e disposição para enfrentar os desafios e as dificuldades.

À minha família pelo apoio para a realização deste sonho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério, pelos ensinamentos, incentivos e conselhos, que foram fundamentais para realizar este sonho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso para o meu crescimento profissional.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Lázaro Chaves Sicupira, pelo apoio, ensinamentos e colaboração no planejamento e desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores e pesquisadores Dr. Paulo Henrique Fidêncio, Dr. Leandro Rodrigues de Lemos, Dr^a. Gevany Paulino de Pinho, Dr^a Ariane Castricini, Dr^a Giovana Ribeiro Ferreira, e Dr^a Patrícia Xavier Baliza pela colaboração e considerações neste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisas em Agroquímica (LPA) pela parceria e aprendizado em especial ao Silas de Souza Santos, Gleison Luis Oliveira Silva e Lucas Victor Pereira de Freitas.

Ao Laboratório de Química Instrumental (LQI-UFMG) pela infraestrutura disponibilizada.

Ao IFSULDEMINAS, UFVJM, ICA/UFMG, FAPEMIG, CNPq e CAPES.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho, obrigado!

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO

1. Terra, G. P.; Silvério, F. O.; Sicupira, L. C.; Freitas, L. V.; Santos, S. S.; Determinação do fluopiram em amostras de água usando ELL-PBT e CLAE-DAD. 44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, virtual, 2021 (**Apresentação de trabalho**).
2. 44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, virtual, 2021 (**Participação em evento**).
3. Terra, G. P.; Silvério, F. O.; Sicupira, L. C.; Mapelli, R.; Santos, S. S. Avaliação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura em agrotóxicos. 10º Simpósio de Pós-Graduação do IFSULDEMINAS, Passos - MG, 2021 (**Apresentação de trabalho**).
4. 10º Simpósio de Pós-Graduação do IFSULDEMINAS, Passos - MG, 2021 (**Participação em evento**).
5. Terra, G. P.; Silvério, F. O.; Sicupira, L. C.; Freitas, L. V.; Santos, S. S.; Otimização das condições cromatográficas para quantificação do fluopiram por CLAE-DAD. II congresso brasileiro interdisciplinar em ciência e tecnologia - “desafios para a ciência e tecnologia no mundo contemporâneo”. Virtual, 2021 (**Apresentação de trabalho**).
6. Freitas, Lucas Victor Pereira de; Terra, Gleysson de Paula; Santos, Silas de Souza; Sicupira, Lázaro Chaves; Silvério, Flaviano Oliveira. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low-temperature purification (LLE-LTP) for determining fluopyram fungicide in water samples using HPLC-DAD. <https://doi.org/10.1039/D2AY01004F>
(**Artigo aceito/publicado pela revista Analytical Methods**)
7. Silva, Gleison Luis Oliveira; Terra, Gleysson de Paula; Sicupira, Lázaro Chaves; Silvério, Flaviano Oliveira. Optimization and validation of the miniaturized solid-liquid extraction with low temperature purification (SLE-LTP) method for determining fluopyram in different soil types. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220132>
(**Artigo aceito/publicado pelo Journal of the Brazilian Chemical Society**)

RESUMO

O fluopiram é um fungicida desenvolvido pela Bayer Crop Science e atua contra fungos fitopatogênicos inibindo a enzima succinato desidrogenase. Essa molécula também possui ação nematicida. Recentemente surgiram preocupações a respeito dos efeitos toxicológicos devido ao uso extensivo deste composto na agricultura. Diante deste cenário, o monitoramento contínuo deste analito no ambiente e em matrizes alimentares é importante e necessário para assegurar a saúde das pessoas e do meio ambiente. Para este monitoramento, tem sido necessário o desenvolvimento de novas metodologias de extração que sejam fáceis de executar, de baixo custo e suficientemente sensíveis, exatas e precisa. Por isso, este trabalho teve como objetivo otimizar e validar a extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) para determinar o fluopiram em amostras de água por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) e extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) na versão miniaturizada para determinação deste composto em amostras de solos arenosos, argilosos e com textura média e detecção por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Estes dois métodos de extração ainda não foram aplicados com esta finalidade neste composto. É importante destacar que uma das principais vantagens destes métodos de extração tem sido a ausência de uma etapa de limpeza, o que torna o método mais rápido e fácil de executar. Além disso, estes métodos são mais econômicos que os demais. Foi empregado o planejamento fatorial completo com dois níveis e três fatores para otimizar a ELL-PBT que permitiu alcançar uma taxa de recuperação próxima de 100% e desvios padrão relativos inferiores a 10%. A validação mostrou que o método de extração pode ser considerado seletivo, preciso, exato e linear na faixa de 6 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os limites de detecção e de quantificação foram de 4 e 6 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, comprovando a eficiência deste método para determinação deste fungicida em amostras de água. A ELL-PBT combinada à análise por CLAE-DAD mostrou um efeito de matriz inferior a 8% e foi aplicado no monitoramento de 20 amostras ambientais de água, mas nenhum resíduo do fluopiram foi detectado nas amostras. Na versão miniaturizada do método ESL-PBT, todas as análises foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas no modo seletivo de íons. Os resultados revelaram que as porcentagens de recuperação do analito nos três tipos de solos variaram de 86 a 114% com desvio padrão relativo inferior a 15%. Além de empregar menores quantidades de reagentes e amostra, o método ESL-PBT miniaturizado se apresentou seletivo, preciso, exato, linear na faixa de 3 a 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e atingindo um limite de quantificação inferior a 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os três tipos de solos. O método de extração otimizado e validado foi aplicado em 30 amostras reais coletadas em regiões de cultivo de café, porém não foi detectada nestas amostras nenhum resíduo deste composto. Este trabalho assim como outras publicações demonstram a versatilidade e eficiência da aplicação do método de ELL-PBT e ESL-PBT dando respaldo para a sua utilização na determinação de diversos contaminantes.

Palavras-chave: Fluopiram; Fungicida; ELL-PBT; ESL-PBT miniaturizada.

ABSTRACT

Fluopyram is a fungicide developed by Bayer Crop Science and acts against phytopathogenic fungi by inhibiting the enzyme succinate dehydrogenase. This molecule also has nematicidal action. Recently, concerns have arisen regarding the toxicological effects that may occur due to its extensive use of this compound in agriculture. Given this scenario, continuous monitoring of this analyte in the environment and in food matrices is important and necessary to ensure the health of people and the environment. For this monitoring, it has been necessary to develop new extraction methodologies that are easy to perform, low cost and sufficiently sensitive, accurate and precise. Therefore, this work aimed to optimize and validate the liquid-liquid extraction with low temperature purification (LLE-LTP) to determine fluopyram in water samples by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and miniaturized solid-liquid extraction with low temperature purification (SLE-LTP) to determine this compound in samples of sandy, clayey and medium textured soils and detection by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). These two methods have not yet been applied for this purpose on this compound. It is important to highlight that one of the main advantages of these ELL-PBT and ESL-PBT extraction methods is the absence of a cleaning, which makes the method faster and easier to perform. In addition, these methods are more economical than others. A full factorial design with two levels was used to optimize the LLE-LTP, which allowed achieving a recovery rate close to 100% and relative standard deviations below 10%. The validation showed that the extraction method can be considered selective, precise, accurate and linear in the range of 6 to 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. The limits of detection and quantification were 4 and 6 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, proving the efficiency of this method for determining this fungicide in water samples. LLE-LTP combined with HPLC-DAD analysis showed a matrix effect of less than 8% and was applied to monitor 20 environmental water samples, but no fluopyram residues were detected in the samples. All analyzes in the miniaturized SLE-LTP method were performed by gas chromatography coupled to ion-selective mass spectrometry. The results revealed that the analyte recovery percentages in the three soil types ranged from 86 to 114% with a relative standard deviation of less than 15%. In addition to using smaller amounts of reagents and sample, the miniaturized SLE-LTP method was selective, precise, accurate, and linear in the range of 3 to 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and reached a quantification limit of less than 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for the three soil types. The optimized and validated extraction method was applied to 30 real samples collected in coffee growing regions, but no residue of this compound was detected in these samples. This work, as well as other publications, demonstrate the versatility and efficiency of applying the LLE-LTP and SLE-LTP methods, supporting their use in determining various contaminants.

Keywords: Fluopyram; Fungicide; LLE-LTP; Miniaturized SLE-LTP.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 Fluopiram	16
3.2 Métodos para extração e quantificação do fungicida e nematicida fluopiram em diferentes matrizes	19
3.3 Extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT)	22
3.4 Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT)	27
3.5 Técnicas de análise instrumental empregadas para o fungicida e nematicida fluopiram	30
3.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD)	31
3.5.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	30
3.6 Validação de métodos analíticos	32
REFERÊNCIAS	35

CAPÍTULO 2. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ELL-PBT) PARA DETERMINAÇÃO DO FUNGICIDA FLUOPIRAM EM AMOSTRAS DE ÁGUA POR CLAE-DAD

RESUMO	48
ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 Equipamentos e reagentes	51
2.2 Análises cromatográficas	51
2.3 Otimização do método de extração	52
2.4 Validação do método de extração	54
2.4.1 Seletividade.....	54

2.4.2 Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD).....	54
2.4.3 Precisão e exatidão	54
2.4.4 Linearidade	55
2.4.5 Efeito de matriz	55
2.5 Amostras reais	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1. Otimização das condições cromatográficas.....	57
3.2. Otimização das condições de extração.....	62
3.3. Validação	66
3.3.1 Seletividade	67
3.3.2 Limites de quantificação e detecção.....	67
3.3.3 Precisão e exatidão	68
3.3.4 Linearidade	68
3.3.5 Efeito de matriz	71
3.4 Aplicabilidade da amostra real.....	71
3.5 Comparação entre métodos de extração.....	72
4. CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	77

CAPÍTULO 3. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ESL-PBT) MINIATURIZADA PARA DETERMINAÇÃO DE FLUOPIRAM EM DIFERENTES TIPOS DE SOLO

RESUMO	82
ABSTRACT	83
1. INTRODUÇÃO.....	84
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1 Reagentes.....	85
2.2 Amostras de solos.....	85
2.3 Equipamentos.....	86
2.4 Otimização das condições cromatográficas.....	86
2.5 Otimização do método de extração	87
2.6 Validação do método de extração.....	87
2.7 Aplicação em amostra real.....	88
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90

3.1 Otimização das condições cromatográficas.....	91
3.2 Otimização do método de extração	91
3.3 Validação.....	92
3.3.1 Seletividade	92
3.3.2 Limites de detecção e de quantificação.....	93
3.3.3 Linearidade	94
3.3.4 Exatidão e precisão.....	99
3.3.5 Efeito de matriz	99
3.3.6 Aplicação em amostra real	100
3.3.7 Comparação com outras metodologias	100
4. CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS.....	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109

CAPÍTULO 1. REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos constituem um grupo extremamente heterogêneo de compostos químicos, apresentando finalidades distintas na agricultura, atuando como inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, nematicidas e fumigantes (SHARMA *et al.*, 2018). O impacto ambiental causado pelo uso dos agrotóxicos, tem suscitado uma preocupação crescente ao longo dos anos, principalmente devido às atividades agrícolas intensivas e à ocorrência generalizada destes no ambiente e nas *commodities* alimentares (CORDOVA *et al.*, 2017). Muitos desses compostos químicos provaram ser persistentes, altamente tóxicos e acumulativos no ambiente aquático e no solo (CLIMENT *et al.*, 2019).

Os inibidores da succinato desidrogenase são uma classe de fungicidas inibidores da respiração celular de amplo espectro utilizados para o manejo de doenças causadas por fungos e nematoides fitopatogênicos (PENG *et al.*, 2021). Foi rapidamente adotado pela indústria agrícola para controlar uma série de doenças fúngicas (SANG e LEE, 2020; PENG *et al.*, 2021) e causadas por nematoides. O fluopiram, um fungicida e nematicida inibidor da succinato desidrogenase, tem sido amplamente utilizado para o controle de pragas agrícolas e afeta toxicologicamente organismos não-alvo (LIU *et al.*, 2022). Devido ao seu uso extensivo, recentemente surgiram preocupações sobre os efeitos toxicológicos (MATADHA *et al.*, 2019). Diante deste cenário, o monitoramento contínuo deste analito no ambiente e em matrizes alimentares é importante e necessário para assegurar a saúde das pessoas e do meio ambiente.

Os métodos de preparo de amostras utilizados para extrair o fluopiram em diversas matrizes, têm sido a extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS), microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) e QuEChERS (Rápido, Fácil, Econômico, Efetivo, Robusto e Seguro) (GUAN *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2014; GULKOWSKA *et al.*, 2014; ABAD-FUENTES *et al.*, 2015; GAN *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2016; FILIPPO *et al.*, 2017; MATADHA *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019; VALERA-TARIFA *et al.*, 2020). Entretanto, até o presente momento não há estudos realizados aplicando a extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) e a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) para o fluopiram nas matrizes água e solo. A ELL-PBT e ESL-PBT apresentam algumas vantagens em relação às técnicas tradicionais, como praticidade, baixo número de etapas, pequena quantidade de amostra e solventes orgânicos, além de ser confiável e seletiva (ARAÚJO *et al.*, 2015).

A identificação e quantificação desse fungicida já foi realizada por técnicas como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo (CL-EM/EM), cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-DCE), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo (CG-EM/EM), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo com ionização por electrospray (CLAE-IES-EM/EM) e ultra cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo (UCLAE-EM/EM) (GUAN *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2014; GULKOWSKA *et al.*, 2014; ABAD-FUENTES *et al.*, 2015; GAN *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2016; FILIPPO *et al.*, 2017; MATADHA *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019; VALERA-TARIFA *et al.*, 2020).

Dessa forma, pretende-se com este estudo otimizar e validar o método extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) combinada à cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) e a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) na versão miniaturizada e detecção por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para determinação do fungicida e nematicida fluopiram em amostras de água e solo, além de aplicar estes métodos em amostras coletadas na região do sul do estado de Minas Gerais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimizar e validar a extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) para determinar o fluopiram em amostras de água por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) e a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) na versão miniaturizada para determinação do fluopiram em amostras de solos arenosos, argilosos e com textura média por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

2.2 Objetivos Específicos

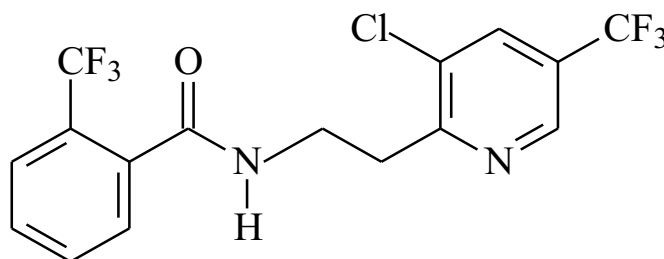
- a) Estabelecer as condições ideais para extrair o fluopiram de amostras de água usando a ELL-PBT;
- b) Estabelecer as condições ideais para quantificar o fluopiram por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodo;
- c) Estabelecer as condições ideais para extrair o fluopiram de amostras de solos arenosos, argilosos e com textura média usando uma versão miniaturizada da ESL-PBT;
- d) Estabelecer as condições ideais para quantificar o fluopiram em amostras de solos arenosos, argilosos e com textura média por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas;
- e) Validar as metodologias otimizadas através da seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, efeito de matriz, precisão e exatidão;
- f) Aplicar os métodos otimizados e validados em diferentes amostras reais de água e solo.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Fluopiram

O fluopiram (N-[2-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridin-2-il]etil]-2 (trifluorometil) benzamida) é um fungicida e nematicida do grupo das benzamidas pirâmidas, usado em tratamento de sementes e pulverização de culturas de interesse agrícola. Este composto foi desenvolvido pela Bayer Crop Science em 2001 (SHI *et al.*, 2021), mas sua comercialização só ocorreu a partir de 2011 (LABOURDETTE *et al.*, 2011). No Brasil, o uso deste fungicida só foi aprovado através do Ato nº 62 de 13 de setembro de 2019. Os produtos à base de fluopiram com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle de nematoides, são o Verango Prime® (Fluopiram – Bayer) possui registro para o controle de *Meloidogyne javanica* em batata, *Meloidogyne exigua* em café, *Pratylenchus zae* em cana e *Pratylenchus brachyurus* em soja e o Ileva®, desenvolvido pela Basf, possui registro para *Meloidogyne incognita* em algodão e milho, e *Pratylenchus brachyurus* em algodão, milho e soja (AGROFIT, 2023). O fluopiram age inibindo a enzima succinato desidrogenase do complexo II da cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias, impedindo a síntese de ATP de fungos que atacam mais de 200 espécies de plantas (VELOUKAS e KARAOGLANIDIS, 2012). A Figura 1 exibe a estrutura química da molécula do fluopiram.

Figura 1 - Estrutura química da molécula do fluopiram.



Fonte: SLOWIK-BOROWIEC, M.; SZPYRKA E., 2019.

O fluopiram possui baixa solubilidade em água e alta solubilidade em solvente orgânico evidenciado pelo alto valor do coeficiente de partição (*K_{ow}*). Em condições ambientais ele é pouco volátil devido a sua baixa pressão de vapor. O valor do coeficiente de adsorção em solo (*K_{oc}*) variando de 266 a 460 sugere uma mobilidade moderada do composto no solo. No solo foi identificado que o fluopiram pode impactar negativamente

na atividade microbiológica e, conseqüentemente, a produtividade (ZHANG *et al.*, 2014). Além disso o fluopiram é altamente persistente no solo em condições ambientais (EFSA, 2013). Matadha *et al.* (2020) detectou fluopiram no solo 80 dias após a aplicação em cultivo de pimentão. Este composto apresenta tempo de meia vida de 20,5 dias, comprovando assim que se degrada lentamente na água (ASSUNÇÃO *et al.*, 2020). Algumas informações sobre esse composto são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Informações sobre o fluopiram

Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₁ ClF ₆ N ₂ O
Número CAS	658066-35-4
Massa molar	396,72 g mol ⁻¹
Temperatura de fusão	117,5 °C
Pressão de vapor	1,2 x 10 ⁻⁶ Pa a 20 °C
Solubilidade em água	16 mg L ⁻¹
<i>Kow</i>	2060
<i>Koc</i>	266 – 460

CAS: *Chemical Abstracts Service*; *Kow*: Coeficiente de partição octanol/água; *Koc*: Coeficiente de adsorção em solo.

Fonte: Labourdette *et al.*, 2011; Chawla *et al.*, 2018.

Estudos prévios demonstraram a eficiência do fluopiram em diversas culturas. Watson, Noling e Desaegeer (2020) observaram redução considerável da população de nematoides *Belonolaimus longicaudatus* em cultura de morangos. Em cultura de beterraba Storelli *et al.* (2020) notaram que o fluopiram teve impacto positivo contra podridões radiculares causadas por *Ditylenchus dipsaci*. Vitale, Panebianco e Polizzi (2016) relataram que o uso do fluopiram foi eficiente no controle de *Botrytis cinérea* em uvas. Entretanto outros estudos têm mostrado impactos negativos do fluopiram na fauna e flora. Robatscher *et al.* (2019) identificaram uma desordem no crescimento de parreirais da espécie *Vitis vinifera* ocasionado por um metabólito do fluopiram, o ácido 3-Cloro-5-trifluorometilpiridina-2-carboxílico. Em outros estudos, altas doses de fluopiram induziram a formação de tumores na tireoide de ratos machos e de tumores hepáticos em ratos fêmea (TINWELL *et al.*, 2014). A alta lipofilicidade do fluopiram também pode levantar preocupações sobre sua capacidade de bioacumulação¹ e biomagnificação² (PARLAKIDIS *et al.*, 2021). O fluopiram pode ser movido facilmente para a parte comestível das plantas, o que pode representar um alto risco para as pessoas. Além disso, uma vez que o

pesticida é distribuído pela planta, ele se degrada em vários metabólitos. Com isso, surge a preocupação com a persistência de resíduos de fungicidas e seus metabólitos nas partes comestíveis, que podem se tornar importante via de exposição humana (DONG; HU, 2014).

O mecanismo de toxicidade deste composto, refere-se à indução de enzimas hepáticas do citocromo P450 (ILEVO, 2023; VERANGO PRIME, 2023). Os produtos resultantes da catálise desempenhada pelos citocromos P450 podem possuir um potencial tóxico, processo denominado ativação metabólica. O produto gerado a partir desse metabolismo decompõe-se em um agente eletrofilico extremamente reativo (como exemplo as nitrosaminas), podendo, então, reagir com o DNA e levar à mutação e à consequente formação de tumores (FERREIRA et al., 2007; BRITO *et al.*, 2014). O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) classificou este fungicida como um produto muito perigoso ao meio ambiente (BRASIL, 2019). O fluopiram já foi empregado em mais de 70 culturas, incluindo videiras e uvas de mesa, pomóideas e frutas com caroço e vegetais (LABOURDETTE *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2020). A Tabela 2 exibe o uso agrícola do fungicida/nematicida fluopiram segundo a legislação brasileira.

Tabela 2 - Uso agrícola do fungicida fluopiram no Brasil

Cultura	Aplicação	LMR (mg kg ⁻¹)	Intervalo de segurança (dias)
Algodão	Foliar	0,50	20
Algodão	Sementes	0,50	(1)
Batata	Sulco de plantio	0,10	80
Café	Solo (via drench ³)	0,03	90
Cana-de-açúcar	Sulco de plantio	0,02	(1)
Feijão	Foliar	0,30	20
Milho	Sementes	0,02	(1)
Soja	Foliar	0,20	20
Soja	Sementes	0,20	(1)
Soja	Sulco de plantio	0,20	(1)

(1) Intervalo de segurança não determinado devido à modalidade de emprego; LMR: Limite máximo de resíduo.

Fonte: adaptado de BRASIL, 2019.

Para estudo e determinação do fluopiram em água e solo são necessários métodos de extração e técnicas de análise instrumental. A maioria dos estudos da literatura utilizou o método QuEChERS na extração deste composto (DONG e HU, 2014; PATEL *et al.*, 2016;

¹ Processo pelo qual substâncias são absorvidas pelos organismos do meio abiótico ou biótico (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

² Processo pelo qual a concentração do composto aumenta ao longo da cadeia alimentar (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

³ Trata-se da aplicação de produtos de forma dosada em um jato dirigido (MATUO et al., 2008)

2021) mas a extração sólido-líquido convencional também foi aplicada por Zhou *et al.* (2021) e Matadha (2020), Mohapatra e Siddamallaiah (2021). A análise instrumental do fluopiram pode ser realizada tanto por cromatografia líquida como por cromatografia em fase gasosa.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas foi descrita em vários estudos (PATEL *et al.*, 2016; CHAWLA *et al.*, 2018; MAHDAVI *et al.*, 2021). A cromatografia em fase gasosa também se mostrou muito sensível na análise do fluopiram e a maioria dos estudos utilizou-a acoplada à espectrometria de massas (DONG e HU, 2014; WEI *et al.*, 2016; KATNA *et al.*, 2018; MATADHA; MOHAPATRA; SIDDAMALLAIAH, 2020) entretanto, Podbielska *et al.* (2017) também conseguiu boa sensibilidade utilizando um cromatógrafo a gás com detector de nitrogênio e fósforo. Neste trabalho as técnicas de análise empregadas para o fungicida fluopiram foram a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE- DAD) e a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

3.2 Métodos para extração e quantificação do fungicida e nematicida fluopiram em diferentes matrizes.

Os métodos de extração líquido-líquido convencional, extração em fase sólida, microextração em fase sólida, microextração líquido-líquido e microextração líquido-líquido dispersiva são usualmente utilizadas para extração de agrotóxicos em amostras de água (TANKIEWICZ *et al.*, 2011).

O método QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro do inglês (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) é o mais empregado na extração do fluopiram no solo (DONG e HU, 2014; PATEL *et al.*, 2016; MOHAPATRA *et al.*, 2018; CHAWLA *et al.*, 2018; KATNA *et al.*, 2018; MAHDAVI *et al.*, 2021). Porém a extração em fase sólida (GUAN *et al.*, 2012), a extração em fase sólida dispersiva (DONG *et al.*, 2016) e a extração sólido-líquido (MATADHA, MOHAPATRA e SIDDAMALLAIAH, 2020; ZHOU *et al.*, 2021) também foram empregados na extração deste composto no solo. A Tabela 3 exhibe diferentes métodos de extração descritos na literatura para quantificação do fungicida fluopiram em diferentes matrizes.

Tabela 3 - Métodos de extração e técnicas de análise descritas na literatura para quantificação do fluopiram em diferentes matrizes

Matriz	Metodologia para extração	Técnicas de análise	LD	LQ	Recuperação (%)	Referência
Pepino e solo	EFS	CG-DCE	-	0,003 mg kg ⁻¹	-	Guan <i>et al.</i> (2012)
Melancia e solo	EFS-d	CG-EM	-	0,010 mg kg ⁻¹	88,2–106,0	Dong <i>et al.</i> (2014)
Água	EFS	CL-EM/EM	0,1–2,0 ng L ⁻¹	≤5,000 ng mg ⁻¹	90,0	Gulkowska <i>et al.</i> (2014)
Maçã	QuEChERS	CLAE – EM/EM	0,8-2,0 µg L ⁻¹	-	81,0 – 115,0	Abad-Fuentes <i>et al.</i> (2015)
Morango				-	84,0 – 136,0	
Tomate				-	84,0 – 135,0	
Espinafre				-	80,0 – 136,0	
Tecido de peixe	EFS	CL – EM/EM	0,1 ng g ⁻¹	0,30 ng g ⁻¹	80,4-99,2	Gan <i>et al.</i> (2016)
Tomate	QuEChERS	CG-EM/EM	-	-	90,5-95,6	Wei <i>et al.</i> (2016)
Pepino			-	-	92,0-93,2	
Pimenta			-	-	89,0-95,4	
Solo			-	-	88,5-95,1	
Matéria particulada (aerossóis)	EFS	CLAE-IES- EM/EM	78,0 mg mL ⁻¹	258,0 mg mL ⁻¹	74,0-78,0	Filippo <i>et al.</i> (2017)

Continuação da Tabela 3 - Métodos de extração e técnicas de análise descritas na literatura para quantificação do fluopiram em diferentes matrizes

Matriz	Metodologia para extração	Técnicas de análise	LD	LQ	Recuperação (%)	Referência
Tomate Pimentão	QuEChERS	CL-EM/EM	1,50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	70,0-120,0	Matadha <i>et al.</i> (2019)
Melancia	MELLD	UCLAE-EM/EM	0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	93,6	Wu <i>et al.</i> (2019)
Purê de morango concentrado	QuEChERS	UCLAE-EM/EM	0,04–0,22 mg kg^{-1}	6,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	70,0-120,0	Valera-Tarifa <i>et al.</i> (2020)
Purê de morango			0,01–0,18 mg kg^{-1}			
Polpa de morango			0,02–0,07 mg kg^{-1}			

QuEChERS: Quick (rápido), Easy (fácil), Cheap (econômico), Effective (efetivo), Rugged (robusto) e Safe (seguro); MELLD: microextração líquido-líquido dispersiva; EFS: extração em fase sólida; EFS-d: extração em fase sólida dispersiva; CL-EM/EM: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo; CG-DCE: Cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons; CG-EM: Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas; CL-EM/EM: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo; CG-EM/EM: cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo; CLAE-IES-EM/EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo com ionização por electrospray; UCLAE-EM/EM: ultra cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo.

Trabalhos recentes têm demonstrado a versatilidade e a eficiência da aplicação do método de ELL-PBT e ESL-PBT, dando respaldo para as suas utilizações na determinação de diversos contaminantes. Até o presente momento não há estudos realizados com a ELL-PBT e a ESL-PBT em amostras de fluopiram na matriz água e solo.

3.3 Extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT)

A ELL-PBT foi desenvolvida por McCulley e McKinley em 1964 para determinação de pesticidas clorados em gordura (MAIA *et al.*, 2017). Em 2007, esta metodologia foi denominada como extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por Vieira e colaboradores (2007). Atualmente denominada de extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura. A ELL-PBT consiste em uma técnica alternativa de preparo de amostras, sendo relatada como uma metodologia inovadora, simples e versátil para a extração de diferentes analitos em matrizes aquosas (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007; BARROS *et al.*, 2018). Essa metodologia apresenta vantagens em relação às demais devido ao reduzido número de etapas, praticidade, baixo custo, menor consumo de amostra e solventes orgânicos (SOUSA *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2015; PAULA *et al.*, 2018). A ELL-PBT baseia-se na adição de solvente orgânico à amostra aquosa, formando uma fase única. Estudos indicam que a proporção (2:1) solvente orgânico:água (v:v) apresenta melhores resultados de extração (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007; REZENDE *et al.*, 2017; MESQUITA *et al.*, 2017). Posteriormente, a mistura é homogeneizada e submetida à redução de temperatura (-20 °C), permitindo que a água congele e o solvente orgânico permaneça líquido. Dessa forma, ocorre a partição entre o solvente orgânico e a amostra aquosa, formando um sistema bifásico. Os componentes da amostra são congelados com a água, enquanto que o analito alvo é extraído pela fase orgânica, não sendo necessária etapa adicional de limpeza do extrato obtido (PINHO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2014; REGO *et al.*, 2015). O tempo de 1 h tem sido relatado como suficiente para congelamento da fase aquosa, atingindo porcentagens de recuperação próximas a 100% (RUDAKOV *et al.*, 2016; MESQUITA *et al.* 2017; SICUPIRA *et al.* 2019).

Para a otimização da ELL-PBT, geralmente são estudados os parâmetros da composição da fase extratora e adição de sais ao sistema. Com relação à fase extratora, a acetonitrila é o solvente orgânico mais empregado neste método (SILVÉRIO *et al.*, 2012), devido a sua propriedade de formar um sistema de duas fases com a água a temperaturas abaixo de -20 °C sem congelar (SAZONOV *et al.*, 2002). A adição de novos solventes orgânicos, tais como metanol, acetato de etila e isopropanol, em diferentes proporções pode promover

pequenas mudanças na polaridade da fase extratora, desde que a quantidade do novo solvente a ser adicionado não provoque o rompimento da fase única formada pela acetonitrila:água à temperatura ambiente de 25 °C (PINHO *et al.*, 2010). A eficiência desta metodologia pode ser aumentada pela adição de sais ao sistema de extração, como o cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de magnésio (MgSO₄), que promovem o efeito *salting-out* (RUDAKOV *et al.*, 2016). A presença de sais proporciona o aumento da força iônica da solução aquosa acarretando, então, na redução da solubilidade dos compostos (ZHUO *et al.*, 2015). A Tabela 4 exhibe a aplicação do método da ELL-PBT descritas na literatura em matrizes aquosas.

Tabela 4 - Aplicação do método da ELL-PBT descrita na literatura em matrizes aquosas

Analito	Matriz	Fase extratora	Tempo de congelamento (horas)	Sal	Técnicas de análise	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
Cipermetrina, Deltametrina, λ -cialotrina e Permetrina	4,0 mL de água	8,0 mL acetonitrila	6	NaCl	CG- DIC	1,9	2,7	92,2	Vieira <i>et al.</i> (2007)
						2,9	5,5	82,3	
						1,1	7,6	87,2	
						3,2	9,5	93,4	
Aldicarbe, Carbofurano Carbaril	2,0 mL de água	4,0 mL de acetonitrila	3	NaCl	CLAE-UV	10,0	33,0	90,0	Goulart <i>et al.</i> (2010)
						10,0	33,0	95,0	
						5,0	17,0	96,0	
Clorpirifós λ -cialotrina Permetrina Bifentrina	4,0 mL de água	8,0 mL acetonitrila	1	-	CLAE-UV	3,4	10,0	20,0	Silverio <i>et al.</i> (2012)
						3,0	10,0	98,0	
						3,0	10,0	105,0	
						2,0	10,0	98,0	
								103,0	
Aldicarbe Carbofuran Carbaril	2,0 mL de suco de uva integral e 2,0 mL de leite com chocolate esterilizado	4,0 mL de acetonitrila	3	-	CLAE-UV	15,0	50,0	94,3	Goulart <i>et al.</i> (2012)
						15,0	50,0	96,6	
						8,0	25,0	96,2	

Continuação da Tabela 4 - Aplicação do método da ELL-PBT descrita na literatura em matrizes aquosas

Analito	Matriz	Fase extratora	Tempo de congelamento (horas)	Sal	Técnicas de análise	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
Cloranfenicol	2,0 mL de leite	4,0 mL de acetonitrila	4	-	UCLAE-EM/EM	0,02	0,05	94,0 – 114	Rego Pires <i>et al.</i> (2015)
Clorpirifós	6,0 mL de água	6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila	3	Na_2HPO_4	CG-DCE	0,5	1,67	70,0 – 120,0	Da Silveira <i>et al.</i> (2016)
Azoxistrobina Difenoconazol Clorotalonil	4,0 mL de água	4,0 mL de acetonitrila	6	-	CG-DCE	2,4 0,7 4,2	7,99 2,33 13,98	90,9 93,3 94,9	Rodrigues <i>et al.</i> (2017)
Formaldeído	2,5 mL de leite	5,0 mL de solução de DNPH 0,1g L^{-1} em acetonitrila	*8	-	CLAE-UV	6,0	20,00	102,2	Rezende <i>et al.</i> (2017)
Aldicarbe	2,0 mL de amostra de água,	4,0 mL de acetonitrila	3	NaCl	CLAE-UV	10,0	-	-	Almeida <i>et al.</i> (2018)

*Amostra congelada com Nitrogênio líquido.

Continuação da Tabela 4 - Aplicação do método da ELL-PBT descritas na literatura em matrizes aquosas

Analito	Matriz	Fase extratora	Tempo de congelamento (horas)	Sal	Técnicas de análise	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
Dioxina Furano	4,0 mL de água	8,0 mL do acetonitrila	1	-	CLAE-DAD	2,7	5,3	113,2	Sicupira <i>et al.</i> (2019)
						2,7	5,3	99,9	
Azoxistrobina Clorotalonil Difenoconazol	4,0 mL de água	4,0 mL de acetonitrila	3	-	CG / DCE	2,4 0,7 4,2	7,9 2,3 13,9	90,9 93,3 94,9	Rodrigues <i>et al.</i> (2021)
2,4-D	4,0 mL de água	8,00 mL da fase extratora	1	Na ₂ SO ₄ anidro	CLAE-DAD	-	2.0	100,0	Freitas <i>et al.</i> (2020)
Clonazepam	3,0 mL de bebida	3,00 mL de acetonitrila	0,25	-	Espectroscopia -UV	$1,9 \cdot 10^{+3}$	-	-	Alves <i>et al.</i> (2020)

CG- DIC: cromatografia gasosa com detector por ionização em chama; CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta; UCLAE-EM/EM: ultra cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo; CG-DCE: cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons; CLAE-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodo.

3.4 Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT)

A extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) é baseada no princípio proposto por Anglin e Mckinley (1960). A extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura é um método muito utilizado no estudo de contaminantes químicos, como os agrotóxicos, em amostras ambientais e alimentares (RODRIGUES *et al.*, 2018; PEREIRA, SILVÉRIO e PINHO, 2019). A ESL-PBT consiste na adição de água e solvente orgânico miscíveis em temperatura ambiente, mas com diferentes temperaturas de solidificação, na proporção 1:2 em um *vial* contendo a amostra sólida. Após a homogeneização o sistema é levado para o congelamento onde ocorre a separação do solvente orgânico. Assim, o analito de interesse passa para a fase orgânica e os interferentes da matriz ficam presos na água congelada (PINHO *et al.*, 2010; RAMALHO *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2020). Este método tem se destacado por ser simples, rápido, fácil de executar e compatível para uma grande variedade de matrizes e analitos de interesse. Outro ponto interessante do método é a extração e limpeza dos extratos em uma única etapa, pois os interferentes da matriz ficam retidos na fase aquosa congelada (HELENO *et al.*, 2019). Diversos estudos na literatura já aplicaram a ESL-PBT para determinação de analitos em amostras de solo (MESQUITA *et al.*, 2017; Da SILVA *et al.*, 2019; JUNIOR *et al.*, 2022), cenoura (SOUZA *et al.*, 2019), pimentão (HELENO *et al.*, 2019), arroz (De ÁVILA *et al.*, 2020) e, recentemente, uma versão miniaturizada do método foi empregada na determinação do agrotóxico fipronil em cascas de ovos de tartaruga (AMBROSIO *et al.*, 2022).

Dentre os parâmetros otimizados na ESL-PBT estão a fase extratora, modo e tempo de agitação, tempo de congelamento, força iônica e *clean up*. As fases extratoras mais comuns são acetonitrila e uma mistura de 6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila (RODRIGUES *et al.*, 2018). A agitação pode ser realizada em vórtex, banho ultrassônico, mesa agitadora e agitador orbital por diferentes tempos (PEREIRA, SILVÉRIO e PINHO, 2019; RAMALHO *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2021). O tempo de congelamento varia muito entre estudos, em alguns casos uma hora de congelamento já é suficiente para que ocorra a separação do solvente orgânico e limpeza do extrato, já em outros estudos o tempo necessário foi de seis horas (RAMALHO *et al.*, 2019; AVILA *et al.*, 2020). A adição de sais para aumentar a força iônica em alguns casos pode elevar a porcentagem de recuperação dos analitos de interesse (RODRIGUES *et al.*, 2018). Apesar da ESL-PBT promover a limpeza dos extratos, quando se trabalha com matriz complexa pode ser necessário uma etapa de *clean up* adicional como ocorreu no trabalho de Mesquita *et al.* (2017) que extraiu poluentes orgânicos persistentes

em lodo de esgoto. A Tabela 5 exibe a aplicação do método da ESL-PBT descritas na literatura na matriz solo.

Tabela 5 - Aplicação do método da ESL-PBT descritas na literatura na matriz o solo

Analito	Matriz	Fase extratora	Tempo de congelamento (horas)	Sal	Técnicas de análise	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
Lindano Hexaclorobenzeno Heptaclorobenzeno Aldrin Transclordano <i>Cis</i> -clordano Dieldrin Endrin DDT Mirex	solo	8 mL Acetonitrila	1	Na ₂ SO ₄ anidro	CG-EM	–	0,5 a 6	70–115	Mesquita <i>et al.</i> (2017)
Clomazone	solo	6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila	3	Na ₂ SO ₄ anidro	CLAE - UV-Vis	6,5	19	90,1–102,0	Da Silva <i>et al.</i> (2019)
Sulfentrazone	Argissolo Latossolo	6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila	3	Na ₂ SO ₄ anidro	CLAE-UV -Vis	0,6 21,0	2,0 69,2	71,0–114,4	Junior <i>et al.</i> (2022)

3.5 Técnicas de análise instrumental empregadas para o fungicida e nemacida fluopiram

As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para separação, identificação e quantificação de agrotóxicos em diversas matrizes complexas (PINHO *et al.*, 2010). Nela os analitos são separados para, em seguida, serem identificados e quantificados. O processo de separação tem como base as diferenças nas características químicas e físicas apresentadas pelos compostos que constituem as amostras. Dentre as características dos analitos que permitem a separação entre eles estão a polaridade, o tamanho e a forma molecular, a carga iônica e a volatilidade (KUJAWSKI; NAMIESNIK, 2008). A versatilidade da cromatografia está associada a possibilidade de escolha de equipamentos que contenham fases móveis, fases estacionárias e detectores apropriados às características do conjunto de analitos presentes nas amostras (DIAS, *et al.*, 2016).

As técnicas de análise empregadas para o fungicida fluopiram podem ser visualizadas na Tabela 3 (página 20). A identificação e quantificação desse fungicida já foi realizada por técnicas como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo (CL-EM/EM), cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-DCE), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo (CG-EM/EM), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo com ionização por electrospray (CLAE-IES-EM/EM) e ultra cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo (UCLAE-EM/EM) (GUAN *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2014; GULKOWSKA *et al.*, 2014; ABAD-FUENTES *et al.*, 2015; GAN *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2016; FILIPPO *et al.*, 2017; MATADHA *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019; VALERA-TARIFA *et al.*, 2020). Neste trabalho as técnicas de análise empregadas para o fungicida fluopiram foram a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE- DAD) e a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

3.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD)

A CLAE é uma técnica físico-química de separação onde os analitos se distribuem por duas fases que se encontram em íntimo contato, a fase estacionária e a fase móvel líquida (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Na prática, a fase estacionária é o “suporte” contido

no interior da coluna, pela qual passa um fluxo contínuo de fase móvel ou eluente (ANDRADE *et al.*, 2006). As principais vantagens da CLAE estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (TONHI *et al.*, 2002). Em comparação com a cromatografia gasosa e outros métodos analíticos, a técnica da CLAE é fácil de manusear e econômica (MAHAJAN; CHATTERJEE, 2018). Métodos utilizando a CLAE têm sido amplamente empregados em análises de contaminantes orgânicos em matrizes ambientais (GAN *et al.*, 2016).

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE – DAD) é uma ferramenta analítica frequentemente utilizada na detecção de resíduos de agrotóxicos em amostras de água (CALDAS, 2011; SILVA, 2011). A CLAE – DAD é confiável, rápida, simples e econômica (FUKUSHIMA *et al.*, 2022). Um arranjo de diodos consiste em uma série de fotodiodos detectores posicionados lado a lado em um cristal de silício, onde todo comprimento de onda difratado atinge um ponto deste arranjo. O detector permite determinar simultaneamente a absorvância de uma amostra em todos os comprimentos de onda (HARRIS, 2012).

3.5.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma técnica para separação e análise de misturas de substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida onde em um fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel ou gás de arraste, específico para cada detector. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação dos compostos (COLLINS *et al.*, 2006). A CG é, atualmente, uma das técnicas de maior uso. É utilizada para separação e quantificação de produtos diversos, podendo também ser usada como técnica de identificação, em casos especiais, principalmente quando acoplada a um espectrômetro de massa (CG-EM) (SILVA *et al.*, 2003).

Neste trabalho o método de ionização empregado é por impacto de elétrons (IE), onde o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons em estado de alta energia (geralmente 70 eV). As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron ($M^{+\bullet}$), que ao chegar no detector gera um sinal para um sistema de registro e tratamento dos dados (CHIARADIA *et al.*, 2008). O registro deste sinal em função

do tempo é o cromatograma, as substâncias aparecem neste cromatograma como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa (COLLINS *et al.*, 2006).

A quantificação cromatográfica é uma etapa fundamental no desenvolvimento dos métodos analíticos, sendo essencial na determinação correta da concentração destes na amostra selecionada. Dentro deste contexto, divergências nos valores das áreas cromatográficas obtidas para uma mesma quantidade de agrotóxico podem prejudicar enormemente a quantificação e a exatidão dos estudos quantitativos (CARDOSO; FREITAS, 2020).

3.6 Validação de métodos analíticos

O processo de validação consiste no estabelecimento de limites que atribuam à técnica estudada a aplicabilidade ao longo da sua execução. Para a obtenção destes limites, são aplicados parâmetros que assegurem a qualidade das medidas instrumentais e confiabilidade estatística dos cálculos (RIBEIRO; FERREIRA, 2008; INMETRO, 2018). No Brasil, agências credenciadas, como o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), disponibilizam guias para validação de métodos. No âmbito internacional, há a União Internacional de Química pura e Aplicada (IUPAC) e a Comissão Europeia que também estabelecem parâmetros de validação a serem seguidos. O processo de validação passa por uma série de ensaios que incluem, dentre outros: seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, linearidade, efeito de matriz e outros parâmetros estatísticos de análise descritiva (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

A seletividade é o parâmetro responsável pela certeza da identificação pelo método para a variável de resposta trabalhada, obtendo assim a relação de impurezas e interferentes que possam gerar identificações falsas no método estudado (IAMMARINO *et al.*, 2016). Esse parâmetro deve ser continuamente verificado no decorrer dos testes para os demais parâmetros (GOES JUNIOR *et al.*, 2019). Para avaliar esse parâmetro, o método a ser validado deve ser aplicado a amostra livre do analito alvo (amostra branca) e a amostra fortificada com o analito em concentração conhecida, com pelo menos 6 repetições independentes para cada amostra. Em seguida, devem ser realizadas comparações visuais dos cromatogramas obtidos (análise qualitativa), sendo que a ausência de sinais cromatográficos no tempo de retenção do composto alvo para a amostra branca indica que o método é seletivo (THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA, 2007).

O parâmetro LD indica o menor valor de uma variável (concentração) que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado para os limites de exatidão e precisão exigidos pelo método (SANTOS *et al.*, 2014). Já o parâmetro LQ indica a menor quantificação possível para o analito dentro de um determinado método avaliado (CASSINI *et al.*, 2013). Em trabalhos de validação de métodos analíticos, o LD e LQ são comumente obtidos com base nos parâmetros da curva analítica ou na razão sinal e ruído gerados nos equipamentos eletrônicos (SANTOS, 2018). Neste trabalho foi utilizado a relação sinal/ruído gerado no equipamento eletrônico.

Um método é preciso quando os resultados obtidos por meio de ensaios independentes com as mesmas amostras e padrões em condições definidas, são preparadas de acordo com o método analítico a ser validado, após análise apresentam valores muito próximos, a um valor central. A exatidão de um método analítico é obtida pela aproximação dos valores entre resultados avaliados de forma individuais da análise em relação ao valor de referência, que normalmente é dado por meio de ensaios de recuperação. Os testes de precisão e exatidão são utilizados para dar confiança aos métodos de análise de substâncias em quantidades muito baixas (ANVISA, 2017).

A linearidade busca identificar um comportamento diretamente proporcional entre a concentração e uma resposta dentro de um intervalo determinado (BARROS *et al.*, 2018). Geralmente desconhecido antes do teste, o comportamento pode ser verificado empiricamente através da obtenção de uma curva analítica em que os dados obtidos são levados à regressão linear resultando em um equacionamento descritivo do comportamento observado (DURAND *et al.*, 2016). Ou seja, a primeira etapa da avaliação da linearidade consiste em determinar o intervalo de concentração da curva analítica (faixa de linearidade). Em seguida, construir uma curva analítica com pelo menos seis níveis de concentração equidistantes e com três repetições independentes para cada nível. Essa curva deve ser preparada em extrato da matriz. Finalizando esta etapa, deve-se realizar as análises das soluções preparadas para obtenção dos dados experimentais (THOMPSON *et al.*, 2002; DE SOUZA, 2007; INMETRO, 2018; NATA, 2018). A segunda etapa do estudo da linearidade consiste em aplicar o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), e seus resíduos avaliados através dos testes de normalidade (Teste de Ryan-Joiner), homocedasticidade (Teste de Brown-Forsythe) e independência (Teste de Durbin-Watson). Os valores extremos (*outliers*) são avaliados e excluídos com base no teste de resíduos de Jackknife, com exclusão máxima de 22,2% dos dados. A análise de variância (ANOVA) é utilizada para avaliar a significância da regressão e do desvio da linearidade (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

O efeito de matrix (EM) é um fenômeno que resulta em resposta cromatográfica aumentada ou diminuída quando uma mesma quantidade de analito é injetada em solução padrão preparada na presença da matriz comparada a uma solução preparada em solvente puro (HAJLOVÁ; ZROSTLÁKOVÁ, 2003). O EM é causado pela interferência de vários constituintes que integram a matriz. No caso de matrizes mais complexas, como as alimentares, esse efeito é mais pronunciado e, por isso, uma etapa adicional de limpeza dos extratos pode ser necessária para amenizá-lo (PINHO *et al.*, 2010; EC, 2017; NATA, 2018). Esse efeito também conhecido como "aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz", é usado para explicar as taxas de recuperação de agrotóxicos que excederem 100% e a baixa precisão de resultados (CARDOSO; FREITAS, 2020). O efeito de matriz, além de gerar porcentagens de recuperação superiores a 100%, pode causar outras alterações na análise cromatográfica, como:

a) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo. Isso ocorre, por exemplo, quando há perdas de quantidade do agrotóxico no sistema de injeção, fornecendo baixa resposta e dificultando a integração (SÁNCHEZ-BRUNETE; ALBERO; MARTÍN; TADEO, 2005; PINHO, 2010);

b) erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse quando, na verdade, este está ausente, gerando resultado falso positivo. Este problema é mais fácil de ser contornado, com a utilização de um espectrômetro de massas para monitoramento dos analitos (CARDOSO; FREITAS, 2020).

REFERÊNCIAS

- ABAD-FUENTES, Antônio; CEBALLOS-ALCANTARILLA, Eric; MERCADER, Josep V.; AGULLÓ, Consuelo; ABAD-SOMOVILLA, Antônio; ESTEVE-TURRILLAS, Francesc A. Determination of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 407, n. 14, p. 4207-4211, 22 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-8608-3>.
- AGROFIT. SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS, DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 17 fev. 2023.
- ALMEIDA, Monalisa S.; GOULART, Adilson C.; GOULART, Simone M.; SILVA, Tatiana Aparecida da; SANTOS, Joao Paulo V. Analysis of aldicarb in surface water from the paranaíba river. **Periódico Tche Química**, v. 15, n.29, p.31-38, jan. 2018. Disponível em <https://journals.indexcopernicus.com/api/file/viewByFileId/528415.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2022.
- ALVES, Isabela M.; MELO, Nathália O.; MARINHO, Pablo A.; ALMEIDA, Mariana R. Liquid–liquid extraction-assisted SERS-based detection of clonazepam in spiked drinks. **Vibrational Spectroscopy**, [S.L.], v. 110, p. 103112, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103112>.
- AMBROSIO, Isabela S.; OTAVIANO, Cinthia M.; CASTILHO, Lais M.B.; SANTOS, Allyson L.R.; MENDONÇA, Juliana S.; FARIA, Anizio M. Development and validation of a solid–liquid extraction with low-temperature partitioning method for the determination of fipronil in turtle eggshell. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 178, p. 107393, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2022.107393>.
- ANDRADE, Leonardo S.; LAURINDO, Edison A.; OLIVEIRA, Regina V. de; ROCHA-FILHO, Romeu C.; CASS, Quezia B. Development of a HPLC method to follow the degradation of phenol by electrochemical or photoelectrochemical treatment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 369-373, abr. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532006000200022>.
- 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**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 186-189, 1 maio 1960. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf60109a006>.
- ARAÚJO, Emiliane Andrade; LARA, Marcelo César Rosa; REIS, Marcelo Rodrigues dos; VIRIATO, Rodolfo Lázaro Soares; ROCHA, Renata Abadia Reis; GONÇALVES, Rosembergue Gabriel Lima; HELENO, Fernanda Fernandes; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de; TRONTO, Jairo; PINTO, Frederico Garcia. Determination of Haloxypop-Methyl, Linuron, and Procymidone Pesticides in Carrot Using SLE-LTP Extraction and GC-MS. **Food Analytical Methods**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 1344-1352, 23 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-015-0315-3>.

ASSUNÇÃO, T. O. G.; GOMES, F. B. R.; BRANDT, E. M. F.; PEREIRA, R. O. Novos agrotóxicos e o padrão de potabilidade da água: dinâmica ambiental e riscos à saúde. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, v.16 e 17, p. 1-15, 2020. Disponível em <https://www.abrh.org.br/OJS/index.php/REGA/article/view/431>. Acesso em 15 de novembro de 2022.

BARROS, André Luis Correa de; SCHMIDT, Felix Florian; AQUINO, Sérgio Francisco de; AFONSO, Robson José de Cássia Franco. Determination of nine pharmaceutical active compounds in surface waters from Paraopeba River Basin in Brazil by LTPE-HPLC-ESI-MS/MS. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 25, n. 20, p. 19962-19974, 9 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-2123-y>.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. DOQ-CGCRE-008, de 05 de agosto de 2016. **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf. Acesso em: 24 abr. 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017. **Estabelece critérios para a validação de métodos analíticos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2017. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso: 12 nov. 2022.

BRASIL. ATO Nº 62, DE 13 DE SETEMBRO DE 2019. Brasília: DOU Diário Oficial da União. Publicado no D.O.U. de 17 de novembro de 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/ato-n-62-de-13-de-setembro-de-2019-216556339>. Acesso em: 24 abr. 2021.

BRASIL. RESOLUÇÃO-RE Nº 2.118, de 1/8/2019 (DOU de 5/8/2019) Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/ptbr/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/f/4377json-file-1>. Acesso em: 26 abr. 2021.

BRITO, Tais C.; POSSUELO, Lia G.; VALIM, Andreia R.M.; TODENDI, Pâmela F.; RIBEIRO, Andrezza W.; GREGIANINI, Tatiana S.; JARCZEWSKI, Carla A.; HUTZ, Mara H.; ROSSETTI, Maria Lucia R.; ZAHA, Arnaldo. Polymorphisms in CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 and anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, [S.L.], v. 86, n. 2, p. 855-865, jun. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201420130350>.

CALDAS, S. S.; SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; BUNDT, A.; PRIMEL, E. G. Ocorrência de Agrotóxicos em Áreas Adjacentes a Lavouras de Arroz Irrigado. Pelotas – RG, Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Campus de Capão do Leão; Rio Grande - RS, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 748, 18 de fev. 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000500004>.

CARDOSO, Josiane Moreira; FREITAS, Silvia de Sousa. Evaluation of the matrix effect on the quantitation of pesticides methyl parathion, folpet and mirex in water using gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD). **Brazilian Journal of**

Development, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 98803-98816, 2020. Brazilian Journal of Development. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n12-389>.

CASSINI, S. T. A.; ANTUNES; P. W. P.; KELLER, R. Validação de método analítico livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.36 n.8, p.1208-1213, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000800019>.

CHAWLA, Suchi; PATEL, Dilip J.; PATEL, Sunny H.; KALASARIYA, Ravi L.; SHAH, Paresh G. Behaviour and risk assessment of fluopyram and its metabolite in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and in soil. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 25, n. 12, p. 11626-11634, 10 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-1439-y>.

CHIARADIA, Mariza C.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000300030>.

CLIMENT, María José; HERRERO-HERNÁNDEZ, Eliseo; SÁNCHEZ-MARTÍN, María Jesús; RODRÍGUEZ-CRUZ, María Sonia; PEDREROS, Pablo; URRUTIA, Roberto. Residues of pesticides and some metabolites in dissolved and particulate phase in surface stream water of Cachapoal River basin, central Chile. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 251, p. 90-101, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.117>.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2006.

CORDOVA, Leandro G.; AMIRI, Achour; PERES, Natalia A Effectiveness of fungicide treatments following the Strawberry Advisory System for control of Botrytis fruit rot in Florida. **Crop Protection**, [S.L.], v. 100, p. 163-167, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.002>.

COSTA, Anna I. G.; QUEIROZ, Maria Eliana L. R.; NEVES, Antônio A.; ASSIS, Roberta C. de; SOARES, Carlos E. S. dos; SILVA, Antônio A. da; D'ANTONINO, Leonardo; OLIVEIRA, André F. de; BELLATO, Carlos R. Mobility and persistence of the herbicide fomesafen in soils cultivated with bean plants using SLE/LTP and HPLC/DAD. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 3457-3466, 23 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3557-5>.

D'AMATO, Claudio; TORRES, João P. M.; MALM, Olaf. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Química Nova**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 995-1002, nov. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000600017>.

DA SILVA, Marcos R. F.; DE QUEIROZ, Maria E. L. R.; NEVES, Antônio A.; DA SILVA, Antônio A.; DE OLIVEIRA, André F. ; OLIVEIRA, Renan L. de ; AZEVEDO, Mariane M. ; PEREIRA, Gustavo A. M. Effect of the Incorporation of Sugarcane Bagasse Biochar in

Leaching and Bioavailability of Clomazone in Soil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 2386-2394, jul. 2019. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190149>.

DA SILVEIRA, Taciana M.; ALVES, Renata D.; DE QUEIROZ, Maria E. L. R.; NEVES, Antônio A.; COUTRIM, Maurício X.; AFONSO, Robson J. de C. F.; DA SILVA, Gilmar A.

Study of Analytical Techniques to Determine Chlorpyrifos in the Surface Waterways of the Rural Zone of Ouro Branco, Brazil: A Case Study. **Water air and soil pollution**, v. 27, n. 9, p. 335, set. 2016. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3001-1>.

DE ÁVILA, Mariane B. R.; FARONI, Lêda R. A.; HELENO, Fernanda F.; DE QUEIROZ, Maria Eliana L. R.; ALMEIDA, Rodrigo I.A Simple and Efficient Optimized Solid-Liquid Extraction with Low Temperature Partition Procedure for Dissipation and Translocation Study of Pesticide Residues in Rice Grains. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 1991-1999, oct. 2020. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200099>.

DE SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação Intralaboratorial de métodos de ensaio: Delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Tese de doutorado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/URMR-76GNKZ/1/tese_scheilla_2.pdf. Acesso em 05 nov. 2022.

DIAS, Silvio Luis Pereira; VAGHETTI, Júlio Cesar Pacheco; LIMA, Eder Claudio; BRASIL, Jorge de Lima; PAVAN, Flávio André. **Química Analítica: teoria e pratica essenciais**. 1 ed., Porto alegre: Bookman, 2016.

DONG, Bizhang; HU, Jiye. Dissipation and residue determination of fluopyram and tebuconazole residues in watermelon and soil by GC-MS. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 94, n. 5, p. 493-505, 30 jan. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2013.841152>.

DONG, Bizhang; HU, Jiye. Photodegradation of the novel fungicide fluopyram in aqueous solution: kinetics, transformation products, and toxicity evolvement. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 23, n. 19, p. 19096-19106, 24 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7073-7>.

DURAND, Erwann; LECOMTE, Jérôme; VILLENEUVE, Pierre. From green chemistry to nature: the versatile role of low transition temperature mixtures. **Biochimie**, [S.L.], v. 120, p. 119-123, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.019>.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluopyram. **EFSA Journal**, v. 11, n. 4, p. 1-76, 2013. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3052>.

FERREIRA, D.de C.; JR, V. M.; CUNHA, K.S.G.; JANINI, M. E. R.; CURVELO, J. A. da R. Enzimas citocromo P450 e sua correlação com os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de boca – um estado da arte. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.6, n.2, p.223-232, mai./ago. 2007. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v6i2.4213>.

FILIPPO, Patrizia di; POMATA, Donatella; RICCARDI, Carmela; BUIARELLI, Francesca; GENNARO, Martina de; CONSOLE, Carla; LAURENDI, Vincenzo; PURI, Daniele. Determination of Pesticides in the Respirable Fraction of Airborne Particulate Matter by High-performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Letters**, [S.L.], v. 51, n. 4, p. 600-612, 10 nov. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00032719.2017.1338713>.

FREITAS, L. V. P.; SICUPIRA, L. C.; PINHO, GEVANY P. et al. Optimization and Validation of LLE-LTP and QuEChERS Methodologies for Determining 2,4-D in Water Samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 9, p. 1898-1907, set. 2020. <http://doi.org/10.21577/0103-5053.20200086>.

FUKUSHIMA, André Rinaldi; PEÑA-MUÑOZ, Juliana Weckx; LEONI, Luís Antônio Baffile; NICOLETTI, Maria Aparecida; FERREIRA, Glaucio Monteiro; DELORENZI, Jan Carlo Morais Oliveira Bertassoni; RICCI, Esther Lopes; BRANDÃO, Marlos Eduardo; PANTALEON, Lorena de Paula; GONÇALVES-JUNIOR, Vagner. Development, Optimization, and Validation of Forensic Analytical Method for Quantification of Anticholinesterase Pesticides in Biological Matrices from Suspected Cases of Animal Poisoning. **Toxics**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 269, 23 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxics10050269>.

GAN, Jinhua; LV, Lei; PENG, Jie; LI, Jinping; XIONG, Zhiting; CHEN, Daqing; HE, Li. Multi-residue method for the determination of organofluorine pesticides in fish tissue by liquid chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 207, p. 195-204, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.098>.

GOES JUNIOR, E.J.A.; ROEDER, J. S.; OLIVEIRA, K. B.; FERREIRA, M. P.; SILVA, J. G. D. Validation of a spectro photometric method for quantification of acetyl salicylic acid in pharmaceutical formulations: a proposal of experimental activity for instrumental analysis. **Química Nova**, v.42, p.99-104, 2019. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170300>.

GOULART, Simone Machado; ALVES, Renata Domingos; NEVES, Antônio Augusto; QUEIROZ, José Humberto de; ASSIS, Tamires Condé de; QUEIROZ, Maria Eliana L.R. de. Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 671, n. 1-2, p. 41-47, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.003>.

GOULART, Simone M.; ALVES, Renata D.; PAULA, Washington X. de; QUEIROZ, José Humberto de; NEVES, Antônio A.; QUEIROZ, Maria Eliana L. R. de. Determination of carbamates in beverages by liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 1154-1165, jun. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532012000600022>.

GUAN, Wen Bi; MA, Yong Qian; ZHANG, Hong Yan. Residue and Dissipation Dynamics of Fluopyram in Cucumber and Soil. **Advanced Materials Research**, [S.L.], v. 347-353, p. 2255-2259, out. 2012. Trans Tech Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.347-353.2255>.

GULKOWSKA, Anna; BUERGE, Ignaz J.; POIGER, Thomas. Online solid phase extraction LC–MS/MS method for the analysis of succinate dehydrogenase inhibitor fungicides and its applicability to surface water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 406, n. 25, p. 6419-6427, 22 ago. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-8073-4>.

HARRIS.D.C. **Análise Química Quantitativa**. 8 ed., cap. 5. Rio de Janeiro, 2012.

HAJLLOVÁ, Jana; ZROSTLÁKOVÁ, Jitka. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, [S.L.], v. 1000, n. 1-2, p. 181-197, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00539-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00539-9).

HELENO, Fernanda F.; RODRIGUES, Alessandra A.Z.; QUEIROZ, Maria E.L.R.; NEVES, Antônio A.; OLIVEIRA, André F.; LIBARDI, Vitor M. Determination of fungicides in bell pepper using solid-liquid extraction with low temperature partitioning. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 148, p. 79-84, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.045>.

IAMMARINO, Marco; MARINO, Rosaria; ALBENZIO, Marzia. How meaty? Detection and quantification of adulterants, foreign proteins and food additives in meat products. **International Journal of Food Science and Technology**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 851-863, 29 dez. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.13350>.

ILEVO. [Bula]. São Paulo: Bayer S. A. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/202010/ilevo.pdf. Acesso em 15 de fev. 2023.

JUNIOR, Lucas H. B.; DA SILVA, Elisa M. G.; DE AGUIAR, Adalin C. M.; SOUZA, Paulo S. R.; DE PAULA, Dilma F.; DA SILVA Antônio A. Sulfentrazone mobility in columns filled with ultisol and oxisol horizons. **Environmental Earth Sciences**, v. 81, n. 3, p. 1-24, 2 fev. 2022. <https://doi.org/10.1007/s12665-021-10165-z>.

KATNA, Sapna; DUBEY, Jatiender Kumar; PATYAL, Surender Kumar; DEVI, Nisha; CHAUHAN, Avinash; SHARMA, Ajay. Residue dynamics and risk assessment of Luna Experience® (fluopyram + tebuconazole) and chlorpyrifos on French beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 25, n. 27, p. 27594-27605, 27 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-2733-4>.

KUJAWSKI, M.W.; NAMIEŚNIK, J. Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 27, n. 9, p. 785-793, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2008.07.004>.

LABOURDETTE, G.; LACHAISE, H.; RIECK, H.; STEIGER, D. **Fluopyram: efficacy and beyond on problematic diseases. In: Modern fungicides and antifungal compounds VI. 16th International Reinharbbrunn Symposium**. Friedrichroda, Germany, April 25-29, 2010. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft eV Selbstverlag, 2011. p. 75-80. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153047741>. Acesso em: 09 nov. 2022

LI, Changjian; YUAN, Shaofeng; JIANG, Feng; XIE, Yunfei; GUO, Yahui; YU, Hang; CHENG, Yuliang; QIAN, He; YAO, Weirong. Degradation of fluopyram in water under ozone enhanced microbubbles: kinetics, degradation products, reaction mechanism, and toxicity evaluation. **Chemosphere**, [S.L.], v. 258, p. 127216, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127216>.

MAHAJAN, R.; CHATTERJEE, S. A simple HPLC–DAD method for simultaneous detection of two organophosphates, profenofos and fenthion, and validation by soil microcosm experiment. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n.6, jun. 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-018-6710-7>.

MAHDAVI, Vahideh; BEHBAHAN, Arnavaz Keikavousi; MORADI, Fatemeh; ABOUL-ENEIN, Hassan Y. Analysis of Alternative New Pesticide (Fluopyram, Flupyradifurone, and Indaziflam) Residues in Pistachio, Date, and Soil by Liquid Chromatography Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 373-383, 6 jan. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15320383.2020.1854173>.

MAIA, M. R. et al. Solid-liquid extraction with low temperature purification coupled with gas chromatography and mass spectrometry for determination of polychlorinated biphenyls in sewage sludge. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 1, p. 179-186, 2017. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160161>.

MATADHA, Nagapooja Yogendraiah; MOHAPATRA, Soudamini; SIDDAMALLAIAH, Lekha; UDUPI, Veena Rao; GADIGEPPA, Shambulinga; RAJA, Danish Poothotathil. Uptake and distribution of fluopyram and tebuconazole residues in tomato and bell pepper plant tissues. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 6077-6086, jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-04071-4>.

MATADHA, Nagapooja Yogendraiah; MOHAPATRA, Soudamini; SIDDAMALLAIAH, Lekha; UDUPI, Veena Rao; GADIGEPPA, Shambulinga; RAJA, Danish Poothotathil; DONAGAR, Shruti Prakash; HEBBAR, Shibara Shankara. Persistence and dissipation of fluopyram and tebuconazole on bell pepper and soil under different environmental conditions. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], p. 1-20, 9 jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2019.1704745>.

MATUO, T. K.; RAETANO, C. G.; MATUO, T.; MARTINELLI, N. M. e LEITE, G. J. Desenvolvimento de equipamento motorizado para aplicação líquida de produtos fitossanitários na cultura do café. **Engenharia Agrícola**, v.28, n3, p. 543–553, set. 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-69162008000300015>.

MESQUITA, Tayane C. R.; SANTOS, Rizia R.; CACIQUE, Ane P.; SÁ, Ludimara J. de; SILVÉRIO, Flaviano O.; PINHO, Gevany P. Easy and fast extraction methods to determine organochlorine pesticides in sewage sludge, soil, and water samples based at low temperature. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [S.L.], v. 53, n. 3, p. 199-206, 7 dez. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2017.1405626>.

MOHAPATRA, Soudamini; SIDDAMALLAIAH, Lekha; BUDDIDATHI, Radhika; MATADHA, Nagapooja Yogendraiah. Dissipation kinetics and risk assessment of fluopyram

and tebuconazole in mango (*Mangifera indica*). **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 98, n. 3, p. 229-246, 19 fev. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2018.1445244>.

NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES (NATA). **General Accreditation Guidance - Validation and verification of quantitative and qualitative test methods**. Sydney, Austrália, 2018. Disponível em: <https://dastmardi.ir/wp-content/uploads/2018/08/Validation-and-Verification-of-Quantitative-and-Qualitative-Test-Methods.pdf>. Acesso em 20 nov. 2022.

PARLAKIDIS, Paraskevas; MAVROPOULOS, Theodoros; VRYZAS, Zisis; GIKAS, Georgios D. Fluopyram removal from agricultural equipment rinsing water using HSF pilot-scale constructed wetlands. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 29, n. 20, p. 29584-29596, 14 set. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-021-15373-5>.

PAULA, Camila de; JURISCH, Marina; PICCIN, Evandro; AUGUSTI, Rodinei. Recognizing drug-facilitated crimes: detection and quantification of benzodiazepines in beverages using fast liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and paper spray mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1348-1357, 16 maio 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dta.2395>.

PATEL, Badal V.; CHAWLA, Suchi; GOR, Hetal; UPADHYAY, Payal; PARMAR, Kaushik D.; PATEL, Anil R.; SHAH, Paresh G. Residue decline and risk assessment of fluopyram + tebuconazole (400SC) in/on onion (*Allium cepa*). **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 23, n. 20, p. 20871-20881, 3 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7331-8>.

PEREIRA, Najara G. F.; SILVÉRIO, Flaviano O.; PINHO, Gevany P. Optimisation, validation and application of the solid-liquid extraction with low-temperature purification followed by gas chromatography-mass spectrometry for determination of phthalates in sewage sludge. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 100, n. 9, p. 968-980, 29 jul. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2019.1646735>.

PENG, Jingyu; SANG, Hyunkyuu; PROFFER, Tyre J.; GLEASON, Jacqueline; OUTWATER, Cory A.; JUNG, Geunhwa; SUNDIN, George W. A Method for the Examination of SDHI Fungicide Resistance Mechanisms in Phytopathogenic Fungi Using a Heterologous Expression System in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, [S.L.], v. 111, n. 5, p. 819-830, maio 2021. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-09-20-0421-r>.

PINHO, Gevany Paulino de; NEVES, Antônio Augusto; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de; SILVÉRIO, Flaviano Oliveira. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, [S.L.], v. 21, n. 10, p. 1307-1311, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.03.006>.

PODBIELSKA, M.; SZPYRKA, E.; PIECHOWICZ, B.; ZWOLAK, A.; SADŁO, S. Behavior of fluopyram and tebuconazole and some selected pesticides in ripe apples and consumer exposure assessment in the applied crop protection framework. **Environmental**

Monitoring and Assessment, v. 189, n. 350, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6057-5>.

REGO, Eliane Cristina Pires do; GUIMARÃES, Evelyn de Freitas; SANTOS, Ana Luiza Monteiro dos; MOTHÉ, Elizabeth de Souza Madureira; RODRIGUES, Janaína Marques; NETTO, Annibal Duarte Pereira. 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**, [S.L.], v. 7, n. 11, p. 4699-4707, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5ay00361j>.

REZENDE, Flavia Borges de Freitas; CHEIBUB, Ana Maria de Souza Santos; NETTO, Annibal Duarte Pereira; MARQUES, Flávia Ferreira de Carvalho. Determination of formaldehyde in bovine milk using a high sensitivity HPLC-UV method. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 134, p. 383-389, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.003>.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; DA SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000100029>.

ROBATSCHER, Peter; EISENSTECKEN, Daniela; INNEREBNER, Gerd; ROSCHATT, Christian; RAIFER, Barbara; ROHREGGER, Hannes; HAFNER, Hansjörg; OBERHUBER, Michael. 3-Chloro-5-trifluoromethylpyridine-2-carboxylic acid, a Metabolite of the Fungicide Fluopyram, Causes Growth Disorder in *Vitis vinifera*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 67, n. 26, p. 7223-7231, 10 jun. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05567>.

RODRIGUES, Rogério P.; FARIAS, Waldiclécio R.; GOULART, Simone M.; GOULART, Adilson C.; SANTOS, João Paulo V.; DE QUEIROZ, Maria Eliana L. R. Optimization of solid-liquid extraction with low temperature partition for determination of carbofuran in cucurbita pepo l (“zucchini”) by high performance liquid chromatography. **Química Nova**, v. 41, p. 213-218, fev. 2018. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170141>.

RODRIGUES, Alessandra A. Z.; QUEIROZ, Maria Eliana L. R. de; OLIVEIRA, André Fernando de; NEVES, Antônio Augusto; HELENO, Fernanda F.; ZAMBOLIM, Laércio; FREITAS, Jéssika F.; MORAIS, Elisa H. Costa. Pesticide residue removal in classic domestic processing of tomato and its effects on product quality. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [S.L.], v. 52, n. 12, p. 850-857, 28 set. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2017.1359049>.

RODRIGUES, Alessandra Aparecida Zinato; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de; FARONI, Lêda Rita D'Antonino; PRATES, Lucas Henrique Figueiredo; NEVES, Antônio Augusto; OLIVEIRA, André Fernando de; FREITAS, Jéssika Faêda de; HELENO, Fernanda Fernandes; ZAMBOLIM, Laércio. The efficacy of washing strategies in the elimination of fungicide residues and the alterations on the quality of bell peppers. **Food Research International**, [S.L.], v. 147, p. 110579, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110579>.

RUDAKOV, O. B.; KHOROKHORDINA, E. A.; PREOBRAZHENSII, M. A.; RUDAKOVA, L. V. Low-temperature liquid–liquid extraction of phenols from aqueous solutions with hydrophilic mixtures of extractants. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, [S.L.], v. 90, n. 8, p. 1665-1668, 21 jul. 2016. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s0036024416080264>.

SÁNCHEZ-BRUNETE, Consuelo; ALBERO, Beatriz; MARTÍN, Germán; TADEO, José L. Determination of Pesticide Residues by GC-MS Using Analyte Protectants to Counteract the Matrix Effect. **Analytical Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 11, p. 1291-1296, nov. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2116/analsci.21.1291>.

SANG, H.; LEE, H. B. Molecular Mechanisms of Succinate Dehydrogenase Inhibitor Resistance in Phytopathogenic Fungi. **Research in Plant Disease**, v. 26, n. 1, p. 1-7, Mar. 2020. <https://doi.org/10.5423/RPD.2020.26.1.1>

SANTOS, L.G; PEIXOTO SOBRINHO, T.J.s.; CABRAL, D.L.V.; AMORIM, E.L.C. Validação de metodologia analítica para determinação de taninos pelo método de difusão radial. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 881-885, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12_023.

SANTOS, L.M.G. Avaliação das impurezas elementares do medicamento captopril comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 3, 2018. Disponível em: <https://rvq-sub.s bq.org.br/index.php/rvq/article/view/2587>. Acesso em 19 nov. 2022.

SAZONOV, Valerii P.; SHAW, David G.; MARSH, Kenneth N.; SAZONOV, Valerii P.; SAZONOV, Nikolai V.; LISOV, Nikolai I.; CHERNYSHEVA, Mariya F. IUPAC-NIST Solubility Data Series. 77. C2+ Nitroalkanes with Water or Organic Solvents: binary and multicomponent systems. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 1-121, mar. 2002. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.1417522>.

SHARMA, Aditi; MAHAJAN, Vikram K.; MEHTA, Karaninder S.; CHAUHAN, Pushpinder S.; SHARMA, Vikas; SHARMA, Anuj; WADHWA, Dhaarna; CHAUHAN, Shailja. Pesticide contact dermatitis in agricultural workers of Himachal Pradesh (India). **Contact Dermatitis**, [S.L.], v. 79, n. 4, p. 213-217, 3 jul. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cod.13049>.

SHI, Yanxia; ZHU, Fadi; SUN, Bingxue; XIE, Xuwen; CHAI, Ali; LI, Baoju. Two adjacent mutations in the conserved domain of SdhB confer various resistance phenotypes to fluopyram in *Corynespora cassiicola*. **Pest Management Science**, [S.L.], v. 77, n. 9, p. 3980-3989, 12 maio 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.6420>.

SICUPIRA, L. C.; TIAGO, J.; PINHO, G.; SILVÉRIO, F. O. Simultaneous Determination of 2,3,7,8-TCDD and 2,3,7,8-TCDF in Water Samples by LLE-LTP and HPLC-DAD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 1284-1292, mai. 2019. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190024>.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, Carol H. Aplicações de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o Estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes. Instituto de Química,

Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, **Química Nova**, vol. 34, nº 4, fev. 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000400020>.

SILVA, D. D.; CHIERICE, G. O.; GALHIANE, M. S.; CHAAR, J. S.; MOUCHREK-FILHO, V. E. Quantificação do linalol no óleo essencial da aniba *duckei* korstermans utilizando uma nova coluna capilar polyh4-md em cromatografia gasosa. **Química Nova**, Vol. 26, No. 4, 461-465, ago. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400002>.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S., AGUIAR, M. C. S., CACIQUE, A. P., PINHO, G. P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, p. 2052-2056, nov. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001000027>.

SLOWIK-BOROWIEC, Magdalena; SZPYRKA, Ewa. Selected food processing techniques as a factor for pesticide residue removal in apple fruit. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 2361-2373, 28 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-019-06943-9>.

SOUSA, Demétrio A.; GONÇALVES, Renato M.; HELENO, Fernanda F.; QUEIROZ, Maria Eliana L.R. de; MARCHI, Mary Rosa R. de. Chemometric optimization of solid-liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in Caiman yacare eggs. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 114, p. 266-272, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.01.012>.

SOUZA, Scheilla V.c. de; JUNQUEIRA, Roberto G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 24 ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.043>.

SOUZA, Lauana Pellanda; FARONI, Lêda Rita D'antonino; HELENO, Fernanda Fernandes; PINTO, Frederico Garcia; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro; PRATES, Lucas Henrique Figueiredo. Difenoconazole and linuron dissipation kinetics in carrots under open-field conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.L.], v. 168, p. 479-485, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.070>.

TANKIEWICZ, Maciej; FENIK, Jolanta; BIZIUK, Marek. Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: a review. **Talanta**, [S.L.], v. 86, p. 8-22, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.056>.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, jan. 2002. Disponível em: <https://publications.iupac.org/pac/2002/pdf/7405x0835.pdf>. Acesso em 27 nov. 2022,

TINWELL, H.; ROUQUIÉ, D.; SCHORSCH, F.; GETER, D.; WASON, S.; BARS, R. Liver tumor formation in female rat induced by fluopyram is mediated by CAR/PXR nuclear receptor activation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 648-658, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.09.011>.

TONHI, Edivan; COLLINS, Kenneth E.; JARDIM, Isabel C. S. F.; COLLINS, Carol H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 616-623, jul. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000400017>.

VALERA-TARIFA, N.M.; SANTIAGO-VALVERDE, R.; HERNÁNDEZ-TORRES, E.; MARTÍNEZ-VIDAL, J.L.; GARRIDO-FRENICH, A. Development and full validation of a multiresidue method for the analysis of a wide range of pesticides in processed fruit by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 315, p. 126304, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126304>.

VELOUKAS, Thomas; KARAOGLANIDIS, George S. Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity. **Pest Management Science**, [S.L.], v. 68, n. 6, p. 858-864, 19 jan. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3241>.

VERANGO PRIME. [Bula]. São Paulo: Bayer S. A. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-10/verangoprime0820.pdf. Acesso em 15 de fev. 2023.

VIEIRA, Heulla Pereira; NEVES, Antônio Augusto; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 535-540, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000300006>.

VITALE, A.; PANEBIANCO, A.; POLIZZI, G. Baseline sensitivity and efficacy of fluopyram against *Botrytis cinerea* from table grape in Italy. **Annals of Applied Biology**, [S.L.], v. 169, n. 1, p. 36-45, 26 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/aab.12277>.

WATSON, Tristan T.; NOLING, Joseph W.; DESAEGER, Johan A. Fluopyram as a rescue nematicide for managing sting nematode (*Belonolaimus longicaudatus*) on commercial strawberry in Florida. **Crop Protection**, [S.L.], v. 132, p. 105108, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105108>.

WEI, Peng; LIU, Yanan; LI, Wenzhuo; QIAN, Yuan; NIE, Yanxia; KIM Dongyeop; WANG, Mengcen. Metabolic and Dynamic Profiling for Risk Assessment of Fluopyram, a Typical Phenylamide Fungicide Widely Applied in Vegetable Ecosystem. **Scientific Reports**, v. 6, n. 33898, set. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep33898>.

WU, Junxue; ZHI, Shenwei; JIA, Chunhong; LI, Xinghai; ZHU, Xiaodan; ZHAO, Ercheng. Dispersive solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous determination of seven succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in watermelon by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, [S.L.], v. 42, n. 24, p. 3688-3696, 20 out. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201900862>.

ZHANG, Ying; XU, Jun; DONG, Fengshou; LIU, Xingang; WU, Xiaohu; ZHENG, Yongquan. Response of microbial community to a new fungicide fluopyram in the silty-loam

agricultural soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.L.], v. 108, p. 273-280, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.018>.

ZHOU, Jia; LIANG, Shuilian; CUI, Yuanyuan, Rong, Yu; SONG, Jia, LV, Daizhu . Study on environmental behaviour of fluopyram in different banana planting soil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-10, jul. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91460-4>.

ZHUO, Qiqi; ZHANG, Yiping; DU, Qingchuan; YAN, Chao. Facile reduction of graphene oxide at room temperature by ammonia borane via salting out effect. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S.L.], v. 457, p. 243-247, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.07.029>.

CAPÍTULO 2. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ELL-PBT) PARA DETERMINAÇÃO DO FUNGICIDA FLUOPIRAM EM AMOSTRAS DE ÁGUA POR CLAE-DAD

RESUMO

O fluopiram é um fungicida e nematicida pertencente ao grupo químico das benzamidas, que atua como inibidor da succinato desidrogenase na cadeia respiratória mitocondrial de fungos. Apesar de ser bem conhecido em vários países, existem poucos estudos envolvendo a otimização e validação de métodos de extração para determinação do fluopiram em amostras de água. Portanto, este estudo teve como objetivo otimizar e validar a extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) para determinação do fungicida fluopiram em amostras de água utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD). Foi empregado o planejamento fatorial completo com dois níveis e três fatores para otimizar a ELL-PBT que permitiu alcançar uma taxa de recuperação próxima de 100% e desvios padrão relativos (DPR) inferiores a 10%. A validação mostrou que o método de extração pode ser considerado seletivo, preciso, exato e linear na faixa de 6 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram de 4 e 6 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, comprovando a eficiência deste método para determinação deste fungicida em amostras de água. A ELL-PBT combinada à análise por CLAE-DAD mostrou um efeito de matriz inferior a 8% e foi aplicada no monitoramento de 20 amostras ambientais de água, mas nenhum resíduo do fluopiram foi detectado nas amostras.

Palavras-chave: Fluopiram; Fungicida; Benzamida; ELL-PBT.

**OPTIMIZATION AND VALIDATION OF LIQUID-LIQUID EXTRACTION WITH
LOW-TEMPERATURE PURIFICATION (LLE-LTP) FOR DETERMINING
FLUOPYRAM FUNGICIDE IN WATER SAMPLES USING HPLC-DAD**

ABSTRACT

Fluopyram is a fungicide and nematocide that belongs to the chemical group benzamide pyrimid, which acts as succinate dehydrogenase inhibitors on the mitochondrial respiratory chain of fungi. Despite being well known in several countries, there are few studies involving the optimization and validation of extraction methods for determining fluopyram in water samples. Therefore, this study aimed to optimize and validate the liquid-liquid extraction with low-temperature purification (LLE-LTP) to determine fluopyram fungicide in water samples using the high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). A two-level full factorial design was employed to optimize the LLE-LTP which enabled achieving a recovery rate close to 100% and relative standard deviations (RSD) < 10%. The validation showed that the extraction method may be considered selective, precise, accurate, and linear in the range of 6 to 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. The LOD and LOQ were 4 and 6 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, proving the efficiency of this method for trace level determination of this fungicide in water samples. LLE-LTP coupled to HPLC-DAD analysis showed a matrix effect of less than 8% and it was applied in monitoring 20 environmental water samples, but no fluopyram residue was detected in the samples.

Keywords: Fluopyram; Fungicide; Benzamide; LLE-LTP.

1 INTRODUÇÃO

Fluopiram (N-[2-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridin-2-il]etil]-2 (trifluorometil) benzamida) é um fungicida que pertence ao grupo químico das benzamidas, que atua como inibidor da succinato desidrogenase (SDHIs), bloqueando a síntese de ATP na cadeia respiratória mitocondrial de fungos (GULKOWSKA *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2021) e nematoides. Essa substância tem demonstrado amplo espectro de ação, alta eficácia em baixas doses e opções de uso como suspensões ou concentrados emulsionáveis para pulverização de plantas cultiváveis (PODBIELSKA *et al.*, 2017) e tratamento de sementes. Portanto, o uso desse fungicida, também aprovado em vários países como nematicida, conservante para armazenamento de produtos agrícolas, agente de tratamento de sementes e diversas outras aplicações (ZHOU *et al.*, 2021).

Embora a comercialização e uso desse agrotóxico já tenha sido aprovado em vários países, incluindo China em 2010 (DONG e HU, 2014), Estados Unidos da América (EUA) em 2012, União Europeia em 2013 (EFSA, 2013; CEBALLOS-ALCANTARILLA *et al.*, 2019) e Suíça em 2013, esse fungicida foi autorizado no Brasil somente em 2019 (BRASIL, 2019).

No entanto, atualmente existem poucos estudos envolvendo a otimização e validação de métodos de extração para determinação do fluopiram em amostras de água. Apenas a extração em fase sólida (EFS) foi otimizada e validada para este fungicida em amostras de água (GULKOWSKA *et al.*, 2014; PINASSEAU *et al.*, 2020). Nesse sentido, o desenvolvimento de novos métodos de extração de fácil execução, econômico, eficiente e sensível para determinar contaminantes ambientais é altamente desejável. Nesse contexto, trabalhos anteriores mostraram que a extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) apresentou essas características com sucesso na detecção de outros agrotóxicos em amostras de água (PINHO *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2021).

Este método consiste em promover uma mistura entre uma amostra aquosa e solvente orgânico, geralmente na proporção de 1:2 (v:v), e submetê-la a uma redução de temperatura (-20 °C) para congelar a fase aquosa e formar um sistema bifásico devido ao processo de partição. Nesse período, a matriz e seus componentes são aprisionados na estrutura do gelo, enquanto o analito alvo migra para a fase orgânica líquida, e geralmente não é necessária nenhuma etapa adicional de limpeza (MESQUITA *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2020). Portanto, o extrato pode ser analisado por técnicas analíticas, como cromatografia líquida ou cromatografia gasosa. No entanto, nenhum estudo empregando essa metodologia para determinar o fluopiram em amostras de água foi concluído até o momento.

Portanto, este trabalho teve como objetivo otimizar e validar a ELL-PBT combinada à cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) para determinação do fungicida fluopiram em amostras de água.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Equipamentos e reagentes

O padrão analítico do fluopiram com pureza superior a 99% (m/m) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A solução estoque do fluopiram, na concentração de 20 mg L⁻¹, foi preparada em acetonitrila. As soluções de trabalho a 2; 5 e 10 mg L⁻¹ foram preparadas diluindo a solução estoque no mesmo solvente e armazenadas a -20 °C.

Solventes de grau HPLC incluindo acetonitrila (ACN) foram adquiridos de J.T. Baker (Phillipsburg, EUA), enquanto acetato de etila (ACT) e metanol (MeOH) foram adquiridos da Dinâmica (Diadema, Brasil) e Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), respectivamente. Cloreto de sódio (NaCl) (99% m/m) foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Água ultrapura (18,2 MΩ) foi preparada através de um sistema Milli-Q da Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha) e foi utilizada para preparar a fase móvel aquosa.

Os equipamentos utilizados incluem um vortex da Scilogex (Rocky Hill, EUA), uma balança analítica da Shimadzu (São Paulo, Brasil) e uma bomba de vácuo da Primatec (Itu, Brasil).

2.2 Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD, modelo 1290, Agilent Technologies, Alemanha) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, compartimento de coluna termostática e desgaseificador. O volume de injeção foi de 20 µL. O monitoramento do fluopiram foi realizado no comprimento de onda (λ) de 270 nm. As condições cromatográficas foram otimizadas para a determinação do fluopiram. As variáveis avaliadas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições cromatográficas otimizadas para análise do fluopiram

Parâmetros	
Coluna cromatográfica	Poroshell (4,6 mm x 50 mm, 2,7 µm, Agilent Technologies) Zorbax (2,1 mm x 50 mm, 1,8 µm, Agilent Technologies)
Composição da fase móvel	ACN:H ₂ O (100:0; 90:10; e 80:20 v/v) MeOH:H ₂ O (100:0; 90:10; e 80:20 v/v)
Fluxo da fase móvel (mL min ⁻¹)	0,3 0,5 1,0
Temperatura da coluna (°C)	30 40

ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; H₂O = água

2.3 Otimização do método de extração

O método de extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) foi utilizado neste estudo. Implementamos um planejamento fatorial completo 2³ para otimizar a ELL-PBT, em que 2 é o número de níveis e 3 é o número de fatores (MUCKOYA *et al.*, 2020).

Os experimentos foram realizados em todas as combinações possíveis, totalizando 8 experimentos, realizados em triplicata (Tabela 1). A porcentagem média de recuperação alcançada em cada teste foi usada como resposta analítica. Os erros associados aos efeitos e interações de cada fator foram avaliados pelo teste t, considerando o nível de significância de 5%.

Tabela 2 - Ensaios do planejamento fatorial completo 2^3 para avaliar os efeitos dos fatores na ELL-PBT do fluopiram

Ensaio	Fatores codificados (F)			(1) Proporção ACN:ACT (mL)	(2) Força iônica (g de NaCl)	(3) Tempo de congelamento (min)
	F (1)	F (2)	F (3)			
1	-	-	-	8,0:0,0	0,0	60
2	-	-	+	8,0:0,0	0,0	120
3	-	+	-	8,0:0,0	0,2	60
4	-	+	+	8,0:0,0	0,2	120
5	+	-	-	6,5:1,5	0,0	60
6	+	-	+	6,5:1,5	0,0	120
7	+	+	-	6,5:1,5	0,2	60
8	+	+	+	6,5:1,5	0,2	120

F = fatores; ACN = acetonitrila; ACT = acetato de etila

No procedimento de preparo da amostra, 4,0 mL de água ultrapura foram adicionados em um frasco de vidro de 22 mL e fortificados com 97,16 μL da solução do fluopiram na concentração de 5 mg L^{-1} para obter uma concentração de 121,45 $\mu\text{g L}^{-1}$ na amostra. A amostra fortificada foi agitada manualmente por 30 segundos e mantida em repouso por 30 min para permitir a integração do analito alvo com a matriz. Em seguida, foram adicionados 8 mL da fase extratora e NaCl, conforme indicado na Tabela 2, e a amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 min. O frasco foi resfriado em freezer a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 60 ou 120 min (Tabela 2). Em seguida, 5 mL do extrato foram completamente secos por fluxo de ar contínuo e dissolvidos em 400 μL de ACN. Finalmente, a amostra foi filtrada através de um filtro de membrana de PTFE (Politetrafluoroetileno) de 0,45 μm . Uma alíquota de 20 μL foi injetada no sistema CLAE-DAD.

A quantificação do fluopiram nos extratos foi realizada por comparação com a solução padrão preparada no extrato da matriz na mesma concentração.

2.4 Validação do método de extração

A validação analítica do método otimizado foi realizada de acordo com as diretrizes do protocolo SANTE (SANTE, 2019). Os principais parâmetros avaliados foram: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), seletividade, precisão, exatidão, faixa de linearidade e efeito de matriz (EM). Os testes estatísticos foram realizados considerando o nível de significância de 5%.

2.4.1 Seletividade

A seletividade do método otimizado foi investigada comparando cromatogramas de solução padrão preparada no extrato da matriz e do branco (extrato de matriz livre do fluopiram) em seis repetições. O método foi considerado seletivo quando não houve ocorrência de sinais cromatográficos atribuídos a interferentes no mesmo tempo de retenção do analito.

2.4.2 Limites de quantificação e detecção

O limite de quantificação (LQ) foi determinado pela matriz fortificada com a menor concentração do fluopiram que pode ser quantificada com exatidão e precisão. O LQ foi considerado como sendo dez vezes o sinal do ruído da linha de base do extrato de amostras livres de analito (branco) no mesmo tempo de retenção do fluopiram. O LD foi considerado três vezes o sinal do ruído da linha de base do extrato de amostras livres de analito (branco) no mesmo tempo de retenção do fluopiram.

2.4.3 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas através de experimentos de fortificação e recuperação da matriz. A precisão foi determinada em sete réplicas independentes para a concentração de $80 \mu\text{g L}^{-1}$. A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) das repetições, sendo o DPR inferior a 20% considerado como critério de aceitabilidade (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Em seguida, a exatidão do método foi avaliada por meio da recuperação dos analitos em três repetições independentes (6; 80 e $160 \mu\text{g L}^{-1}$), sendo considerados aceitáveis valores de recuperação entre 70 e 120% (SANTE, 2019).

2.4.4 Linearidade

A linearidade foi avaliada por curvas analíticas do extrato da matriz com seis níveis de concentração (6; 40; 80; 120; 160 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) em triplicata. Os parâmetros de regressão linear foram analisados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e os valores extremos (*outliers*) foram tratados pelo teste de Jackknife, excluindo no máximo 22,2% dos dados originais.

Os testes de Brown e Forsythe, Ryan e Joiner e Durbin-Watson foram aplicados para verificar a homocedasticidade, normalidade e independência da análise de regressão, respectivamente. A falta de ajuste de linearidade e significância de regressão foi determinada por análise de variância (ANOVA).

2.4.5 Efeito de matriz

O efeito de matriz (EM) foi determinado por meio de duas curvas analíticas, sendo uma em solvente (ACN) e outra em extrato da matriz fortificado, com seis níveis de concentração (6; 40; 80; 120; 160 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) em triplicata. Ambas as curvas analíticas foram avaliadas de acordo com o procedimento de linearidade, descrito anteriormente. O efeito de matriz foi posteriormente calculado de acordo com a equação 1.

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

Onde, α_{matriz} : coeficiente angular da curva analítica em extrato da matriz e α_{solvente} : coeficiente angular da curva analítica em solvente.

Em que valores entre -20% e +20% indicaram um EM baixo, entre -20% e -50% ou entre +20% e +50% significa um EM médio e valores abaixo de -50% ou acima de +50% indicam um alto EM (ECONOMOU *et al.*, 2009; TOMASINI *et al.*, 2012).

2.5 Amostras reais

O método otimizado e validado foi aplicado em 20 amostras reais para verificar a sua aplicabilidade. Para tanto, 5 amostras de águas subterrâneas e 15 de águas superficiais foram coletadas em 3 cidades brasileiras: Espírito Santo do Dourado, Silvianópolis e Pouso Alegre, no estado de Minas Gerais, Brasil. As amostras desses locais foram escolhidas devido

à intensa atividade agrícola próxima aos recursos hídricos, além do provável uso do fluopiram nas lavouras de milho e café presentes nesta região. A Tabela 3 apresenta as coordenadas geográficas dos locais de coleta das amostras.

Tabela 3 - Coordenadas geográficas dos locais de coleta das amostras de água

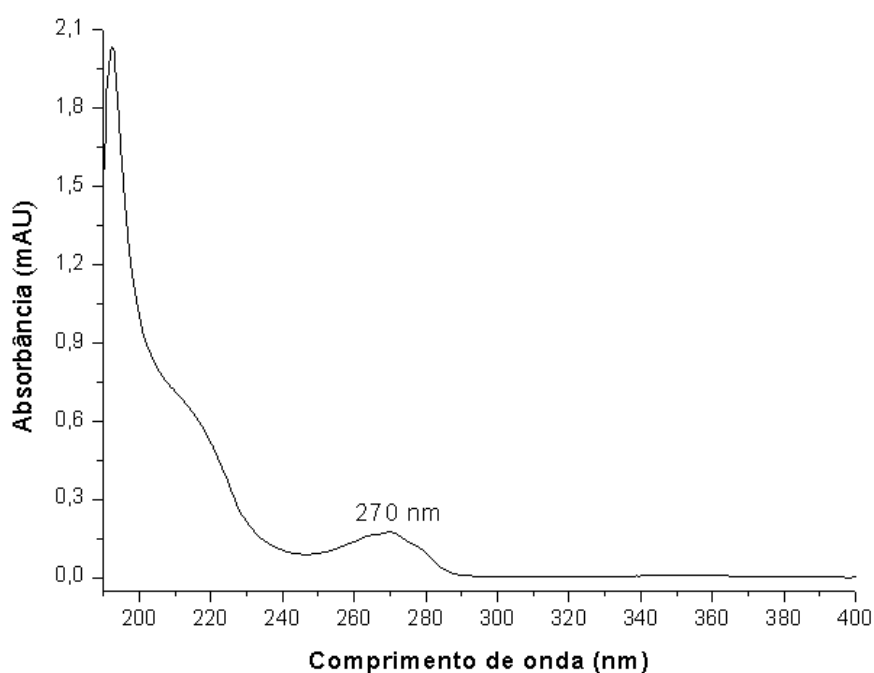
Amostra	Coordenadas geográficas
1	22°11'18,0" S, 45,60'59,7"W
2	22°19'05,0" S, 45°69'13,2"W
3	22°06'33,3"S, 45°27'58,9"W
4	22°03'11,9"S, 45°68'21,2"W
5	21°30'39,6"S, 45°32'38,8"W
6	21°26'21,5"S, 45°33'18,0"W
7	21°26'55,7"S, 45°32'14,0"W
8	21°26'50,7"S, 45°32'13,4"W
9	21°25'57,9"S, 45°29'86,1"W
10	21°24'52,7"S, 45°28'18,1"W
11	21°23'33,3"S, 45°27'14,4"W
12	21°23'45,4"S, 45°28'22,0"W
13	21°23'27,9"S, 45°28'29,1"W
14	21°23'21,8"S, 45°28'41,7"W
15	21,23'19,7" S, 45°28'41,9"W
16	21°23'35,7"S, 45°88'66,5"W
17	21°50'13,5"S, 45°53'18,4"W
18	21°22'59,3"S, 45°28'47,5"W
19	21°22'60,9"S, 45°30'33,2"W
20	21°22'63,7" S, 45°30'65,2"W

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização das condições cromatográficas

O espectro de absorção na região do ultravioleta da solução padrão do fluopiram a 1 mg L^{-1} em acetonitrila é mostrado na Figura 1.

Figura 1 - Espectro de absorção na região do ultravioleta da solução padrão do fluopiram a 1 mg L^{-1} em acetonitrila.



Como pode ser visto, os comprimentos de onda de absorbância máxima foram de 200 e 270 nm. Foram realizadas análises cromatográficas nestes dois comprimentos de onda e o cromatograma obtido em 270 nm apresentou menores sinais de interferência próximos ao tempo de retenção do fluopiram (1,17 min).

Em seguida, avaliamos a coluna cromatográfica e a fase móvel para determinação do fluopiram por CLAE-DAD. Os cromatogramas obtidos em cada condição podem ser vistos nas Figuras 2 e 3.

Figura 2 - Cromatogramas da solução padrão do fluopiram na concentração de 1 mg L^{-1} em ACN. Temperatura da coluna = $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\lambda = 270\text{ nm}$, taxa de fluxo = $0,5\text{ mL min}^{-1}$, coluna zorbax, fase móvel: (A) ACN:H₂O = 100:0, (B) ACN:H₂O = 90:10, (C) ACN:H₂O = 80:20, (D) MeOH:H₂O = 100:0, (e) MeOH:H₂O = 90:10 e (f) MeOH:H₂O = 80:20. As setas na figura indicam o tempo de retenção do fluopiram.

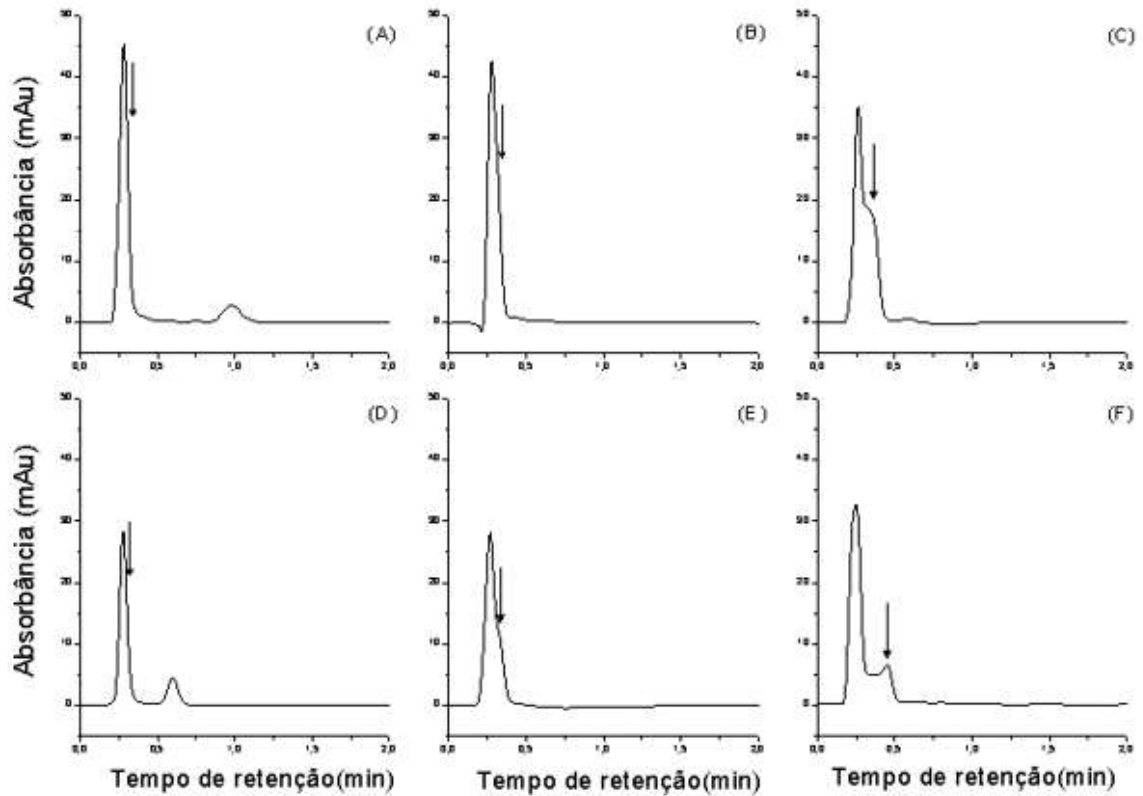
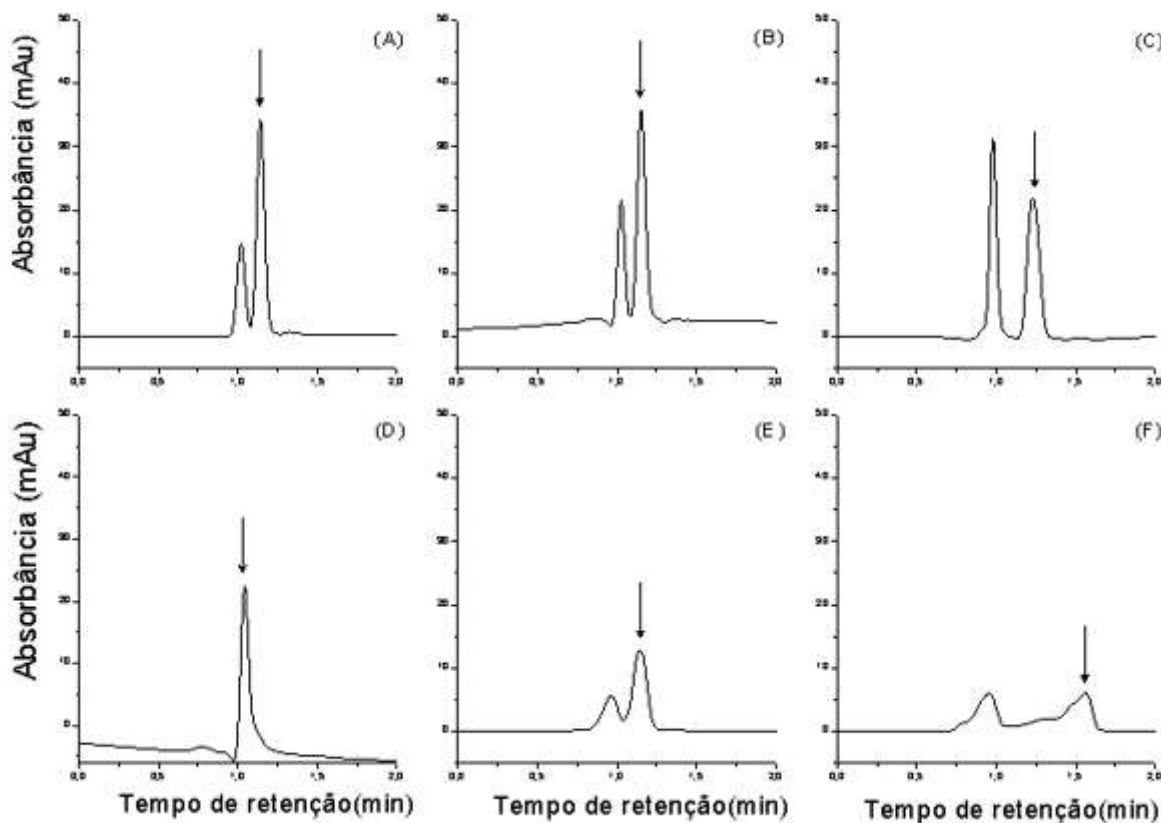


Figura 3 - Cromatogramas da solução padrão do fluopiram a 1 mg L^{-1} em ACN. Temperatura da coluna = $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 270 \text{ nm}$, taxa de fluxo = $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, coluna poroshell, fase móvel (A) ACN:H₂O = 100:0, (B) ACN:H₂O = 90:10, (C) ACN:H₂O = 80:20, (D) MeOH:H₂O = 100:0, (E) MeOH:H₂O = 90:10 e (F) MeOH:H₂O = 80:20. As setas na figura indicam o tempo de retenção do fluopiram.



Picos interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção do fluopiram foram observados nos cromatogramas obtidos empregando a coluna zorbax em todas as composições de fase móvel estudadas, como pode ser visto na Figura 2. Portanto, o monitoramento do fluopiram usando esta coluna analítica não foi seletivo para as fases móveis estudadas.

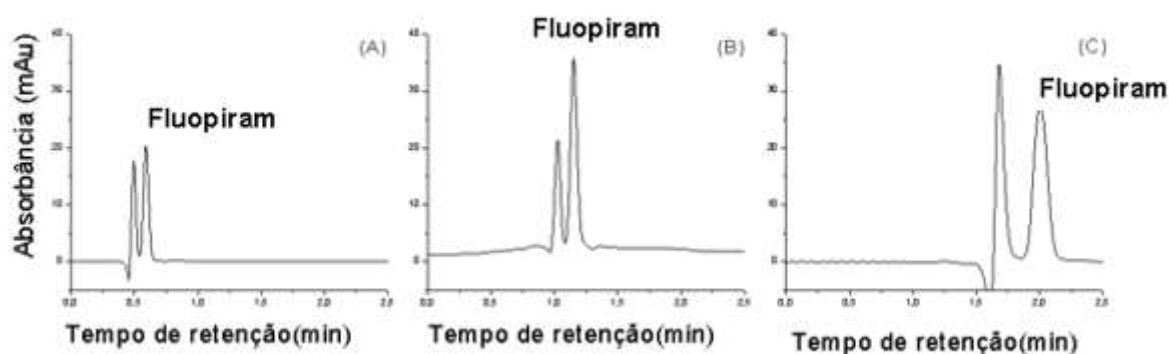
Por outro lado, a análise utilizando a coluna poroshell proporcionou boa seletividade e resolução, como pode ser observado na Figura 3. Portanto, esta coluna cromatográfica foi empregada para este estudo.

Os cromatogramas obtidos em cada composição de fase móvel estudada são apresentados na Figura 3. Os resultados mostraram que o cromatograma obtido usando a fase móvel ACN:H₂O (90:10 v/v) revelou um sinal do fluopiram com maior intensidade e sem interferência. Portanto, foi escolhida esta composição de fase móvel para este estudo. Estudos

anteriores empregaram a mesma combinação de solventes orgânicos como fase móvel para determinar o fluopiram por CLAE em amostras de água e alimentos (MESQUITA *et al.*, 2017; MEKONNEN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020).

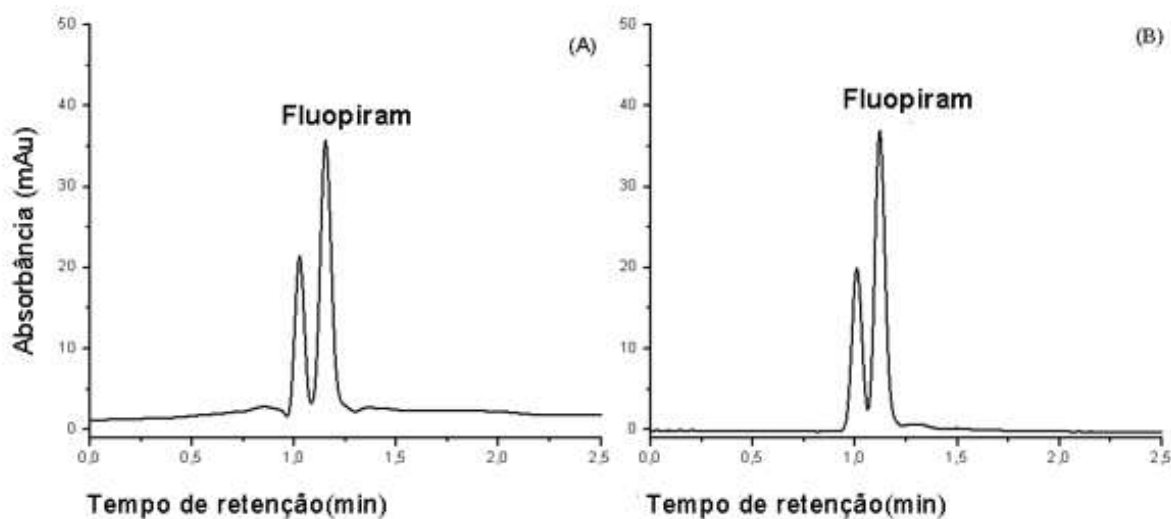
O terceiro parâmetro avaliado foi o fluxo de fase móvel (Tabela 1), e os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 4. A melhor resolução e intensidade para monitoramento do fluopiram foram observadas utilizando o fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Assim, este fluxo foi escolhido como ideal para este estudo.

Figura 4 - Cromatogramas da solução padrão do fluopiram a 1 mg L^{-1} em ACN. Temperatura da coluna = $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 270 \text{ nm}$, coluna poroshell, fase móvel ACN:H₂O = 90:10, taxa de fluxo (A) $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, (B) $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e (C) $0,3 \text{ mL min}^{-1}$.



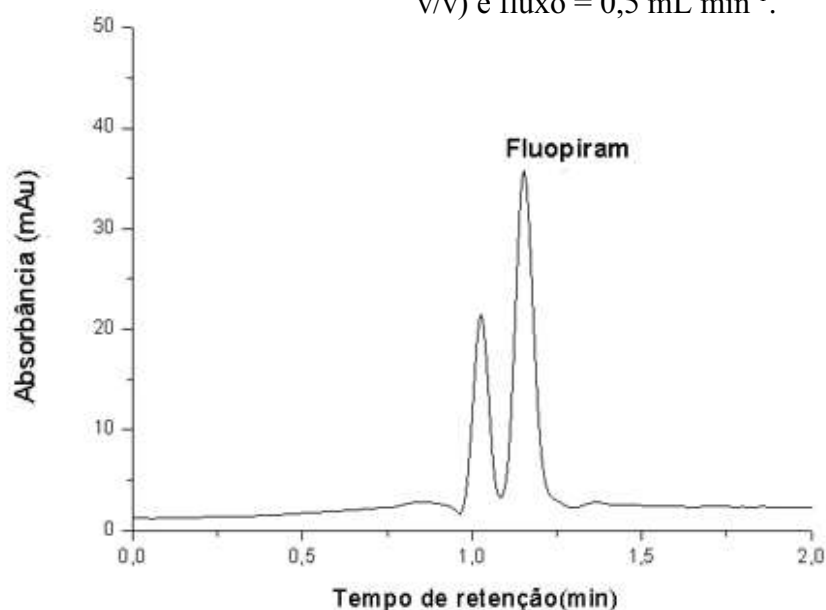
A quarta variável estudada foi a temperatura da coluna (Tabela 1). O tempo de retenção e a intensidade foram semelhantes nas duas condições (Figura 5). No entanto, a área cromatográfica do pico atribuído ao fluopiram foi maior a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, e conseqüentemente essa temperatura foi escolhida.

Figura 5 - Cromatogramas da solução padrão do fluopiram a 1 mg L^{-1} em ACN. Coluna poroshell, $\lambda = 270 \text{ nm}$, fase móvel: ACN:H₂O = 90:10; taxa de fluxo = $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna (A) $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e (B) $40 \text{ }^\circ\text{C}$.



O cromatograma obtido nas condições cromatográficas otimizadas para determinação do fluopiram por CLAE-DAD é apresentado na Figura 6. O método de extração foi otimizado após esta etapa.

Figura 6 - Cromatograma da solução padrão do fluopiram a 1 mg L^{-1} em ACN. Condições cromatográficas: volume de injeção = $20 \text{ } \mu\text{L}$, $\lambda = 270 \text{ nm}$, coluna poroshell ($4,6 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, $2,7 \text{ } \mu\text{m}$, Agilent Technologies), temperatura da coluna = $30 \text{ }^\circ\text{C}$, fase móvel ACN:H₂O (90:10 v/v) e fluxo = $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.



3.2 Otimização das condições de extração

A otimização da ELL-PBT do fluopiram em amostras de água foi realizada através de um planejamento fatorial completo 2^3 , onde todos os fatores independentes são investigados simultaneamente (MAGDY *et al.*, 2021). Os três parâmetros avaliados (Tabela 1) foram escolhidos de estudos anteriores (PEREIRA *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2020). Observou-se nesses estudos que esses parâmetros tiveram influência decisiva no aumento do percentual de recuperação.

Assim, realizamos oito ensaios em triplicata que geraram respostas para estimativa de erros experimentais e para o cálculo da recuperação média, efeitos de cada fator e as interações entre os fatores para a extração do analito alvo. A porcentagem de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR) obtidos em cada ensaio do planejamento fatorial completo podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Delineamento experimental usando planejamento fatorial completo 2^3 com sua resposta analítica obtida

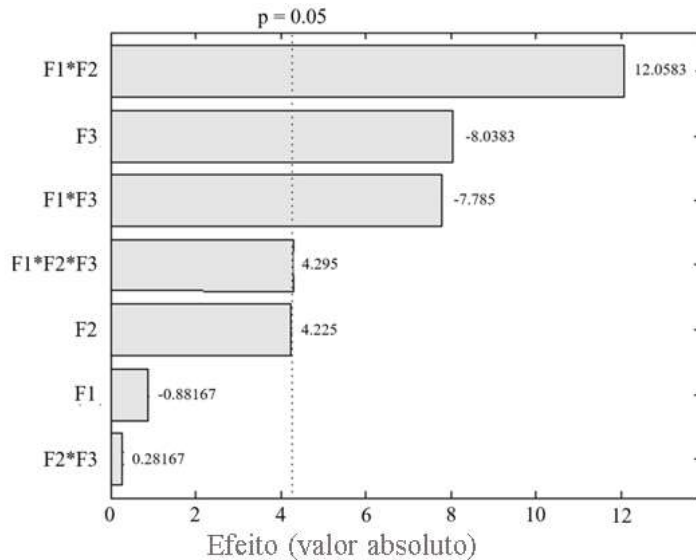
Ensaio	Fatores codificados			Fatores			Resposta
	F (1)	F (2)	F (3)	(1) Proporção ACN:ACT (mL)	(2) Força iônica (g de NaCl)	(3) Tempo de congelamento (min)	Recuperação ± DPR
1	-	-	-	8,0:0,0	0,0	60	102,5 ± 5,7
2	-	-	+	8,0:0,0	0,0	120	106,3 ± 7,5
3	-	+	-	8,0:0,0	0,2	60	98,7 ± 2,4
4	-	+	+	8,0:0,0	0,2	120	94,4 ± 1,0
5	+	-	-	6,5:1,5	0,0	60	101,7 ± 1,6
6	+	-	+	6,5:1,5	0,0	120	81,5 ± 11,1
7	+	+	-	6,5:1,5	0,2	60	113,4 ± 2,6
8	+	+	+	6,5:1,5	0,2	120	102,1 ± 1,9

F = fator; ACN = acetonitrila; ACT = acetato de etila; DPR = desvio padrão relativo

Foi possível observar que o percentual de recuperação dos oito experimentos está na faixa de 81,5 a 113,4%, com DPR inferior a 11,1 (Tabela 4). Uma ANOVA foi aplicada para

avaliar os resultados analíticos, conforme apresentado no gráfico de Pareto da Figura 7, que permite visualizar os principais efeitos e suas interações.

Figura 7 - Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis e sua interação na ELL-PBT do fluopiram.

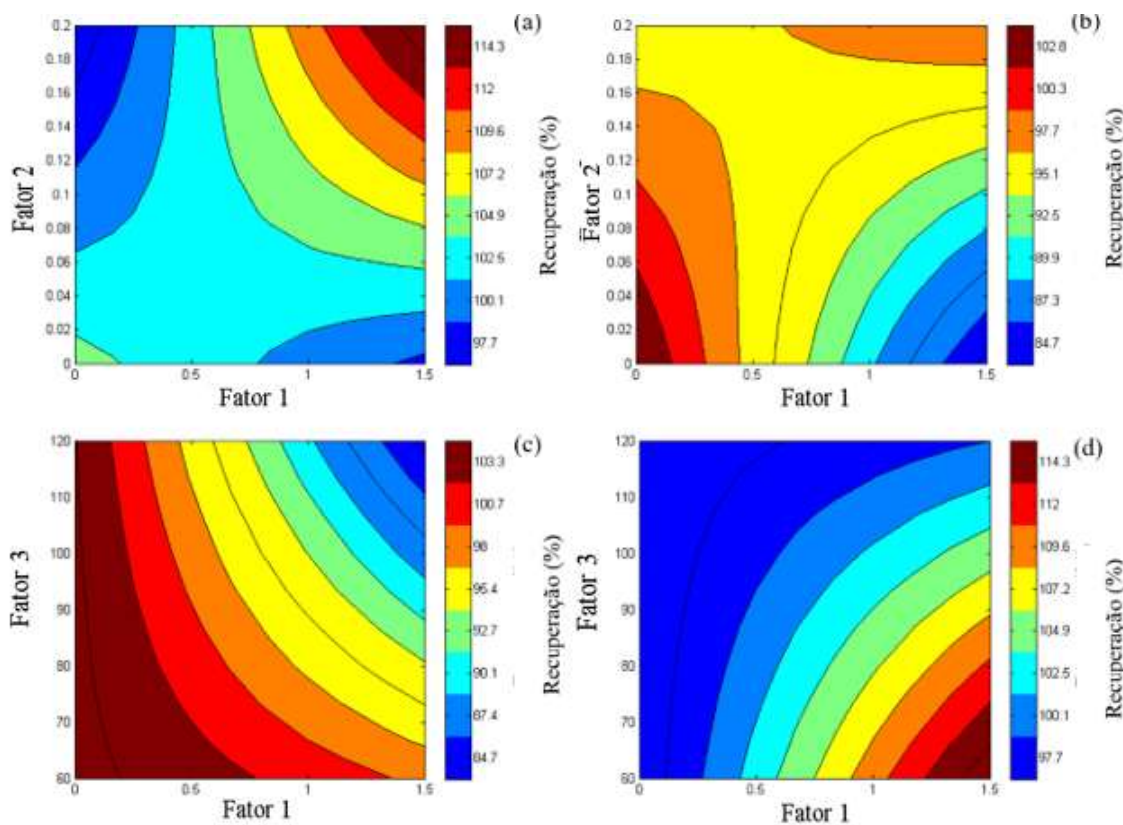


A linha tracejada no gráfico de Pareto indica se os fatores ou a interação entre os fatores foram estatisticamente significativos a um nível de probabilidade de 95% ($p \leq 0,05$) (NOMNGONGO e NGILA, 2015; REGTI *et al.*, 2017).

Não houve efeito estatisticamente significativo nos níveis avaliados na resposta analítica para o fator 1 e 2 (fase de extração e força iônica, respectivamente) e na interação entre os fatores 2 e 3, como pode ser visto no gráfico de Pareto (Figura 7). Por outro lado, o fator 3 (tempo) e as interações entre os fatores 1 e 3 foram significativas no nível (-), mostrando-se ótimas em níveis baixos. Além disso, as interações entre os fatores 1, 2 e 3 e os fatores 1 e 2 foram significativas nos níveis (+), ou seja, apresentaram melhor resposta nos níveis altos.

Uma representação gráfica (apresentada na Figura 8) foi feita para indicar as interações entre os três fatores estudados e a resposta analítica em termos de taxa de recuperação (GBASHI *et al.*, 2016; MUCKOYA *et al.*, 2020).

Figura 8 - Gráficos de superfície de resposta para efeitos interativos entre a fase de extração (Fator 1) e força iônica (Fator 2) no tempo de (a) 60 min e (b) 120 min; e os efeitos interativos entre a fase de extração (Fator 1) e o tempo de congelamento da amostra (Fator 3) com a força iônica no nível (c) (+) e (d) nível (-).



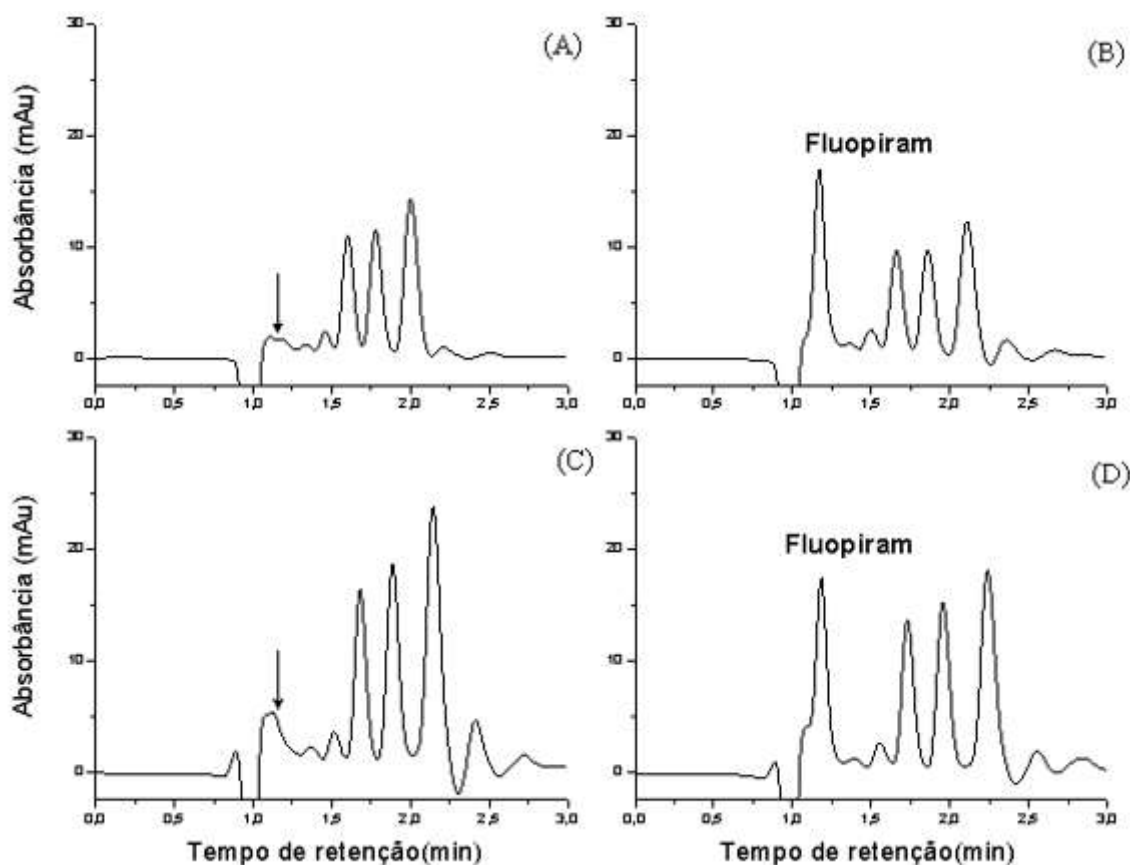
Considerando o fator tempo no nível (-) (60 min), observou-se que a maior porcentagem de recuperação foi alcançada utilizando a força iônica e a fase de extração no nível (+), ou seja, adicionando 0,2 g de NaCl e a fase de extração composta por 6,5 mL de ACN e 1,5 mL de ACT (Figura 8a). Por outro lado, ao avaliar o tempo no nível (+) (120 min), observou-se que a maior resposta analítica foi alcançada usando os fatores no nível (-) (ou seja, uma fase de extração composta por 8 mL de ACN e sem adição de sais referentes ao fator de força iônica) (Figura 8b).

Nos ensaios utilizando o fator de força iônica no nível (-), ou seja, sem adição de sais, verificou-se que as maiores respostas foram alcançadas utilizando 8 mL de ACN como fase de extração (nível (-)), e o fator tempo foi não significativo (Figura 8c). No nível (+) (ou seja, adição de 0,2 g de NaCl), a força iônica promoveu a extração principal usando a fase de extração composta por 6,5 mL de ACN e 1,5 mL de ACT (nível (+)) com o fator tempo no nível (-) (60 min) (Figura 8d).

Assim, observamos que os dois ensaios que obtiveram maiores respostas para extração do fluopiram foram o ensaio 2: fase de extração com ACN (8 mL), sem adição de sais para aumentar a força iônica e tempo de congelamento da amostra de 120 min; e o ensaio 8: fase de extração composta por 6,5 mL de ACN e 1,5 mL de ACT, força iônica com adição de 0,2 g de NaCl e tempo de congelamento da amostra de 60 min. As percentagens de recuperação em ambos os ensaios foram próximas de 100%. Assim, além dessa resposta analítica, os cromatogramas obtidos em cada experimento foram avaliados para verificar a seletividade do método.

Conforme mostrado nos cromatogramas apresentados na Figura 9, uma maior intensidade de sinais atribuídos a interferentes e maior ruído de linha de base no tempo de retenção (1,17 min) do analito alvo foi observado quando ACN:ACT foi usado como fase de extração do que a fase de extração composta pela ACN.

Figura 9 - Cromatogramas (A) do extrato branco e (B) do extrato da matriz fortificada obtido usando a fase de extração composta por acetonitrila (ACN); e cromatogramas de (C) o extrato em branco e (D) o extrato de matriz fortificada obtido usando a fase de extração composta por Acetato de etila (ACT).



Estudos anteriores que utilizaram ELL-PBT também relataram que essa fase de extração resultou em maior presença de impurezas no extrato injetado (SANTANA *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2021;). Esses interferentes podem resultar em maiores valores de LQ, causar efeito de matriz significativo, afetar a seletividade do método e, conseqüentemente, afetar a quantificação confiável do analito alvo. Além disso, as impurezas também podem danificar o instrumento (MA *et al.*, 2020).

Os métodos de preparação de amostras para análise de pesticidas devem ter as seguintes características analíticas desejadas: uma porcentagem de recuperação próxima a 100%, remover possíveis compostos interferentes para melhorar a seletividade e evitar o efeito indesejável da matriz, permitir aumentar a concentração do analito alvo e, portanto, a sensibilidade do ensaio e possuir boa precisão (HERCEGOVÁ *et al.*, 2007). Por todas essas razões, decidimos que a fase de extração constituída por 8 mL de ACN era ideal para a extração do fluopiram em amostras de água, pois o sinal de interferência tem uma área cromatográfica desprezível e não interfere na determinação do limite de quantificação.

Considerando todos os experimentos em que essa fase de extração foi utilizada, as melhores condições de extração do fluopiram foram alcançadas no ensaio 2. Portanto, o nível ótimo de cada fator avaliado no procedimento final foi: (1) fase de extração no nível (-), consistindo em 8 mL de ACN; (2) força iônica no nível (-), ou seja, sem adição de sais; e (3) tempo de congelamento da amostra no nível (+), ou seja, 120 min.

Assim, verificou-se que o planejamento fatorial completo foi útil para analisar as principais respostas obtidas em cada experimento, e uma análise dos cromatogramas obtidos permitiu identificar a seletividade e sensibilidade do método para obter melhores resultados analíticos e quantificação confiável do fluopiram por ELL-PBT seguido por análise CLAE-DAD. Após esta etapa de otimização do preparo da amostra, procedeu-se à validação analítica do método proposto.

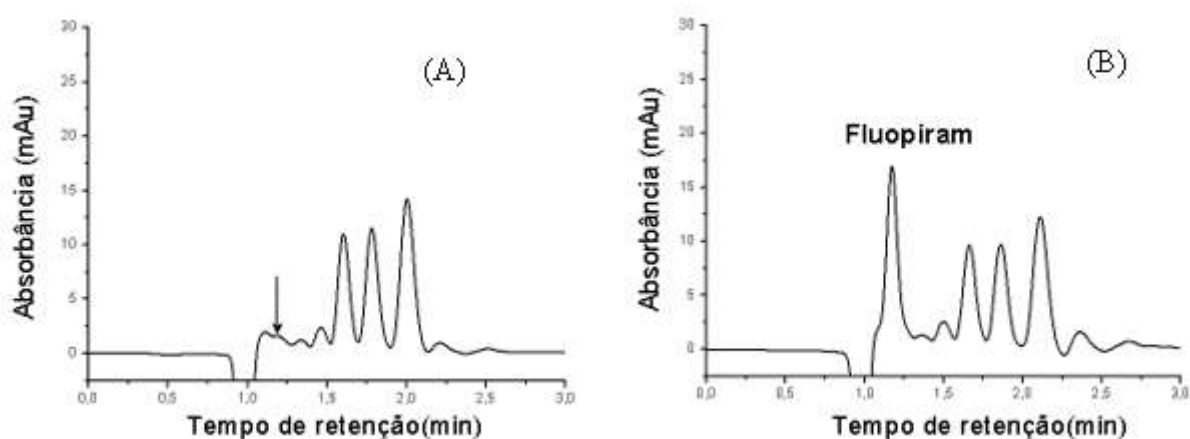
3.3 Validação

O método proposto neste estudo foi validado de acordo com os critérios do protocolo SANTE (SANTE, 2019). Foram avaliados seletividade, os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), precisão, exatidão, faixa de linearidade e efeito de matriz.

3.3.1 Seletividade

Os cromatogramas do extrato em branco não apresentaram sinais atribuídos aos interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção (1,17 min) do fluopiram, como pode ser visto na Figura 10. Portanto, o método ELL-PBT seguido pela análise CLAE-DAD foi considerado seletivo para este analito alvo.

Figura 10 - Cromatogramas do (A) extrato da matriz livre dos analitos e (B) extrato da matriz fortificada com fluopiram, na concentração de $120 \mu\text{g L}^{-1}$.



3.3.2 Limites de quantificação e detecção

Os valores de LD e LQ obtidos no método ELL-PBT seguido de CLAE-DAD foram 4 e $6 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 5). Recomenda-se que o valor do LQ seja inferior ou da mesma ordem de grandeza que os limites máximos de resíduos (LMRs) ou o nível de resíduos permitido. No entanto, valores de LMRs para o fluopiram em água não foram encontrados, provavelmente porque é um pesticida relativamente novo (MEKONNEN *et al.*, 2018; VARGAS-PÉREZ, GONZÁLEZ e FRENICH, 2020). No entanto, valores de LQ na faixa de 5 a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ foram relatados em estudos anteriores que analisaram o fluopiram em frutas e amostras de hortaliças pelo método QuEChERS (; MATADHA *et al.*, 2019; VARGAS-PÉREZ, GONZÁLEZ e FRENICH, 2020), extração líquido-líquido e extração em fase sólida (SAHA *et al.*, 2014). Assim, os valores de LQ alcançados neste estudo estão dentro dos valores encontrados na literatura.

Tabela 5 - Resultados do estudo de validação analítica da ELL-PBT combinada à CLAE-DAD

Faixa de linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	R^2	Recuperação \pm DPR (%)			LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
			6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ a	80 $\mu\text{g L}^{-1}$ b	160 $\mu\text{g L}^{-1}$ a		
6 – 200	$y = 69366,0x - 129939,7$	0,9997	107,5 \pm 1,2	103,8 \pm 2,5	107,6 \pm 3,1	4	6

^a Média de 3 repetições; ^b Média de 7 repetições; R^2 = coeficiente de correlação; DPR = desvio padrão relativo; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação.

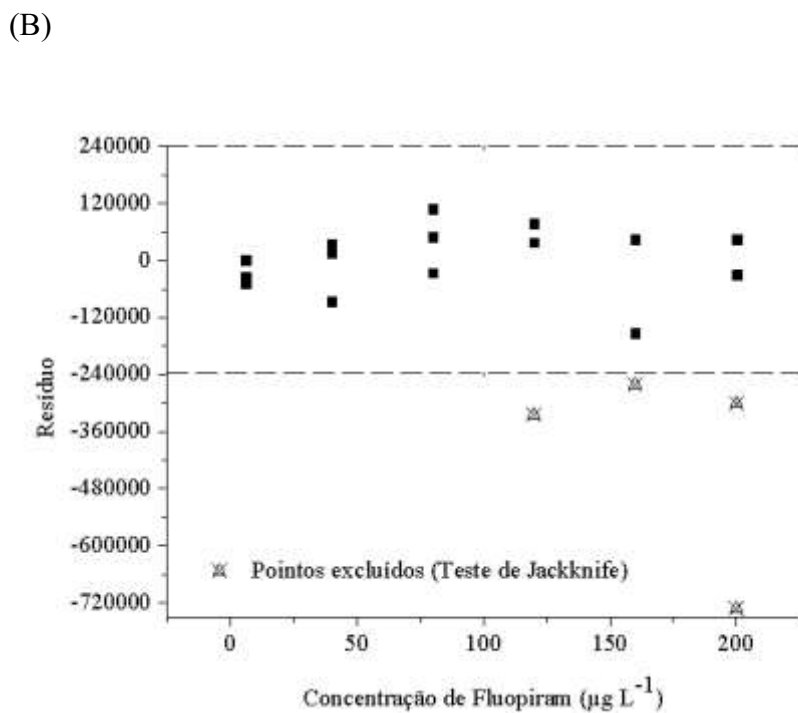
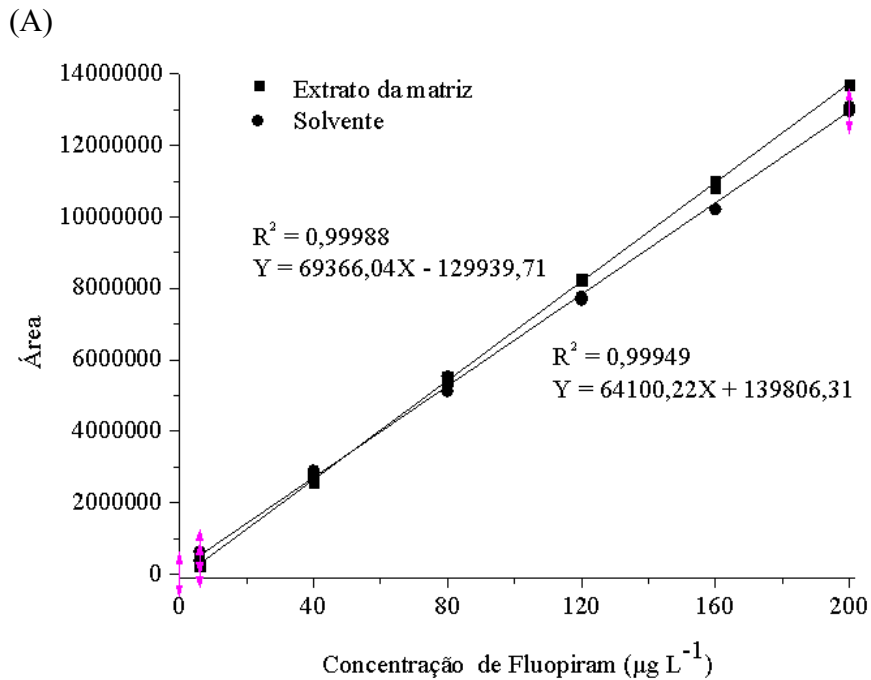
3.3.3 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram determinadas simultaneamente por experimentos de fortificação e recuperação. O método ELL-PBT seguido pela análise CLAE-DAD foi preciso e exato para determinar o fluopiram em amostras de água, pois os valores de DPR obtidos foram inferiores à 4% e as taxas de recuperação estão entre 103 e 108%, como pode ser visto na Tabela 5, e conforme estabelecido pelas diretrizes da SANTE (SANTE, 2019).

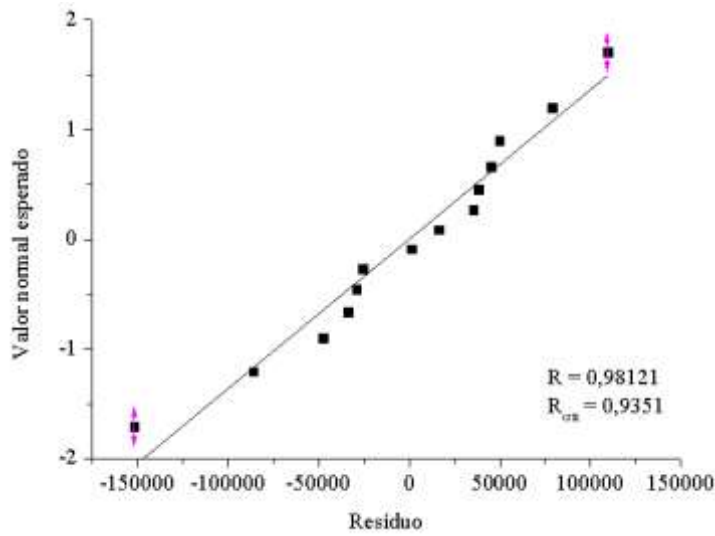
3.3.4 Linearidade

A linearidade do método otimizado foi determinada por curvas analíticas em extrato da matriz em seis níveis de concentração (6; 40; 80; 120; 160 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) em triplicata, conforme pode ser observado na Figura 11A.

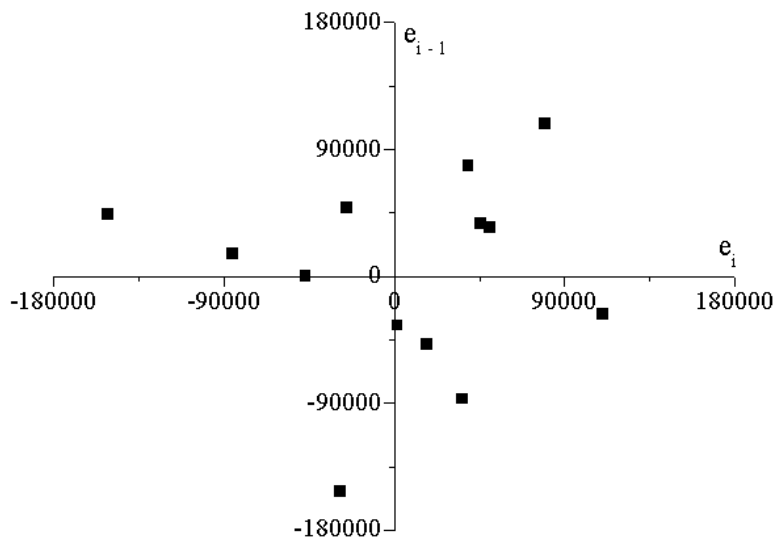
Figura 11 - (A) Curvas analíticas da solução do fluopiram em solvente e extrato de matriz; (B) Resíduos de regressão linear após a exclusão dos valores extremos. e_i: resíduo da regressão (teste de Jackknife); (C) Probabilidade normal dos resíduos da regressão (teste de Ryan-Joiner); (D) Autocorrelação dos resíduos da regressão (teste de Durbin-Watson).



(C)



(D)



Essa faixa de linearidade incluiu o valor do LQ ($6 \mu\text{g L}^{-1}$) e a concentração de fortificação da amostra ($120 \mu\text{g L}^{-1}$). O teste Jackknife foi empregado para excluir quatro valores extremos (Figura 11B). Em seguida, aplicou-se o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), obtendo-se os coeficientes de inclinação, de interseção e de determinação (R^2), que podem ser observados na Tabela 5 e na Figura 11A. A probabilidade normal dos resíduos foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner, uma vez que o coeficiente de correlação obtido (0,98121) foi superior ao coeficiente de correlação crítico (0,9351) (Figura 11C). O valor t_L (-0,548) obtido no teste de Brown-Forsythe foi inferior ao valor $t_{crítico}$ (2,179) e a distribuição dos resíduos foi homogênea ao longo dos níveis de concentração, confirmando assim a

homocedasticidade dos resíduos da regressão. O teste de Durbin-Watson foi aplicado para avaliar a independência dos resíduos da regressão e os resultados não apresentaram autocorrelação e uma distribuição aleatória desses resíduos nos quatro quadrantes da representação gráfica observada na Figura 11D.

Os resultados da ANOVA (Tabela 6) confirmaram regressão significativa ($F > F_{crit}$) e desvio de linearidade não significativo ($F < F_{crit}$). Portanto, o método ELL-PBT seguido de análise por CLAE-DAD pode ser considerado linear para determinação do fluopiram em amostras de água na faixa de 6 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 6 - ANOVA para a significância da regressão e desvio da linearidade

	Regressão	Desvio da linearidade
n	14	14
F_{crit}	4,75	3,84
F	$4,88 \times 10^4$	1,12

n: número de observações; F_{crit} : crítico; F: razão entre variações

3.3.5 Efeito de matriz

O efeito de matriz foi calculado comparando os coeficientes angulares (inclinação) obtidos a partir das curvas analíticas no extrato da matriz e no solvente (ou seja, ACN) (Figura 12a), obtendo um valor de 8,2%. Estudos anteriores consideraram este valor como um baixo efeito de matriz (ECONOMOU *et al.*, 2009; TOMASINI *et al.*, 2012) e pode representar um pequeno aumento nas áreas cromatográficas do sinal atribuído ao analito alvo (NIESSEN, MANINI e ANDREOLI, 2006). Um trabalho anterior realizado com a matriz aquosa e empregando extração em fase sólida detectou um efeito matriz inferior à 15 % para águas superficiais e inferior à 25 % para águas residuais (GULKOWSKA *et al.*, 2014).

3.4 Aplicabilidade da amostra real

A aplicabilidade do método otimizado e validado neste estudo foi avaliado por meio da análise de 20 amostras reais de água ambiental coletadas em recursos hídricos com provável contaminação pelo analito alvo. No entanto, nenhum resíduo do fluopiram em concentração superior aos valores de LD e LQ foi detectado nas amostras.

3.5 Comparação entre métodos de extração

Até o momento, poucos estudos foram realizados para desenvolver um método de extração para determinação do fluopiram em amostras de água, como pode ser observado na Tabela 7, somente a extração em fase sólida (EFS) seguida de análise por CLAE-EM/EM foi empregada. Os resultados alcançados por Pinasseau *et al.* (2020) resultou em baixas taxas de recuperação. Por outro lado, o estudo realizado por Gulkowsk *et al.* (2014) resultou em limites extremamente baixos de quantificação e detecção, como também pode ser observado na tabela abaixo.

Tabela 7 - Métodos de extração do fluopiram em amostras de água e em outras matrizes

Método de extração	Equipamento de análise	Amostra	Volume da amostra	Volume do solvente	LD (μgL^{-1})	LQ (μgL^{-1})	Taxa de recuperação (%)	Referência
ELL-PBT	CLAE-DAD	Água	4 mL	8 mL	4	6	~100	Este estudo
EFS	CLAE-EM/EM	Água subterrânea	30 mL	10 mL	-	-	51,2 ± 7,4	Pinasseau <i>et al.</i> (2020)
EFS-CLAE	CL-EM/EM	Águas superficiais e águas residuais	-	-	1,10 ⁻⁴ à 5,10 ⁻⁴	5,10 ⁻⁴ à 2,10 ⁻³	> 90	Gulkowska <i>et al.</i> (2014)

Continuação da Tabela 7 - Métodos de extração do fluopiram em amostras de água e em outras matrizes

QuEChERS	CL-EM/EM	Pimentão, tomate e solo	10 g	10 mL	1,5	5	80-94	Mathada <i>et al.</i> (2021)
QuEChERS	CG/EM	Romã (fruto)	10 g	10 mL	2,0	10	8,06–100,51	Mathada <i>et al.</i> (2019)
QuEChERS	CL-EM/EM	Solo	10 g	20 mL	2,5	8,3	80,6 – 93,5	Mahdavi <i>et al.</i> (2021)
QuEChERS	CG/EM	Solo	15 g	10 mL	3,0	10	88,6 – 98,0	Mohapatra <i>et al.</i> (2018)
QuEChERS	CL-EM/EM	Solo e pepino	15 g	20 mL	17	50	86,6 – 92,7	Chawla <i>et al.</i> (2018)
QuEChERS	CG/EM	Solo	15 g	20 mL	17	50	96,0 – 107,0	Katna <i>et al.</i> (2018)

ELL-PBT - Extração Líquido-Líquido com Purificação em Baixa Temperatura; EFS - Extração em Fase Sólida; QuEChERS - Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro; CLAE-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos; CLAE-EM/EM - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo; CL-EM/EM: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo.; CG/EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa; LQ - Limite de Quantificação; LD - Limite de Detecção.

O método otimizado e validado em nosso estudo utilizou um volume menor de amostra e fase extratora em relação aos métodos de extração já desenvolvidos, como pode ser visto na Tabela 7. A taxa de recuperação e os valores de LD e LQ alcançados em nosso trabalho foram semelhantes aos encontrados para o fluopiram em outras matrizes como solos e frutos, porém nossos LD e LQ foram superiores aos alcançados por Gulkowska *et al.*, (2014) (MATADHA, MOHAPATRA e SIDDAMALLAIAH, 2021).

É importante destacar que uma das principais vantagens do método ELL-PBT é a ausência de uma etapa de limpeza, o que torna o método mais rápido e fácil de executar. Além disso, este método tem se mostrado de fácil execução, pois possui poucas etapas e também é mais barato que outros métodos que empregam equipamentos ou cartuchos de extração em fase sólida. Por todas essas razões, entendemos que a ELL-PBT é uma alternativa interessante e promissora para a determinação do fluopiram em amostras aquosas.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, otimizamos e validamos o método de ELL-PBT para determinação do fluopiram em amostras de água. Este método mostrou-se de fácil execução, sensível, eficiente, eficaz e econômico. A metodologia foi seletiva, precisa, exata, linear e com baixo efeito de matriz na determinação do fluopiram em amostras de água. Os limites de quantificação obtidos foram semelhantes a um trabalho anterior realizado para outras matrizes e utilizando outros métodos de extração. Portanto, a ELL-PBT pode ser considerado uma alternativa eficiente para monitorar o fluopiram em amostras de água.

REFERÊNCIAS

BRASIL. RESOLUÇÃO-RE Nº 2.118, de 1/8/2019 (DOU de 5/8/2019). Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/pncrc-2014.pdf>. Acesso em: 27 nov 2022.

CEBALLOS-ALCANTARILLA, Eric; AGULLÓ, Consuelo; ABAD-SOMOVILLA, Antonio; ABAD-FUENTES, Antonio; MERCADER, Josep V. Highly sensitive monoclonal antibody-based immunoassays for the analysis of fluopyram in food samples. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 288, p. 117-126, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.007>

CHAWLA, Suchi; PATEL, Dilip J.; PATEL, Sunny H.; KALASARIYA, Ravi L.; SHAH, Paresh G. Behaviour and risk assessment of fluopyram and its metabolite in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and in soil. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 25, n. 12, p. 11626-11634, 10 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-1439-y>.

DONG, Bizhang; HU, Jiye. Dissipation and residue determination of fluopyram and tebuconazole residues in watermelon and soil by GC-MS. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 94, n. 5, p. 493-505, 30 jan. 2014. InformaUK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2013.841152>.

ECONOMOU, Anastasios; BOTITSI, Helen; ANTONIOU, Spyros; TSIPI, Despina. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [S.L.], v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.031>.

European Commission Regulation (2013) Commission implementing regulation (EU) No 802/2013 of 22 August 2013 approving the active substance fluopyram, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011. **Official Journal of the European Union**, L225,1316. Disponível em: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:225:0013:0016:EN:PDF>. Acesso em 28 de nov. 2022.

FREITAS, L.; SICUPIRA, L.; PINHO, G.; SILVÉRIO, F. Optimization and Validation of LLE-LTP and QuEChERS Methodologies for Determining 2,4-D in Water Samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 1898-1907, 2020. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200086>.

FREITAS, Lucas Victor Pereira de; ALVES, Lorena Maria Guimarães; SICUPIRA, Lázaro Chaves; PINHO, Gevany Paulino de; SILVÉRIO, Flaviano Oliveira. Determination of DDT in honey samples by liquid-liquid extraction with low-temperature purification (LLE-LTP) combined to HPLC-DAD. **Analytical Methods**, [S.L.], v. 13, n. 16, p. 1955-1964, 2021. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d1ay00264c>.

GBASHI, S.; NJOBEH, P.; STEENKAMP, P.; TUTU, H.; MADALA, N. The effect of temperature and methanol–water mixture on pressurized hot water extraction (PHWE) of anti-HIV analogues from *Bidens pilosa*. **Chemistry Central Journal**, v. 10, ed. 1, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13065-016-0182-z>

GULKOWSKA, Anna; BUERGE, Ignaz J.; POIGER, Thomas. Online solid phase extraction LC–MS/MS method for the analysis of succinate dehydrogenase inhibitor fungicides and its applicability to surface water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 406, n. 25, p. 6419-6427, 22 ago. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-8073-4>.

HERCEGOVÁ, Andrea; DÖMÖTÖROVÁ, Milena; MATISOVÁ, Eva. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, [S.L.], v. 1153, n. 1-2, p. 54-73, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.008>.

KATNA, Sapna; DUBEY, Jatiender Kumar; PATYAL, Surender Kumar; DEVI, Nisha; CHAUHAN, Avinash; SHARMA, Ajay. Residue dynamics and risk assessment of Luna Experience® (fluopyram + tebuconazole) and chlorpyrifos on French beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 25, n. 27, p. 27594-27605, 27 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-2733-4>.

LI, Changjian; YUAN, Shaofeng; JIANG, Feng; XIE, Yunfei; GUO, Yahui; YU, Hang; CHENG, Yuliang; QIAN, He; YAO, Weirong. Degradation of fluopyram in water under ozone enhanced microbubbles: kinetics, degradation products, reaction mechanism, and toxicity evaluation. **Chemosphere**, [S.L.], v. 258, p. 127216, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127216>.

MA, Lingfei; WANG, Yanfei; LI, Haipu; PENG, Fangyuan; QIU, Bo; YANG, Zhaoguang. Development of QuEChERS-DLLME method for determination of neonicotinoid pesticide residues in grains by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 331, p. 127190, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127190>.

MAGDY, Galal; HAKIEM, Ahmed F. Abdel; BELAL, Fathalla; ABDEL-MEGIED, Ahmed M. A novel quality by design approach for development and validation of a green reversed-phase HPLC method with fluorescence detection for the simultaneous determination of lesinurad, febuxostat, and diflunisal: application to human plasma. **Journal of Separation Science**, [S.L.], v. 44, n. 11, p. 2177-2188, 15 abr. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.202100016>.

MAHDAVI, Vahideh; BEHBAHAN, Arnavaz Keikavousi; MORADI, Fatemeh; ABOUL-ENEIN, Hassan Y. Analysis of Alternative New Pesticide (Fluopyram, Flupyradifurone, and Indaziflam) Residues in Pistachio, Date, and Soil by Liquid Chromatography Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **Soil And Sediment Contamination: An International Journal**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 373-383, 6 jan. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15320383.2020.1854173>.

MATADHA, Nagapooja Yogendraiah; MOHAPATRA, Soudamini; SIDDAMALLAIAH, Lekha; UDUPI, Veena Rao; GADIGEPPA, Shambulinga; RAJA, Danish Poothotathil. Uptake and distribution of fluopyram and tebuconazole residues in tomato and bell pepper plant tissues. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 6077-6086, 6 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-04071-4>.

MATADHA, Nagapooja Yogendraiah; MOHAPATRA, Soudamini; SIDDAMALLAIAH, Lekha. Distribution of fluopyram and tebuconazole in pomegranate tissues and their risk assessment. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 358, p. 129909, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129909>.

MEKONNEN, Tessema F.; PANNE, Ulrich; KOCH, Matthias. New Photodegradation Products of the Fungicide Fluopyram: structural elucidation and mechanism identification. **Molecules**, [S.L.], v. 23, n. 11, p. 2940, 10 nov. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23112940>.

MESQUITA, Tayane C. R.; SANTOS, Rizia R.; CACIQUE, Ane P.; SÁ, Ludimara J. de; SILVÉRIO, Flaviano O.; PINHO, Gevany P. Easy and fast extraction methods to determine organochlorine pesticides in sewage sludge, soil, and water samples based at low temperature. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [S.L.], v. 53, n. 3, p. 199-206, 7 dez. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2017.1405626>.

MUCKOYA, Vallerie A.; NOMNGONGO, Philiswa N.; NGILA, Jane C.. Factorial Design Optimisation of Solid Phase Extraction for Preconcentration of Parabens in Wastewater Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry. **Current Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 436-446, 1 jun. 2020. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/1573411014666180627150854>.

MOHAPATRA, Soudamini; SIDDAMALLAIAH, Lekha; BUDDIDATHI, Radhika; MATADHA, Nagapooja Yogendraiah. Dissipation kinetics and risk assessment of fluopyram and tebuconazole in mango (*Mangifera indica*). **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 98, n. 3, p. 229-246, 19 fev. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2018.1445244>.

NIESSEN, W.M.A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 881-899, 16 jun. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mas.20097>.

NOMNGONGO, Philiswa N.; NGILA, J. Catherine. Multivariate optimization of dual-bed solid phase extraction for preconcentration of Ag, Al, As and Cr in gasoline prior to inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination. **Fuel**, [S.L.], v. 139, p. 285-291, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.08.046>.

PEREIRA, Najara G. F.; SILVÉRIO, Flaviano O.; PINHO, Gevany P. Optimisation, validation and application of the solid-liquid extraction with low-temperature purification followed by gas chromatography-mass spectrometry for determination of phthalates in sewage sludge. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 100, n. 9, p. 968-980, 29 jul. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2019.1646735>.

PINASSEAU, Lucie; WIEST, Laure; VOLATIER, Laurence; MERMILLOD-BLONDIN, Florian; VULLIET, Emmanuelle. Emerging polar pollutants in groundwater: potential impact of urban stormwater infiltration practices. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 266, p. 115387, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115387>.

PINHO, Gevany Paulino de; NEVES, Antônio Augusto; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de; SILVÉRIO, Flaviano Oliveira. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, [S.L.], v. 21, n. 10, p. 1307-1311, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.03.006>.

PODBIELSKA, M.; SZPYRKA, E.; PIECHOWICZ, B.; ZWOLAK, A.; SADŁO, S. Behavior of fluopyram and tebuconazole and some selected pesticides in ripe apples and consumer exposure assessment in the applied crop protection framework. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 350, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6057-5>

REGTI, Abdelmajid; LAAMARI, My Rachid; STIRIBA, Salah-Eddine; HADDAD, Mohammadine El. Use of response factorial design for process optimization of basic dye adsorption onto activated carbon derived from Persea species. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 130, p. 129-136, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.08.012>.

RODRIGUES, Alessandra Aparecida Zinato; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de; NEVES, Antônio Augusto; OLIVEIRA, André Fernando de; PRATES, Lucas Henrique Figueiredo; FREITAS, Jéssika Faêda de; HELENO, Fernanda Fernandes; FARONI, Lêda Rita D'Antonino. Use of ozone and detergente for removal of pesticides and improving storage quality of tomato. **Food Research International**, [S.L.], v. 125, p. 108626, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108626>.

SAHA, Sujoy; JADHAV, Manjusha R.; SHABEER, T. P. Ahammed; BANERJEE, Kaushik; SHARMA, Bineet K.; LOGANATHAN, M.; RAI, A. B. Safety Assessment and Bioefficacy of Fluopyram 20 %+Tebuconazole 20 %-40 SC in Chilli, *Capsicum annum* L. Against Anthracnose Disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, [S.L.], v. 86, n. 2, p. 359-366, 14 nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40011-014-0450-4>.

SANTANA, Escarlet T. D.; SOARES, Dayane F.; FARIA, Anizio M. Development of a Methodology for the Determination of Pesticide Residues in Cajá-Manga Pulp (*Spondias dulcis*L.) Using Solid-Liquid Extraction with Low-Temperature Partitioning. **Journal of Chemistry**, [S.L.], v. 2018, p. 1-10, 1 nov. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/6012503>.

SANTE/12682/2019, European Commission / Directorate-General for Health and Food Safety (2019) **Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and Feed**. Implemented by January 2020. Disponível em: https://www.eurlpesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE019_12682.pdf . Acesso em: 10 nov. 2022.

TOMASINI, Débora; SAMPAIO, Maicon R.F.; CALDAS, Sergiane S.; BUFFON, Jaqueline G.; DUARTE, Fábio A.; PRIMEL, Ednei G. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, [S.L.], v. 99, p. 380-386, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.068>.

VARGAS-PÉREZ, Marta; GONZÁLEZ, Francisco Javier Egea; FRENICH, Antonia Garrido. Dissipation and residue determination of fluopyram and its metabolites in greenhouse crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S.L.], v. 100, n. 13, p. 4826-4833, 13 jul. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.10542>.

ZHOU, J., LIANG, S., CUI, Y., RONG, Y., SONG, J., and LV, D. Study on environmental behaviour of fluopyram in different banana planting soil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 15346, jul. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91460-4>

CAPÍTULO 3. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ESL-PBT) MINIATURIZADA PARA DETERMINAÇÃO DE FLUOPIRAM EM DIFERENTES TIPOS DE SOLO

RESUMO

O fluopiram é um fungicida que também pode ser utilizado como nematicida em áreas agrícolas. Em 2019, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou a comercialização e uso dessa molécula na agricultura brasileira, porém ainda são escassos os estudos envolvendo o desenvolvimento de método de extração e quantificação deste composto em matrizes ambientais como água e solo. Por isso, o presente estudo teve como objetivo a otimização e validação da versão miniaturizada do método de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) para determinação deste composto em amostras de solos arenosos, argilosos e com textura média. Neste estudo, todas as análises foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM do inglês *Selected Ion Monitoring*). Os resultados revelaram que as porcentagens de recuperação do analito nos três tipos de solos variaram de 86 a 114% com desvio padrão relativo inferior a 15%. Além de empregar menores quantidades de reagentes e amostra, o método ESL-PBT miniaturizado se apresentou seletivo, preciso, exato, linear na faixa de 3 a 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e atingindo limite de quantificação inferior a 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os três tipos de solos. O método de extração otimizado e validado foi aplicado em 30 amostras reais coletadas em regiões de cultivo de café, porém não foi detectada nestas amostras nenhum resíduo deste composto.

Palavras-chave: Fluopiram; ESL-PBT miniaturizada; Fungicida do grupo benzamida piramida,

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF THE MINIATURIZED SOLID-LIQUID EXTRACTION WITH LOW TEMPERATURE PURIFICATION (SLE-LTP) METHOD FOR DETERMINING FLUOPYRAM IN DIFFERENT SOIL TYPES

ABSTRACT

Fluopyram is a fungicide which can also be used as a nematicide in agricultural areas. The Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) authorized the commercialization and use of this molecule in Brazilian agriculture in 2019, but studies involving the development of an extraction and quantification method of this compound in environmental matrices such as water and soil are still scarce. Therefore, the present study aimed to optimize and validate the miniaturized version of the solid-liquid extraction with low temperature purification (SLE-LTP) method for determining this compound in sandy, clayey and medium-textured soil samples. All analyzes in this study were performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) in SIM mode (*Selected Ion Monitoring*). The results revealed that the analyte recovery percentages in the three soil types ranged from 86 to 114% with a relative standard deviation of less than 15%. In addition to employing smaller amounts of reagents and sample, the miniaturized SLE-LTP method was selective, precise, exact, and linear in the range from 3 to 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and reached a quantification limit lower than 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for the three soil types. The optimized and validated extraction method was applied to 30 real samples collected in coffee growing regions, but no residue of this compound was detected in these samples.

Keywords: Fluopyram; Miniaturized SLE-LTP; Benzamide pyramidal fungicide.

1 INTRODUÇÃO

O fluopiram, (N-[2-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridin-2-il]etil]-2(trifluorometil)benzamida), é um fungicida e nematicida desenvolvido pela Bayer Crop Science, o qual apresenta amplo espectro de atuação e pertence ao grupo das benzamidas piramidas. Este fungicida atua inibindo a enzima succinato desidrogenase no complexo II da cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias (LABOURDETTE *et al.*, 2011; VELOUKAS e KARAOGLANIDIS, 2012). Apesar da molécula do fluopiram já ser bem conhecida em vários países da Europa, dos Estado Unidos e também da Austrália, no Brasil, este composto teve sua comercialização e uso autorizados somente no ano de 2019.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) classificou este fungicida como um produto muito perigoso ao meio ambiente, o qual pode afetar a atividade microbiológica do solo e, conseqüentemente, na sua produtividade (ZHANG *et al.*, 2014; BRASIL, 2019). Neste sentido, estudo recente tem revelado que este composto é persistente e pode ser detectado no solo em até 80 dias após a aplicação em culturas de pimentão (MATADHA *et al.*, 2021).

Devido a sua recente inserção na agricultura brasileira, ainda não há estudos relacionados aos métodos de extração e detecção deste composto em solos brasileiros. Até onde sabemos, apenas o método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e a extração sólido-líquido foram otimizados e validados para este composto no solo (DONG e HU, 2014; PATEL *et al.*, 2016; MOHAPATRA *et al.*, 2018; CHAWLA *et al.*, 2018; KATNA *et al.*, 2018; MAHDAVI *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2021). Embora estes métodos tenham se mostrado muito eficiente e sensível, é recomendável o desenvolvimento de novos métodos de extração que possam ser mais simples, fáceis de executar, sensíveis, eficientes e baratos. Nesse sentido, trabalhos anteriores mostraram que a extração sólido-líquido com purificação a baixa temperatura (ESL-PBT) tem reunido estas características quando aplicada a outros contaminantes ambientais (PINHO *et al.*, 2010; MESQUITA *et al.*, 2017; SANTANA, SOARES e FARIA, 2018; HELENO *et al.*, 2019). Por isso, recentemente, uma variação miniaturizada deste método foi otimizado e validado para monitorar pesticidas em matrizes biológicas. Neste estudo, foi observado elevadas taxas de recuperação do analito, empregando menor quantidade de reagentes e amostra, além de manter a principal vantagem desse método que tem sido a extração e limpeza dos extratos em uma única etapa (SILVA *et al.*, 2021).

Em um estudo anterior, a Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa) definiu que no Brasil existem, pelo menos, 13 tipos de classes de solos que se diferenciam por suas

características químicas, físicas e morfológicas (DOS SANTOS *et al.*, 2018). Essa complexidade da matriz solo pode influenciar na taxa de recuperação de contaminantes químicos, como foi verificado em trabalho anterior de Đurović, Gajić-Umiljendić e Đorđević (2009). Por este motivo, neste estudo foi escolhido três tipos de solos com diferentes texturas e teores de matéria orgânica para garantir a aplicabilidade do método de extração.

Por isso, este estudo teve por objetivo otimizar e validar a versão miniaturizada da ESL-PBT seguida pela análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para determinação de fluopiram em solos arenosos, argilosos e com textura média.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

O padrão de fluopiram com pureza de 98% foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A solução estoque de fluopiram a 100 mg L^{-1} e as soluções intermediárias e de trabalho nas concentrações 20; 5; 1; e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ foram preparadas em acetonitrila grau HPLC e armazenadas em frascos âmbar a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Acetonitrila grau HPLC foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Acetonitrila grau PA foi adquirida da Êxodo Científica (Sumaré, Brasil). Acetato de etila grau HPLC foi adquirido da Dinâmica (Indaiatuba, Brasil). Sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

2.2 Amostras de solos

Amostras de solos do tipo arenoso, argiloso e de textura média foram coletadas respectivamente na zona rural de Montes Claros ($16^\circ 52' 47'' \text{S } 43^\circ 50' 49'' \text{W}$), zona rural de Francisco Sá ($16^\circ 29' 55'' \text{S } 43^\circ 31' 35'' \text{W}$) e em área experimental do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais ($16^\circ 40' 59'' \text{S } 43^\circ 50' 16'' \text{W}$) na profundidade de 30 cm. Os solos foram homogeneizados, peneirados em *tamiz* de 1 mm e armazenados no laboratório em frascos de vidro. A caracterização físico-química dos três solos é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização físico-química dos solos

	Solo Arenoso	Solo Argiloso	Solo de textura média
pH em água	6,30	6,93	6,69
Fósforo Mehlich (mg kg ⁻¹)	1,68	42,00	291,67
Potássio (mg kg ⁻¹)	10,00	1721,00	201,57
Cálcio (g kg ⁻¹)	0,08	2,29	1,82
Magnésio (mg kg ⁻¹)	17,60	694,00	150,33
Alumínio (g kg ⁻¹)	0,05	8,18	6,03
Soma de bases (cmol dm ⁻³)	0,81	0,43	0,22
CTC efetiva (cmol dm ⁻³)	1,62	2,25	1,56
Saturação por alumínio (%)	50,00	80,72	85,94
Matéria Orgânica (g kg ⁻¹)	9,60	118,74	92,23
Areia (%)	64,00	10,00	38,00
Silte (%)	8,00	48,00	30,00
Argila (%)	28,00	42,00	32,00

CTC = Capacidade de troca cátion-iônica

2.3 Equipamentos

No preparo das amostras foram utilizados uma balança analítica Shimadzu (São Paulo, Brasil), um vórtex da Scilogex (Rocky Hill, EUA) e uma centrífuga da Kindly (São Paulo, Brasil).

2.4 Otimização das condições cromatográficas

As análises dos extratos foram realizadas baseando-se nas condições cromatográficas descritas por Dong e Hu (2014). O tempo de análise cromatográfica foi o único parâmetro otimizado nesta etapa. As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo 7890A acoplado a um espectrômetro de massas modelo 5975C, ambos da Agilent Technologies, e uma coluna capilar SLB-5 MS (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) com fase estacionária 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (30 m comprimento x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25 µm espessura do filme interno). O gás de arraste utilizado foi o hélio (99,9999%) a um fluxo de 1 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi mantida em 260 °C, sendo que 1 µL do extrato foi injetado no modo *splitless* utilizando o auto injetor CombiPAL. A temperatura inicial da coluna foi 120 °C aumentando a uma taxa de 20 °C min⁻¹ até 220 °C, permanecendo nesta temperatura por 1 min. Em seguida, a temperatura foi elevada a uma taxa de 5 °C min⁻¹ até 250 °C. O tempo total da análise cromatográfica foi de 12 min. A temperatura da interface e da fonte de íons foram 280 °C e 230 °C, respectivamente. O detector espectrômetro de massas foi

utilizado no modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV e analisador de massas do tipo quadrupolo. Inicialmente analisou-se um padrão de 5 mg L⁻¹ no modo *scan* para obtenção do cromatograma de íons totais, e após a seleção dos íons de maior abundância adotou-se o modo seletivo de íons (MIS). Os íons selecionados foram *m/z* 145, 173, 195, 223.

2.5 Otimização do método de extração

Na otimização do preparo de amostras foram avaliadas duas fases extratoras (acetonitrila e acetonitrila/acetato de etila), a versão tradicional do método ESL-PBT utiliza 4 g de amostra, 4 mL de água e 8 mL de solvente orgânico (PINHO *et al.*, 2010), já a versão miniaturizada deste método empregou 1 g de amostra, 1 mL de água e 2 mL de solvente orgânico.

O método de extração empregado neste estudo foi o que obteve melhores resultados experimentais e está de acordo ao estudo de Silva *et al.* (2021) que miniaturizou a extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) para determinação de pesticidas em amostras biológicas. Assim, 1 mL de água destilada foi adicionada a um vial de 5 mL contendo 1 g de solo e homogeneizado em vórtex por 30 s. Adicionou-se 2 mL de acetonitrila e homogeneizou novamente por 30 s. Após 15 min de repouso as amostras foram congeladas à -20 °C por 1 h. Em seguida, 1 mL da fase orgânica sobrenadante foi transferida para um tubo de centrífuga, de 15 mL, contendo 130 mg de sulfato de sódio anidro e levado ao vórtex por 30 s. Após esta etapa, os tubos contendo os extratos foram centrifugados a 4000 rpm por 5 min, sendo que 800 µL do sobrenadante foi transferido para um vial de injeção e analisado por CG-EM.

2.6 Validação do método de extração

Para a validação do método seguiu-se os critérios recomendados por SANTE (2021). Para isso, foram estudados os parâmetros seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), faixa de linearidade, exatidão, precisão e efeito de matriz.

A seletividade foi estudada comparando cromatogramas de extrato da matriz livre do fluopiram (extrato branco) com cromatogramas do extrato da matriz fortificado com o fluopiram, na concentração de 90 µg kg⁻¹. A ausência de sinais cromatográficos no tempo de retenção do fluopiram no cromatograma do extrato branco, assegura a seletividade do método.

Os limites de detecção e quantificação foram considerados como sendo a menor

concentração de fluopiram na matriz que resultou em um sinal cromatográfico com 3 e 10 vezes a relação sinal ruído no tempo de retenção do fluopiram, respectivamente.

A faixa de linearidade do método foi estudada por meio da curva analítica de calibração empregando extratos da matriz fortificados em triplicata nas concentrações de 2; 10; 50; 90; 130; 170 e 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o solo arenoso e 3; 10; 50; 90; 130; 170 e 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os solos argiloso e textura média. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários e testes estatísticos descritos por Souza e Junqueira (2005).

A exatidão foi estudada com testes de recuperação em triplicata nas concentrações de 2; 90 e 170 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o solo arenoso e 3; 90 e 170 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os solos argiloso e textura média. Para a aceitabilidade do método a porcentagem de recuperação deve estar dentro da faixa de 70 a 120%.

A precisão foi estudada com testes de recuperação com sete repetições na concentração de 90 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para a aceitabilidade do método o desvio padrão relativo (DPR) deve ser inferior a 20%.

O efeito de matriz foi estudado, assim como descrito por Chamkasem e Harmon (2016), analisando as curvas analíticas de calibração de extratos fortificados com as curvas analíticas preparadas com o padrão em solvente puro, nas mesmas concentrações. O efeito de matriz foi calculado como a razão entre o coeficiente angular da curva analítica de calibração em extrato da matriz fortificado e o coeficiente angular da curva analítica preparada em solvente, multiplicado por 100, como pode ser observado na equação abaixo.

$$\text{Efeito de Matriz (EM)} = 1 - \frac{\alpha_{\text{matriz}}}{\alpha_{\text{solvente}}} \times 100$$

Em que, α_{matriz} é o coeficiente angular na curva analítica no extrato da matriz;
 α_{solvente} é o coeficiente angular na curva analítica em solvente.

2.7 Aplicação em amostra real

O fluopiram é autorizado, no Brasil, para uso em culturas do café. Por isso, neste estudo, nós coletamos 30 amostras de solos de diferentes regiões produtoras de café da região Sul do Estado de Minas Gerais para avaliar a presença de traços do fluopiram no solo. A Tabela 2 apresenta as coordenadas geográficas dos locais de coleta das amostras.

Tabela 2 - Coordenadas geográficas dos locais de coleta das amostras de solo

Amostra	Coordenadas geográficas
1	21°49'54.9"S, 45°27'32.0"W
2	21°49'53.5"S, 45°53'19.7"W
3	21°50'04.2"S, 45°53'30.7"W
4	21°50'06.7"S, 45°53'40.6"W
5	21°49'11.6"S, 45°53'35.5"W
6	21°48'55.6"S 45°54'46.9"W
7	21°48'44.6"S 45°55'03.2"W
8	21°48'27.8"S 45°55'07.1"W
9	21°48'14.9"S 45°55'23.3"W
10	21°48'11.5"S 45°55'33.1"W
11	21°48'10.9"S 45°55'42.3"W
12	21°48'03.8"S 45°55'49.1"W
13	21°48'02.6"S 45°55'59.7"W
14	21°48'04.5"S 45°56'15.1"W
15	21°47'24.2"S 45°56'33.3"W
16	21°47'29.6"S 45°56'27.4"W
17	21°47'23.0"S 45°56'27.0"W
18	21°47'17.8"S 45°56'11.5"W
19	21°47'12.3"S 45°56'04.5"W
20	21°47'14.8"S 45°56'17.7"W
21	21°45'06.5"S 45°56'58.0"W
22	21°45'20.0"S 45°57'15.8"W
23	21°47'43.3"S 45°59'13.5"W
24	21°47'36.9"S 45°59'04.1"W
25	21°47'42.3"S 45°59'03.9"W
26	21°47'48.6"S 45°59'11.8"W
27	21°48'04.5"S 45°59'22.2"W
28	21°48'06.5"S 45°59'26.3"W
29	21°47'34.2"S 45°58'51.5"W
30	21°47'26.0"S 45°58'40.5"W

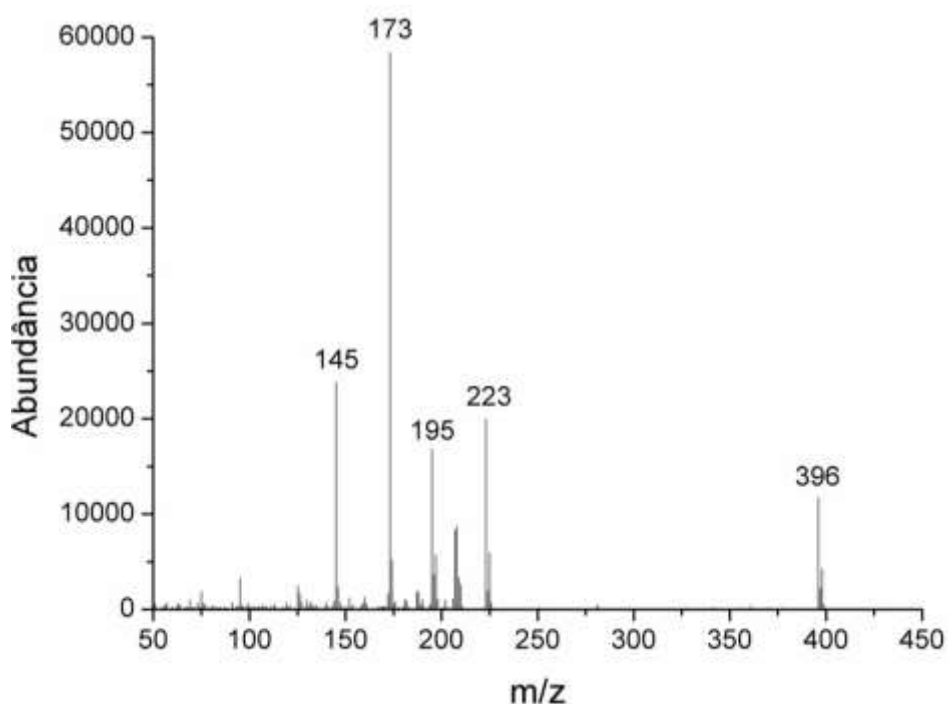
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização das condições cromatográficas

Para a otimização das condições cromatográficas, foi analisada uma solução padrão do fluopiram a 5 mg L^{-1} seguindo a condição cromatográfica descrita por Dong e Hu (2014), no modo *scan*, visando determinar o tempo de retenção do composto e os íons mais abundantes no espectro de massas, como apresentando na Figura 1. O tempo de retenção encontrado foi de 8,86 min e os íons mais abundantes, assim como no artigo citado, foram 173, 145, 223, 195 e 396. Em seguida foram selecionados os íons 145, 173, 195, 223 e realizada análise de uma solução padrão a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ no modo MIS.

No estudo realizado por Dong e Hu (2014) o tempo de análise foi de 17 min, mas neste estudo o fluopiram foi eluído em 8,86 min e o tempo total de análise foi de 12 min, devido ao *post run*, para garantir que nenhum interferente da matriz ficasse retido na coluna cromatográfica. A Figura 1 exibe o espectro de massas do fluopiram na concentração de 5 mg L^{-1} no modo *scan*.

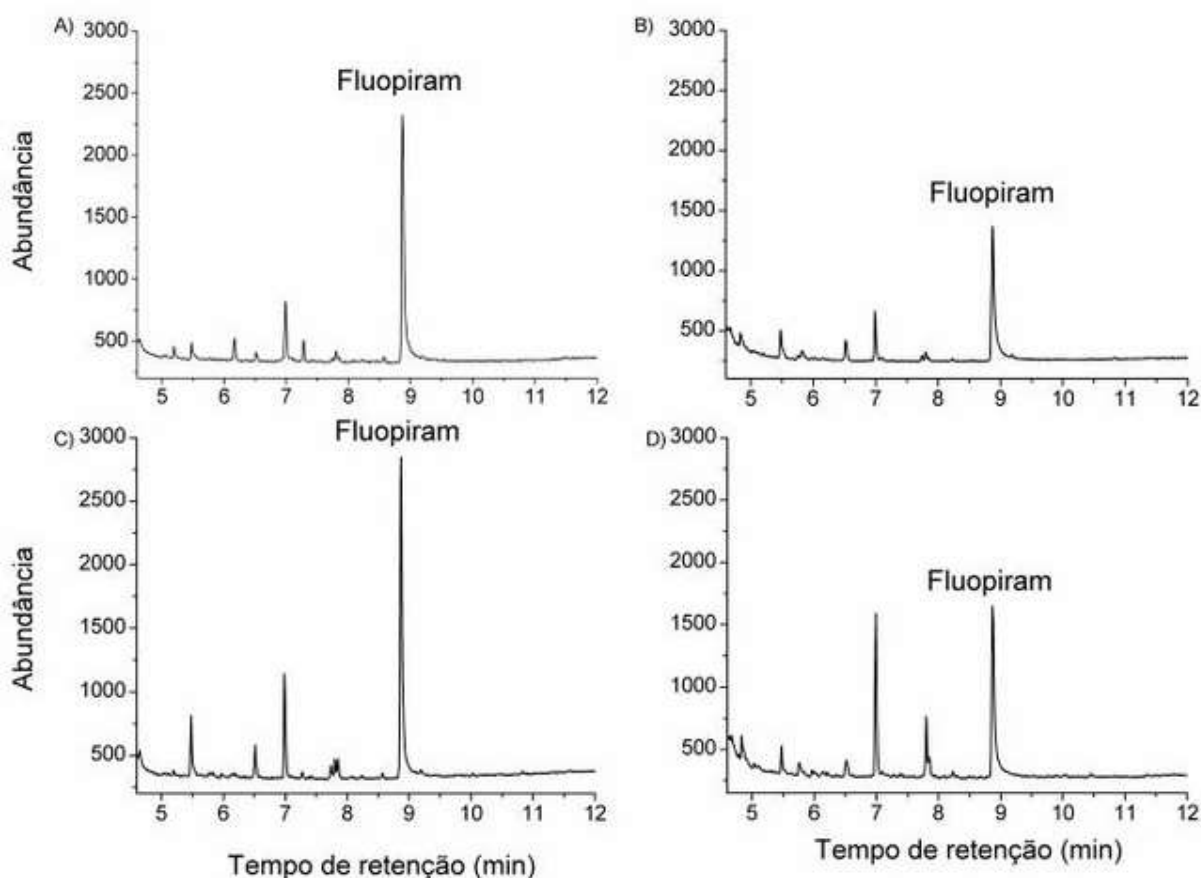
Figura 1 - Espectro de massas do fluopiram na concentração de 5 mg L^{-1} no modo *scan*.



3.2 Otimização do método de extração

A primeira etapa da otimização do método de extração foi definir o melhor método de extração (versão tradicional ou miniaturizada da ESL-PBT) e a melhor fase extratora (8 mL de acetonitrila ou 6,5 mL de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila). O cromatograma obtido para cada experimento pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Cromatogramas de extratos da matriz fortificados com fluopiram a $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ no solo arenoso. (A) ESL-PBT tradicional com fase extratora acetonitrila; (B) ESL-PBT tradicional com fase extratora acetonitrila + acetato de etila; (C) ESL-PBT miniaturizada com fase extratora acetonitrila; (D) ESL-PBT miniaturizada com fase extratora acetonitrila + acetato de etila.



Como pode ser visto na Figura 2C a intensidade do sinal do fluopiram foi maior empregando a acetonitrila como fase extratora e empregando a ESL-PBT na versão miniaturizada. O uso do acetato de etila na fase extratora além de reduzir a intensidade do sinal do analito estudado proporcionou uma intensificação do efeito de matriz, evidenciado pelas

altas porcentagens de recuperação, como mostra a Tabela 3. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Silva *et al.* (2021), que atingiu taxas de recuperação elevadas empregando acetonitrila na versão miniaturizada da extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura para determinar pesticidas em matrizes biológicas e, Mesquita *et al.* (2017), que utilizou acetonitrila na ESL-PBT para estudar diversos pesticidas em amostras de solo.

Tabela 3 - Recuperação do fluopiram nos testes de otimização em diferentes tipos de solo na concentração de $90 \mu\text{g kg}^{-1}$

Técnica	Fase extratora	Tipo de solo	Recuperação (%)	Desvio padrão relativo (%)
ESL-PBT tradicional	Acetonitrila	Arenoso	119	5
		Argiloso	106	2
		Textura média	118	2
ESL-PBT tradicional	Acetonitrila + Acetato de Etila	Arenoso	133	11
		Argiloso	121	3
		Textura média	131	5
ESL-PBT miniaturizada	Acetonitrila	Arenoso	94	3
		Argiloso	104	6
		Textura média	100	1
ESL-PBT miniaturizada	Acetonitrila + Acetato de Etila	Arenoso	107	5
		Argiloso	109	7
		Textura média	120	0

ESL-PBT = Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura.

Após evidenciar que a versão miniaturizada da ESL-PBT empregando acetonitrila gerou taxas de recuperação próximo a 100% e desvio padrão relativo inferiores a 6%, nós seguimos para a etapa de validação do método de extração.

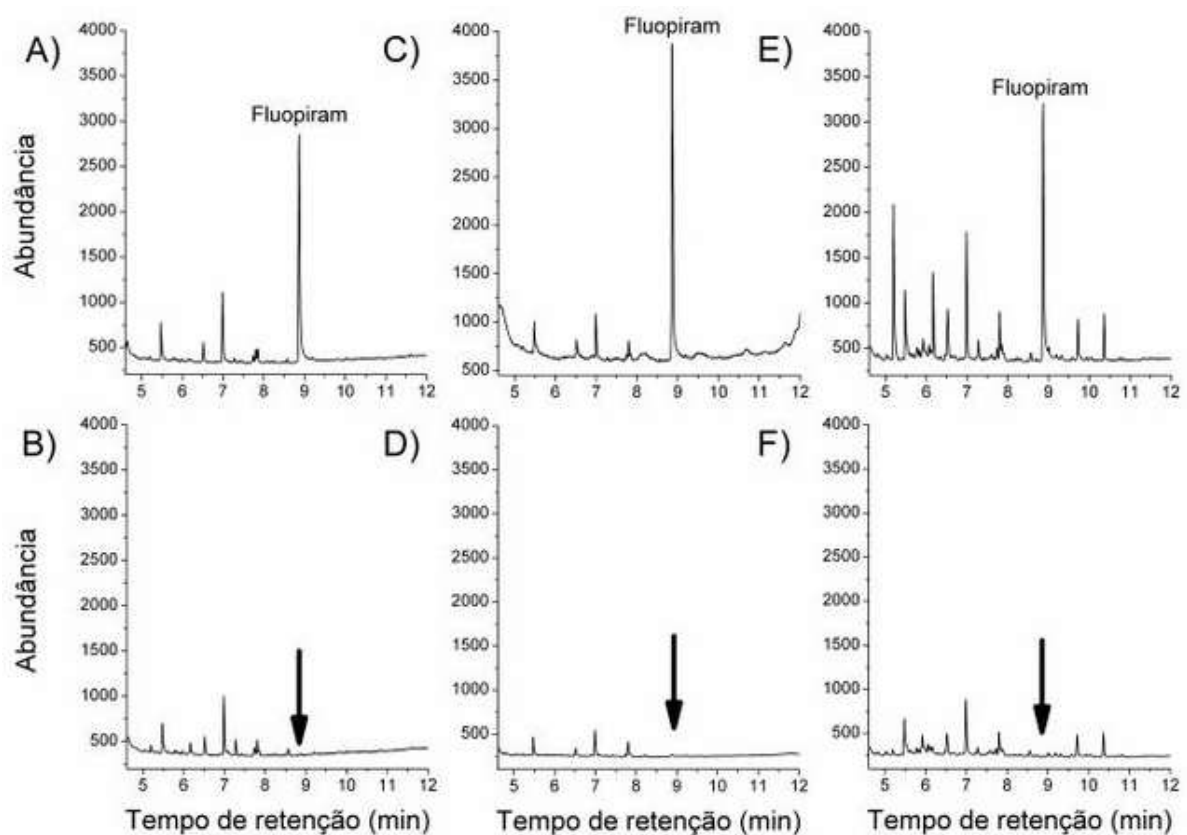
3.3 Validação

3.3.1 Seletividade

A seletividade foi estudada comparando cromatogramas de extratos da matriz livres do fluopiram (extrato branco) com os cromatogramas de extratos da matriz fortificados a $90 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para os três tipos de solos, o método foi considerado seletivo pois não houve picos de

interferentes da matriz no mesmo tempo de retenção do fluopiram, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Cromatogramas de extratos fortificados com fluopiram a $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ e de extratos branco. (A) Cromatograma do extrato de solo arenoso fortificado; (B) cromatograma do extrato branco do solo arenoso; (C) cromatograma do extrato de solo argiloso fortificado; (D) cromatograma do extrato branco do solo argiloso; (E) cromatograma do extrato de solo de textura média fortificado; (F) cromatograma do extrato branco do solo de textura média.



3.3.2 Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram considerados como a menor concentração que gerasse um sinal com área que correspondia a três e dez vezes a área do sinal do ruído no tempo de retenção do fluopiram, respectivamente. Neste estudo atingiu-se o LD de $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para os três solos e o LQ de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o solo arenoso e de $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ para os solos argiloso e de textura média. Os valores de LD e LQ encontrados são inferiores ao de outros estudos já publicados como os de Mahdavi *et al.* (2021), Dong e Hu (2014) e Katna

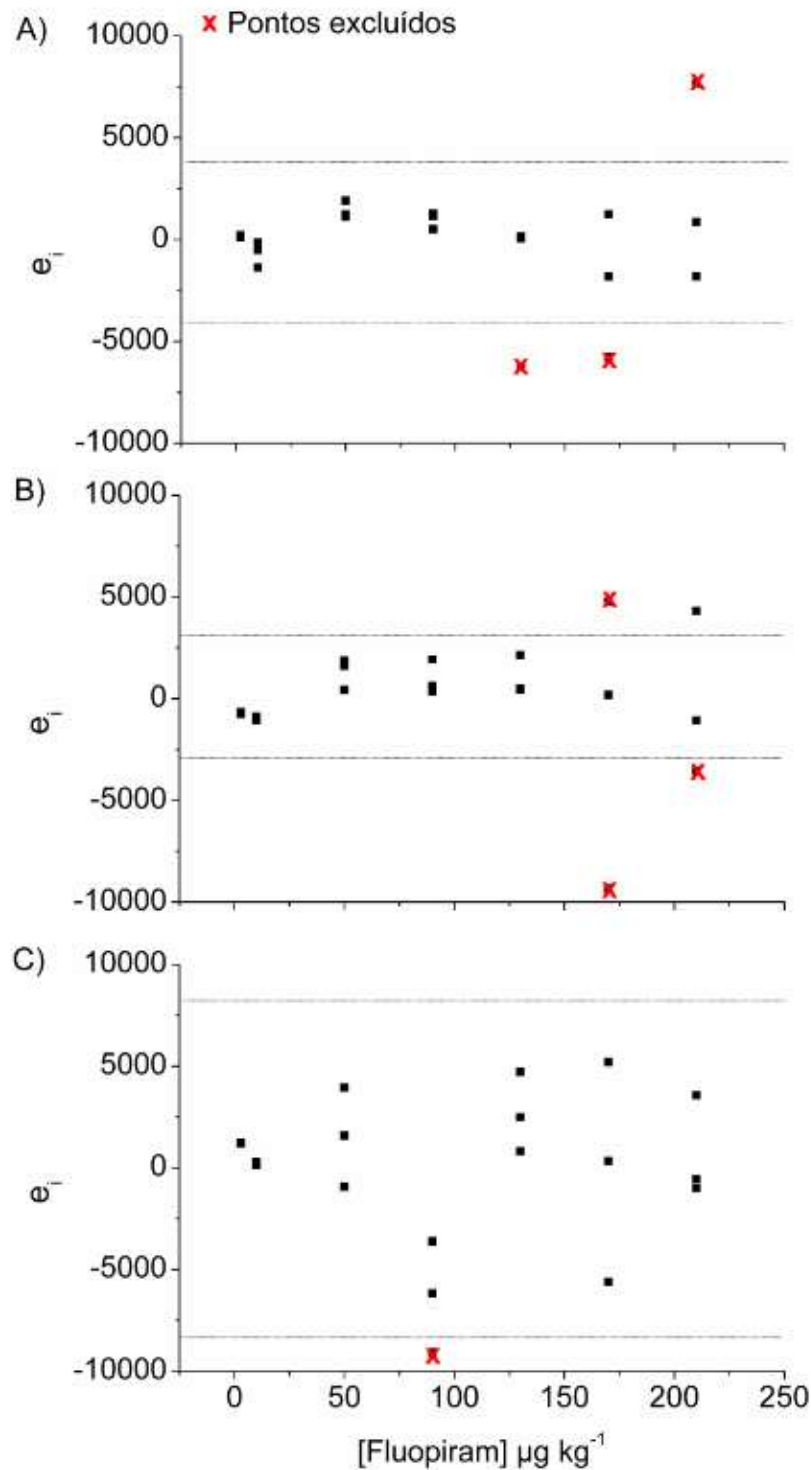
et al. (2018) que encontraram respectivamente 8,3; 10 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ como limite de quantificação. No Brasil ainda não existe legislação que determine o limite máximo de resíduo do fluopiram em solo, mas os resultados obtidos revelaram que os valores de LD e LQ foram inferiores aos limites máximos de resíduos estabelecido para agrotóxicos pela União Europeia para diversos alimentos de origem vegetal, como por exemplo banana, maçã e melancia com limites de resíduos de 800; 600 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (EFSA, 2019).

3.3.3 Linearidade

A curva de linearidade foi preparada em extratos da matriz fortificados com fluopiram em triplicata em concentrações que variavam de 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o solo arenoso e de 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os solos argiloso e de textura média. Os parâmetros estatísticos da regressão linear foram realizados pelo método dos mínimos quadrados ordinários seguindo procedimentos descritos por Souza e Junqueira (2005).

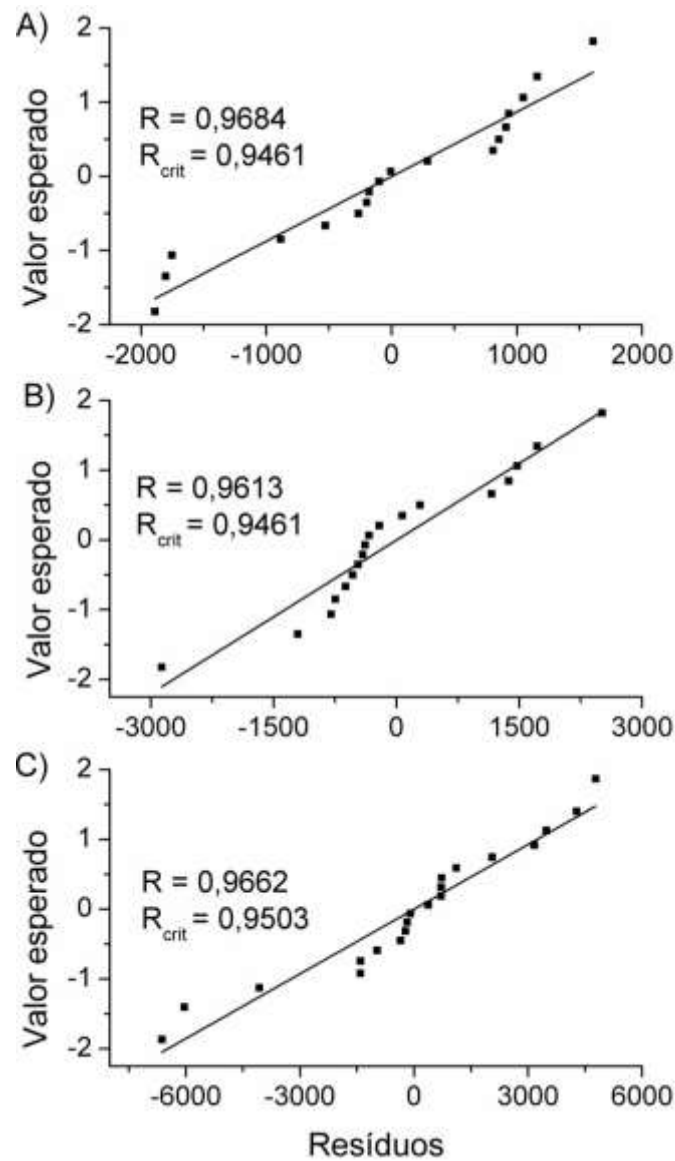
Pelo teste de Jackknife foram identificados e excluídos os *outliers* (valores críticos) como apresentado na Figura 4. No solo arenoso excluiu-se três valores críticos para que os dados atendessem aos critérios estatísticos. No solo argiloso três valores críticos foram excluídos para que se atendessem aos critérios estatísticos. Já no solo de textura média somente um valor foi excluído.

Figura 4 - Gráficos do teste de Jackknife para exclusão de valores críticos. (A) Solo arenoso; (B) Solo argiloso; (C) Solo de textura média; e_i = resíduo da regressão.



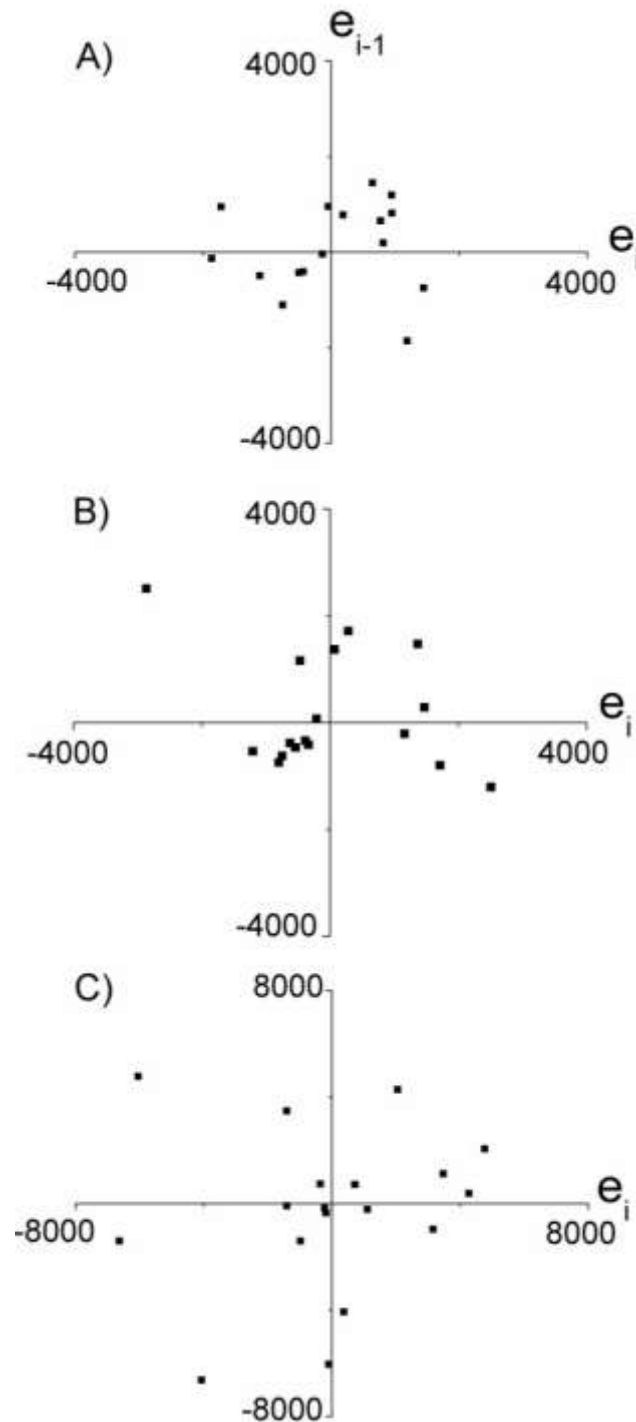
A normalidade dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Ryan Joiner. Os resíduos da regressão nos três solos seguiram a normalidade a 5% de significância como mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Gráfico de normalidade dos resíduos da regressão linear. (A) Solo arenoso; (B) Solo argiloso; (C) Solo de textura média.



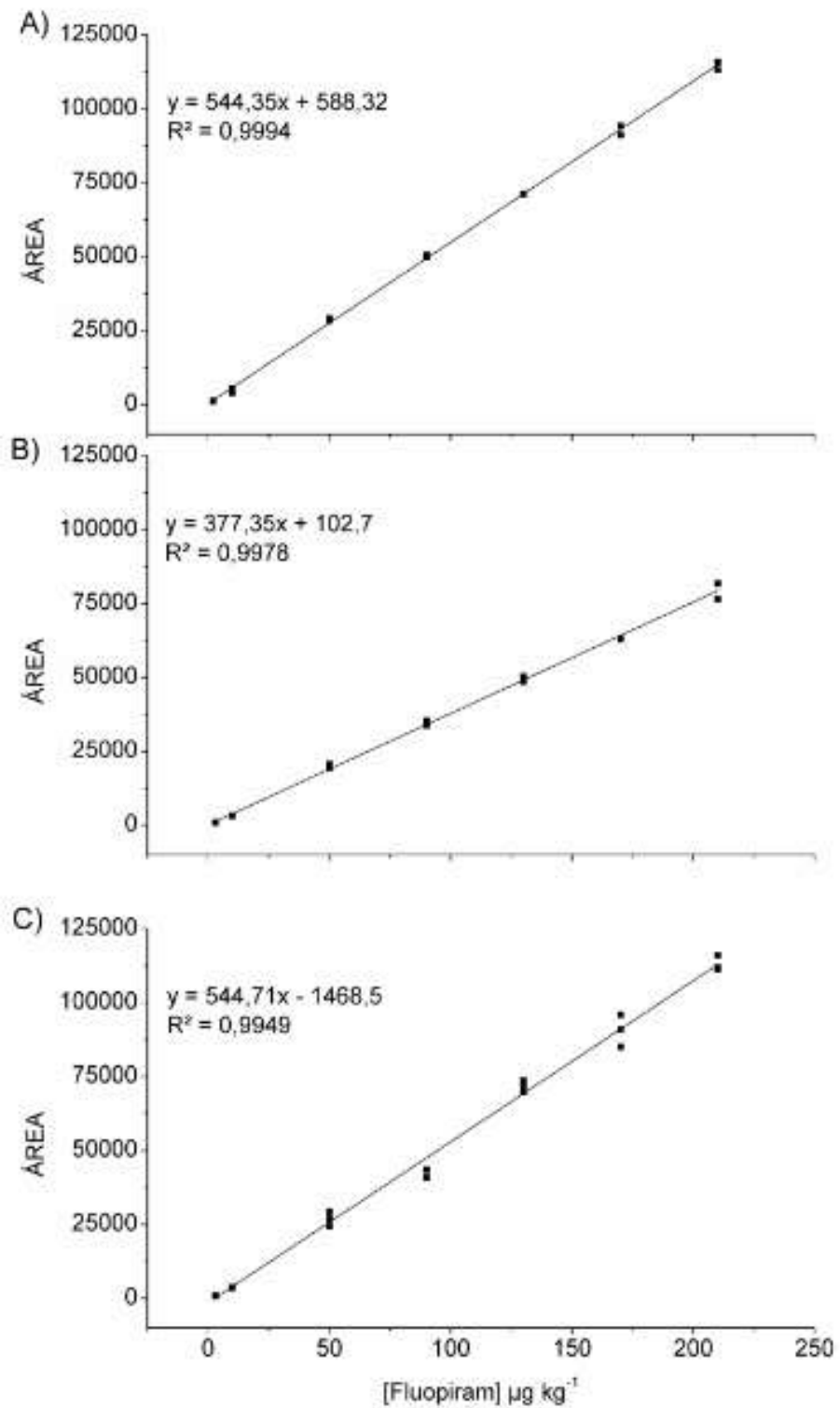
O teste de Brown e Forsythe confirmou a homoscedasticidade e a distribuição homogênea dos resíduos da regressão. A independência dos resíduos foi estudada pelo teste de Durbin e Watson. Para o nível de 5% de significância o teste apontou que não há autocorrelação dos resíduos e estes estão distribuídos aleatoriamente nos quatro quadrantes como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Gráficos de independência dos resíduos de regressão pelo teste de Durbin e Watson. (A) Solo argiloso; (B) Solo arenoso; (C) Solo de textura média.



A análise de variância (ANOVA) indicou que a regressão é significativa e que não há desvio de linearidade para o nível de significância de 5% para os três tipos de solo. Portanto o método proposto foi considerado linear. A Figura 7 apresenta os gráficos das curvas de linearidade para os três tipos de solo.

Figura 7 - Gráficos de regressão linear para os três tipos de solo. (A) Solo arenoso; (B) Solo argiloso; (C) Solo de textura média.



3.3.4 Exatidão e precisão

A exatidão foi estudada com testes de recuperação em triplicata nas concentrações de 2; 90 e 170 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o solo arenoso e 3; 90 e 170 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os solos argiloso e textura média. A precisão foi estudada com testes de recuperação com sete repetições na concentração de 90 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Porcentagem de recuperação e desvio padrão relativo dos ensaios de exatidão e precisão

Amostra	Recuperação (%)			
	2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ *	3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ *	90 $\mu\text{g kg}^{-1}$ **	170 $\mu\text{g kg}^{-1}$ *
Solo arenoso	89,0 \pm 12,0	-	93,0 \pm 15,0	111,0 \pm 4,0
Solo argiloso	-	96,0 \pm 8,0	86,0 \pm 13,0	109,0 \pm 8,0
Solo de textura média	-	88,0 \pm 8,0	106,0 \pm 10,0	114,0 \pm 10,0

*Experimento realizado com três repetições; **Experimento realizado com sete repetições.

O método foi considerado exato por apresentar recuperações médias dentro da faixa de 70 a 120% e, preciso por apresentar desvio padrão relativo inferior a 20% assim como recomendado por SANTE (2021).

3.3.5 Efeito de matriz

O efeito de matriz foi estudado com as curvas de calibração preparadas em extratos da matriz fortificados com fluopiram e soluções padrão preparadas em solvente, nas mesmas concentrações, como apresentado anteriormente. A Tabela 5 apresenta os coeficientes angulares das curvas de calibração preparadas em solvente e em extratos dos três solos e o efeito de matriz calculado.

Tabela 5 - Efeito de matriz nos diferentes solos

Amostra	Coefficiente angular na curva em solvente	Coefficiente angular na curva em extrato da matriz	Efeito de matriz (%)
Solo arenoso	550,70	545,91	99,13
Solo argiloso	548,40	377,35	68,81
Solo de textura média	548,40	544,70	99,33

Nos solos arenoso e de textura média a redução na resposta analítica causada pelo efeito de matriz foi inferior a 1% (99,13 e 99,33%) o que significa que a matriz não apresentou uma interferência significativa na resposta analítica do método proposto. Já no solo argiloso, o efeito de matriz gerou supressão de 31% na resposta analítica. Isso pode ter acontecido pelo fato de o solo argiloso ter maior teor de matéria orgânica, como apresentado na Tabela 2. Estudo de Sousa *et al.* (2012), que avaliou o efeito de matriz de 11 pesticidas em solo, mostrou que a matéria orgânica do solo possui moléculas de alta massa molecular que podem formar sítios ativos no *liner* de injeção no qual os analitos podem se ligar e gerar uma supressão da resposta analítica.

3.3.6 Aplicação em amostra real

Na aplicação em amostra real foram analisadas 30 amostras de solos de cafezais da região Sul do Estado de Minas Gerais, entretanto em nenhuma destas amostras foi detectado traços do fluopiram. Este resultado, pode estar associado à sua recente aprovação no país e ainda não ter sido aplicado nas culturas ou ele pode ter sido usado, mas foi degradado em condições ambientais assim como ocorreu nos estudos de Mohapatra *et al.* (2018) e Matadha *et al.* (2021).

3.3.7 Comparação com outras metodologias

A Tabela 6 apresenta um comparativo entre os resultados deste estudo com outros trabalhos já publicados.

Tabela 6 - Comparativo de resultados deste estudo e outros resultados da literatura para determinação de fluopiram em amostras de solo

Método	Técnica de análise	Volume de solvente orgânico	Clean up	Porcentagem de recuperação	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referência
ESL-PBT miniaturizada	CG-EM	2 mL	-	86,0 – 114,0%	2 e 3	Este estudo
QuEChERS	LC-MS/MS	20 mL	C18	80,6 – 93,5%	8,3	Mahdavi <i>et al.</i> (2021)
QuEChERS	CG-EM	10 mL	PSA	88,6 – 98,0%	10	Dong e Hu (2014)
QuEChERS	CG-EM	20 mL	PSA	73,6 – 103,6%	10	Mohapatra <i>et al.</i> (2018)
QuEChERS	LC-MS/MS	20 mL	PSA	86,6 – 92,7%	50	Chawla <i>et al.</i> (2018)
QuEChERS	CG-EM	20 mL	PSA	96,0 – 107,0%	50	Katna <i>et al.</i> (2018)

QuEChERS = *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*; ESL-PBT = Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura; LC-MS/MS = Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em Tandem; CG-EM = Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; C18 = octadecilano; PSA = Amina primária secundária; LQ = Limite de quantificação.

Como pode ser observado na Tabela 6, a versão miniaturizada da ESL-PBT otimizada e validada para amostras de solo apresentou menor consumo de solvente para extração, não foi necessário o uso de sorventes para *clean up* e atingiu limites de quantificação 25 vezes menor em relação aos trabalhos já publicados na literatura. Por isso, o método otimizado e validado neste trabalho se mostrou de fácil execução, com poucas etapas, eficiente e sensível.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi otimizado e validado uma versão miniaturizada da ESL-PBT seguida pela análise por CG-EM no MIS, para determinação do fluopiram em três tipos de solos. Além do uso reduzido de solvente e de amostra, este método de extração se apresentou rápido, fácil de executar e sensível. A ESL-PBT na versão miniaturizada apresentou taxas de recuperações elevadas e reduzido desvio padrão relativo, revelando ser eficiente e confiável. O valor de LQ atingido neste estudo foi inferior ao dos artigos já publicados e o da Legislação Europeia. Por tudo isso, a versão miniaturizada da ESL-PBT é uma alternativa adequada para o monitoramento do fluopiram em diferentes tipos de solos.

REFERÊNCIAS

- AMBROSIO, Isabela S.; OTAVIANO, Cinthia M.; CASTILHO, Lais M.B.; SANTOS, Allyson L.R.; MENDONÇA, Juliana S.; FARIA, Anizio M. Development and validation of a solid–liquid extraction with low-temperature partitioning method for the determination of fipronil in turtle eggshell. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 178, p. 107393, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2022.107393>.
- BRASIL. Ato nº 62, de 13 de setembro de 2019. Brasília: **DOU Diário Oficial da União**. Publicado no D.O.U de 13 de setembro de 2019. Disponível em: https://sistemasweb.agricultura.gov.br/conjurnormas/index.php/ATO_N%C2%BA_62,_DE_13_DE_SETEMBRO_DE_2019. Acesso em 28 nov. 2022.
- CHAMKASEM, Narong; HARMON, Tiffany. Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 408, n. 18, p. 4995-5004, 5 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9597-6>.
- CHAWLA, Suchi; PATEL, Dilip J.; PATEL, Sunny H.; KALASARIYA, Ravi L.; SHAH, Paresh G. Behaviour and risk assessment of fluopyram and its metabolite in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and in soil. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 25, n. 12, p. 11626-11634, 10 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-1439-y>.
- COELHO, M. R.; FIDALGO, E. C. C.; SANTOS, H. G. dos; BREFIN, M. de L. M. S.; PEREZ, D. V. Solos: tipos, suas funções no ambiente, como se formam e sua relação com o crescimento das plantas. In: **Embrapa Solos-Artigo em anais de congresso (ALICE)**.
- MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STUMER, S. L. O ecossistema o solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. Lavras, MG: UFLA, 2013., 2013. Disponível em: <https://www.bibliotecaagptea.org.br/agricultura/solos/livros/SOLOS%20CRESCIMENTOS%20DE%20PLANTAS.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2022.
- DA SILVA, Marcos R. F.; DE QUEIROZ, Maria E. L. R.; NEVES, Antônio A.; DA SILVA, Antônio A.; DE OLIVEIRA, André F. ; OLIVEIRA, Renan L. de ; AZEVEDO, Mariane M. ; PEREIRA, Gustavo A. M. Effect of the Incorporation of Sugarcane Bagasse Biochar in Leaching and Bioavailability of Clomazone in Soil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 2386-2394, jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190149>
- DE ÁVILA, Mariane B. R.; FARONI, Lêda R. A.; HELENO, Fernanda F.; DE QUEIROZ, Maria Eliana L. R.; ALMEIDA, Rodrigo I.A. Simple and Efficient Optimized Solid-Liquid Extraction with Low Temperature Partition Procedure for Dissipation and Translocation Study of Pesticide Residues in Rice Grains. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 1991-1999, oct. 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200099>.
- PINHO, Gevany Paulino de; NEVES, Antônio Augusto; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes

Ribeiro de; SILVÉRIO, Flaviano Oliveira. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, [S.L.], v. 21, n. 10, p. 1307-1311, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.03.006>.

SOUZA, Scheilla V.C. de; JUNQUEIRA, Roberto G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 552, n. 1-2, p. 25-35, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.043>.

DONG, Bizhang; HU, Jiye. Dissipation and residue determination of fluopyram and tebuconazole residues in watermelon and soil by GC-MS. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 94, n. 5, p. 493-505, 30 jan. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2013.841152>.

DOS SANTOS, H. G. et al. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5ª edição, Brasília, DF: Embrapa, 2018.

DJUROVIC, Rada; GAJIC-UMILJENDIC, Jelena; DJORDJEVIC, Tijana. Effects of organic matter and clay content in soil on pesticide adsorption processes. **Pesticidi I Fitomedicina**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 51-57, 2009. National Library of Serbia. <http://dx.doi.org/10.2298/pif0901051d>.

EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on pesticide analytical methods for risk assessment and post-approval control and monitoring purposes**.

SANTE/2020/12830-rev. 1, p. 1-50, 24 February 2021. Disponível em:

https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-02/pesticides_mrl_guidelines_2020-12830.pdf. Acesso em 25 nov. 2022.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) et al. Review of the existing maximum residue levels for fluopyram according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. **EFSA Journal**, v. 18, n. 4, p. 1-125, 2020. Disponível em:

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6059>. Acesso em 23 nov. 2022.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluopyram. **EFSA Journal**, v. 11, n. 4, p. 1-76, 2013. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3052>.

GUERRA, A. J. T.; JORGE, M. C. O. **Degradação dos solos no Brasil**. Editora Bertrand Brasil, 1ª edição, 320 p., 2018.

HELENO, Fernanda F.; RODRIGUES, Alessandra A.Z.; QUEIROZ, Maria E.L.R.; NEVES, Antônio A.; OLIVEIRA, André F.; LIBARDI, Vitor M. Determination of fungicides in bell pepper using solid-liquid extraction with low temperature partitioning. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 148, p. 79-84, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.045>.

JUNIOR, Lucas H. B.; DA SILVA, Elisa M. G.; DE AGUIAR, Adalin C. M.; SOUZA, Paulo S. R.; DE PAULA, Dilma F.; DA SILVA Antônio A. Sulfentrazone mobility in columns filled with ultisol and oxisol horizons. **Environmental Earth Sciences**, v. 81, n. 3, p. 1-24, 2 fev. 2022. <https://doi.org/10.1007/s12665-021-10165-z>

KATNA, Sapna; DUBEY, Jatiender Kumar; PATYAL, Surender Kumar; DEVI, Nisha; CHAUHAN, Avinash; SHARMA, Ajay. Residue dynamics and risk assessment of Luna Experience® (fluopyram + tebuconazole) and chlorpyrifos on French beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 25, n. 27, p. 27594-27605, 27 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-2733-4>.

KLEIN, Claudia; KLEIN, Vilson Antonio. ESTRATÉGIAS PARA POTENCIALIZAR A RETENÇÃO E DISPONIBILIDADE DE ÁGUA NO SOLO. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, [S.L.], p. 21-29, 27 jul. 2015. Universidad Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/2236117014990>.

LABOURDETTE, G.; LACHAISE, H.; RIECK, H.; STEIGER, D. **Fluopyram: efficacy and beyond on problematic diseases. In: Modern fungicides and antifungal compounds VI. 16th International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany, April 25-29, 2010.** Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft eV Selbstverlag, 2011. p. 75-80. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153047741>. Acesso em: 09 nov. 2022

LEPSCH, I. F. **19 lições de pedologia**. 2ª edição. São Paulo: Oficina de textos, 2011.

LOPES, Carla Vanessa Alves; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, [S.L.], v. 42, n. 117, p. 518-534, jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-1104201811714>.

MAHDAVI, Vahideh; BEHBAHAN, Arnavaz Keikavousi; MORADI, Fatemeh; ABOUL-ENEIN, Hassan Y. Analysis of Alternative New Pesticide (Fluopyram, Flupyradifurone, and Indaziflam) Residues in Pistachio, Date, and Soil by Liquid Chromatography Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 373-383, 6 jan. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15320383.2020.1854173>.

MATADHA, Nagapooja Yogendraiah; MOHAPATRA, Soudamini; SIDDAMALLAIAH, Lekha; UDUPI, Veena Rao; GADIGEPPA, Shambulinga; RAJA, Danish Poothotathil; DONAGAR, Shruti Prakash; HEBBAR, Shibara Shankara. Persistence and dissipation of fluopyram and tebuconazole on bell pepper and soil under different environmental conditions. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], p. 1-20, 9 jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2019.1704745>.

MATADHA, Nagapooja Yogendraiah; MOHAPATRA, Soudamini; SIDDAMALLAIAH, Lekha. Distribution of fluopyram and tebuconazole in pomegranate tissues and their risk assessment. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 358, p. 129909, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129909>.

MESQUITA, Tayane C. R.; SANTOS, Rizia R.; CACIQUE, Ane P.; SÁ, Ludimara J. de; SILVÉRIO, Flaviano O.; PINHO, Gevany P. Easy and fast extraction methods to determine organochlorine pesticides in sewage sludge, soil, and water samples based at low temperature. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [S.L.], v. 53, n. 3, p. 199-206, 7 dez. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2017.1405626>.

MIRANDA, A. A. C.; MELO, L. F.; ARAÚJO, A. E. Impactos dos agrotóxicos na saúde do solo e humana: uma revisão. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS COINTER–PDVAGRO**. 2017.

MOHAPATRA, Soudamini; SIDDAMALLAIAH, Lekha; BUDDIDATHI, Radhika; MATADHA, Nagapooja Yogendraiah. Dissipation kinetics and risk assessment of fluopyram and tebuconazole in mango (*Mangifera indica*). **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 98, n. 3, p. 229-246, 19 fev. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2018.1445244>.

OLIVEIRA, J. L. et al. Usos, efeitos e potencial tóxico dos agrotóxicos na qualidade do solo. **Agrarian Academy**, v. 5, n. 09, p. 454-457, 2018. http://dx.doi.org/10.18677/Agrarian_Academy_2018a45.

PATEL, Badal V.; CHAWLA, Suchi; GOR, Hetal; UPADHYAY, Payal; PARMAR, Kaushik D.; PATEL, Anil R.; SHAH, Paresh G. Residue decline and risk assessment of fluopyram + tebuconazole (400SC) in/on onion (*Allium cepa*). **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 23, n. 20, p. 20871-20881, 3 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7331-8>.

PEREIRA, Najara G. F.; SILVÉRIO, Flaviano O.; PINHO, Gevany P. Optimisation, validation and application of the solid-liquid extraction with low-temperature purification followed by gas chromatography-mass spectrometry for determination of phthalates in sewage sludge. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 100, n. 9, p. 968-980, 29 jul. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2019.1646735>.

PODBIELSKA, M.; SZPYRKA, E.; PIECHOWICZ, B.; ZWOLAK, A.; SADŁO, S. Behavior of fluopyram and tebuconazole and some selected pesticides in ripe apples and consumer exposure assessment in the applied crop protection framework. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 350, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6057-5>.

REICHERT, J. M.; DE AZEVEDO, Antonio C.; REINERT, Dalvan J.; DOS SANTOS, Danilo R.; PEDRON, Fabrício de A.; DALMOLIN, Ricardo S. D. Fundamentos da ciência do solo. **Universidade Federal de Santa Maria**, 169 p. 2007.

RODRIGUES, Alessandra Aparecida Zinato; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de; FARONI, Lêda Rita D'Antonino; PRATES, Lucas Henrique Figueiredo; NEVES, Antônio Augusto; OLIVEIRA, André Fernando de; FREITAS, Jéssika Faêda de; HELENO, Fernanda Fernandes; ZAMBOLIM, Laércio. The efficacy of washing strategies in the elimination of fungicide residues and the alterations on the quality of bell peppers. **Food Research International**, [S.L.], v. 147, p. 110579, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110579>.

RODRIGUES, G. S. Agrotóxicos e contaminação ambiental no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente**, 2003.

RODRIGUES, Rogério P.; FARIAS, Waldiclécio R.; GOULART, Simone M.; GOULART, Adilson C.; SANTOS, João Paulo V.; DE QUEIROZ, Maria Eliana L. R. Optimization of

solid-liquid extraction with low temperature partition for determination of carbofuran in cucurbita pepo l (“zucchini”) by high performance liquid chromatography. **Química Nova**, v. 41, p. 213-218, fev. 2018. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170141>.

SANTANA, Escarlet T. D.; SOARES, Dayane F.; FARIA, Anizio M. Development of a Methodology for the Determination of Pesticide Residues in Cajá-Manga Pulp (*Spondias dulcis*L.) Using Solid-Liquid Extraction with Low-Temperature Partitioning. **Journal of Chemistry**, [S.L.], v. 2018, p. 1-10, 1 nov. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/6012503>.

SILVA, Mellissa Ananias Soler da; MAFRA, Álvaro Luiz; ALBUQUERQUE, Jackson Adriano; BAYER, Cimélio; MIELNICZUK, João. Atributos físicos do solo relacionados ao armazenamento de água em um Argissolo Vermelho sob diferentes sistemas de preparo. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 544-552, jun. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782005000300009>.

SILVA, Thaís Lindenberg R.; DE QUEIROZ, Maria Eliana L. R.; NEVES, Antônio A.; VIEIRA, Patrícia Aparecida F.; DE OLIVEIRA, André F.; OLIVEIRA, Maria Goreti de A. Miniaturized liquid-liquid extraction with low-temperature partitioning technique (LLE/LTP) for pesticide analysis in a biological matrix by gas chromatography. **Química Nova**, v. 44, p. 804-808, 2021. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170738>.

SOUZA, Lauana Pellanda; FARONI, Lêda Rita D’antonino; HELENO, Fernanda Fernandes; PINTO, Frederico Garcia; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro; PRATES, Lucas Henrique Figueiredo. Difenconazole and linuron dissipation kinetics in carrots under open-field conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.L.], v. 168, p. 479-485, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.070>.

STORELLI, Alan; KEISER, Andreas; EDER, Reinhard; JENNI, Samuel; KIEWNICK, Sebastian. Evaluation of fluopyram for the control of *Ditylenchus dipsaci* in sugar beet. **Journal of Nematology**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 1-10, 1 jan. 2020. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.21307/jofnem-2020-071>.

VELOUKAS, Thomas; KARAOGLANIDIS, George S. Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity. **Pest Management Science**, [S.L.], v. 68, n. 6, p. 858-864, 19 jan. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3241>.

VITALE, A.; PANEBIANCO, A.; POLIZZI, G. Baseline sensitivity and efficacy of fluopyram against *Botrytis cinerea* from table grape in Italy. **Annals of Applied Biology**, [S.L.], v. 169, n. 1, p. 36-45, 26 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/aab.12277>.

WATSON, Tristan T.; NOLING, Joseph W.; DESAEGER, Johan A. Fluopyram as a rescue nematicide for managing sting nematode (*Belonolaimus longicaudatus*) on commercial strawberry in Florida. **Crop Protection**, [S.L.], v. 132, p. 105108, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105108>.

WEI, Peng; LIU, Yanan; LI, Wenzhuo; QIAN, Yuan; NIE, Yanxia; KIM, Dongyeop; WANG, Mengcen. Metabolic and Dynamic Profiling for Risk Assessment of Fluopyram, a Typical Phenylamide Fungicide Widely Applied in Vegetable Ecosystem. **Scientific Reports**,

v. 6, n. 33898, set. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep33898>.

ZHANG, Ying; XU, Jun; DONG, Fengshou; LIU, Xingang; WU, Xiaohu; ZHENG, Yongquan. Response of microbial community to a new fungicide fluopyram in the silty-loam agricultural soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.L.], v. 108, p. 273-280, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.018>.

ZHOU, J., LIANG, S., CUI, Y., RONG, Y., SONG, J., and LV, D. Study on environmental behaviour of fluopyram in different banana planting soil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 15346, jul. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91460-4>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de ELL-PBT e ESL-PBT miniaturizado foi utilizada pela primeira vez para a determinação de fluopiram em amostras de água e solo respectivamente. A ausência de uma etapa de limpeza, torna o método mais rápido e fácil de executar. Além disso, estes métodos são mais econômicos que os demais. Foi empregado o planejamento fatorial completo com dois níveis e três fatores para otimizar a ELL-PBT, esses planejamentos podem indicar tendências e direcionar a pesquisa, reduzindo o número de experimentos. Na ESL-PBT miniaturizado foi observado elevadas taxas de recuperação do analito, empregando menor quantidade de reagentes e amostra, além de manter a principal vantagem desse método que tem sido a extração e limpeza dos extratos em uma única etapa. As principais características apresentadas pelas duas metodologias otimizadas e validadas foram taxas de recuperação elevadas, precisão, exatidão, linearidade, seletividade e extratos limpos sem a necessidade da etapa de limpeza dos extratos. Foi possível estabelecer as condições ideais para quantificar o fluopiram nas amostras de água e solos arenosos, argilosos e com textura média. A validação das metodologias otimizadas permitiu certificar a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos neste estudo.