

## 5

### **Resultados: Determinação de azoxistrobina e dimoxistrobina por voltametria adsortiva de redissolução catódica em eletrodo de gota pendente de mercúrio e varredura no modo de onda quadrada.**

#### **5.1.**

##### **Estudos preliminares e otimização.**

Objetivando atingir condições analíticas que permitissem um máximo de sensibilidade para a determinação voltamétrica de azoxistrobina e dimoxistrobina utilizando o eletrodo de gota pendente de mercúrio, alguns estudos prévios foram realizados para se ter um maior conhecimento do comportamento eletroquímico destes compostos. Os estudos foram realizados individualmente para cada estrobilurina e depois uma na presença do outro, de forma a se avaliar possíveis interferências mútuas e ajustar condições para determinação seletiva.

##### **5.1.1.**

###### **Estudo do eletrólito suporte**

O eletrólito suporte é uma solução contendo grande quantidade de íons que podem ser provenientes da adição de um ácido forte, uma base forte, um sal ou um sistema tampão. A concentração dos íons no eletrólito suporte costuma ser tipicamente entre 10 a 100 vezes maior que as demais espécies de interesse presentes na célula eletroquímica. Outra característica do eletrólito suporte é que ele deve ser eletroinativo na faixa de potencial na qual se deseja trabalhar, não deve reagir com o analito ou nenhum de seus subprodutos, deve também possuir alta condutividade iônica, garantindo assim baixa resistência elétrica para a cela voltamétrica. A sua função principal é diminuir o transporte de massa causado pela migração. Como o eletrólito suporte está adicionado a uma concentração muito maior que o do analito, os íons irão formar camadas de carga oposta ao do eletrodo na interface com o mesmo. Isso causa diminuição da influência eletrostática pelos demais íons presentes na solução. No entanto, a presença de

camadas de espécies carregadas ao longo da superfície do eletrodo de trabalho formará uma corrente capacitiva. Esta corrente não é proporcional a concentração do analito e contribuirá como ruído na corrente final medida. Equipamentos modernos e técnicas de amostragem de sinal conseguem minimizar grande parte da contribuição da corrente capacitiva. Outra função do eletrólito suporte é manter a força iônica da solução constante, impedindo que a composição da interface entre a solução e o eletrodo mude significativamente com a corrente proveniente da reação. Como a composição desta região influi na corrente elétrica medida, se faz essencial sua manutenção durante todo o tempo de análise.

Esta etapa da otimização consistiu em se tentar obter sinal analítico da azoxistrobina e da dimoxistrobina em soluções contendo diferentes eletrólitos. As mesmas concentrações e mesmas condições instrumentais foram usadas de modo que os resultados obtidos para cada estrobilurina pudessem ser comparados. Como critério de escolha do eletrólito suporte foi o que gerasse maior área de pico, picos bem definidos e bem resolvidos e afastados das barreiras redox do solvente.

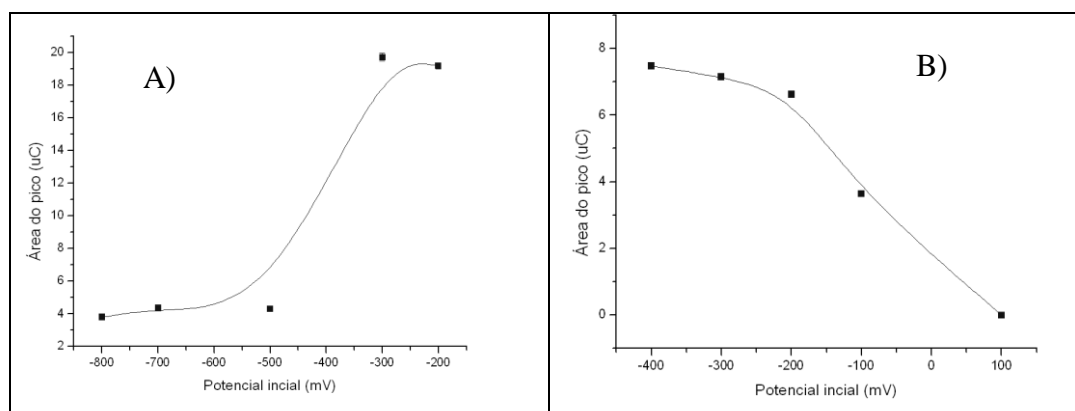
Foram testados os seguintes eletrólitos:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , tampão  $\text{NH}_3/\text{NH}_4$  pH 9, tampão acetato pH 4,5,  $\text{KCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , tampão Britton-Robinson (pH 2, 7 e 9). Apenas foi observado picos para os dois compostos nos ácidos e no tampão Britton-Robinson pH 2, sendo que os melhores resultados (segundo os critérios escolhidos) foram obtidos no  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Nesse eletrólito suporte, os sinais da azoxistrobina e dimoxistrobina (potencial de pico) ficaram em  $-862 \text{ mV}$  e  $-650 \text{ mV}$  respectivamente.

### **5.1.2. Estudo do potencial de deposição.**

As técnicas de redissolução possuem especial destaque dentro da voltametria, pois, de forma relativamente simples, proporcionam aumento da sensibilidade da técnica. A pré-concentração de espécies orgânicas é baseada na característica que alguns compostos possuem em adsorverem sobre a superfície do eletrodo. Esse aumento da quantidade de material na superfície do eletrodo gera, quando o potencial do mesmo eletrodo for varrido no sentido de interesse (catódico ou anódico), um aumento na corrente de difusão (faradaica), ou seja, um

aumento na sensibilidade da técnica (denominada agora de voltametria adsorviva de redissolução). Para se obter isso, basta a aplicação de um potencial adequado (por um determinado período de tempo). As condições experimentais da solução têm influência na capacidade de se obter adsorção do analito no eletrodo de tal modo que estas devem ser ajustadas para permitir tal adsorção.

Nos estudos preliminares foi observado que as duas estrobilurinas são passíveis de adsorver no eletrodo de trabalho sendo suscetíveis a serem determinadas por voltametria adsorviva de redissolução catódica, ou seja, consegue-se um aumento da sensibilidade da técnica quando se aplica um potencial anódico, e depois faz-se uma varredura no sentido catódico. Para se realizar este estudo, foi estipulado um tempo de deposição (30 s) em cela contendo HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte. Os limites catódicos dos experimentos foram os potenciais onde se iniciava o pico de redissolução de cada composto (o potencial do pico de redissolução para a dimoxistrobina é -630 mV e para a azoxistrobina em -930 mV). Os resultados destes estudos estão representados na Figura 37. Baseado nos resultados foi escolhido como potencial de deposição os valores de -300 mV para azoxistrobina e -400 mV para dimoxistrobina.

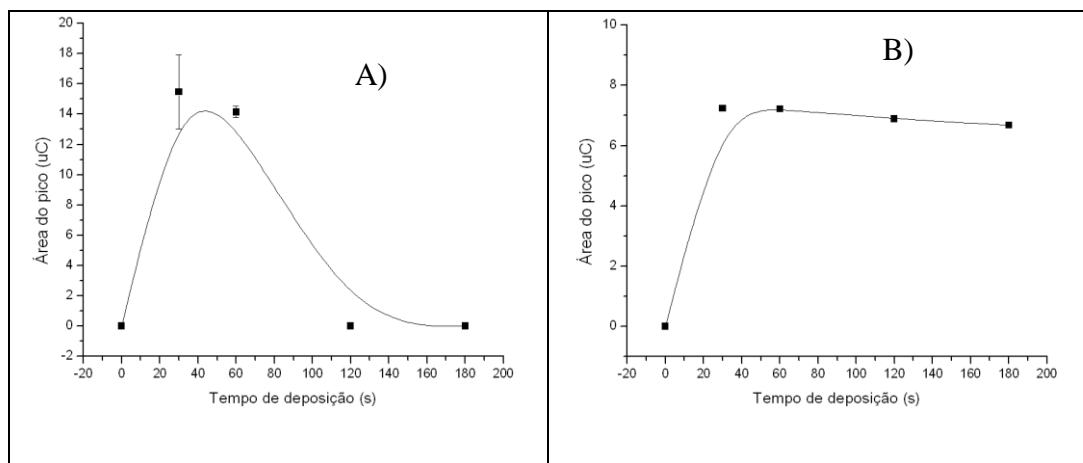


**Figura 37 – Influência do potencial de deposição para A) azoxistrobina e B) dimoxistrobina.**

### 5.1.3. Estudo do tempo de deposição.

Para completar a etapa de acumulação dos compostos na superfície do eletrodo de mercúrio, deve ser otimizado também o tempo que se aplica o potencial. Espécies que possuem alta tendência em se depositar no eletrodo (sem saturá-lo) podem ser pré-concentrados por 20 ou 30 minutos. No entanto, esta não é a situação comum e normalmente só se faz necessária a utilização de alguns minutos de aplicação de potencial. Após alguns minutos de tempo de deposição, em geral, não acarretam nenhum ganho em sinal. Em alguns casos, o sinal analítico até começa a diminuir, por causa da atração de outras espécies presentes na solução que irão competir com o analito pela superfície do eletrodo. Vale ressaltar também que tempos de deposição muito longos, mesmo tendo a vantagem do aumento da sensibilidade, podem diminuir a extensão da faixa de trabalho, sendo assim, é sempre necessário fazer uma avaliação crítica da característica mais importante.

Para realizar o estudo de tempo de deposição para cada um dos compostos, manteve-se constante a concentração de analito, e os potenciais iniciais (-300 mV para azoxistrobina e -400 mV para dimoxistrobina). Os resultados deste estudo estão representados na Figura 38.



**Figura 38 – Influência do tempo de deposição para A) azoxistrobina e B) dimoxistrobina.**

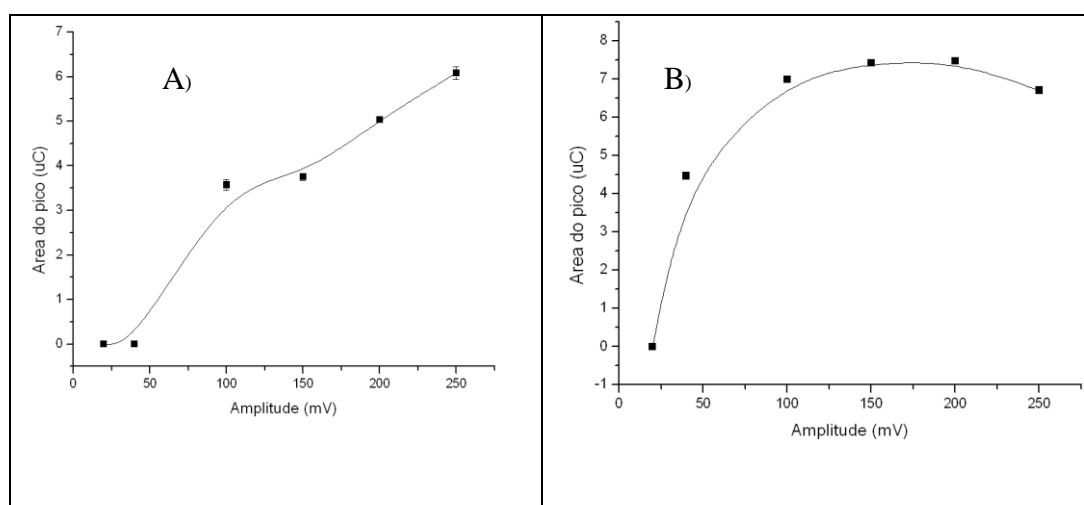
Na Figura 38, estão representadas justamente as duas situações discutidas anteriormente. Para o caso da azoxistrobina, foi obtido um aumento no sinal analítico até se atingir um pico de máximo de sinal entre 30 e 60 s, a partir do

qual, o sinal começou a diminuir. No caso da dimoxistrobina, observou-se um platô de sinal máximo se manteve na janela de tempo estudada. Por causa deste comportamento, o tempo de deposição de 30 s foi o escolhido .

#### 5.1.4. Estudo da amplitude

Quando se faz o estudo da influência da amplitude sobre o sinal analítico registrado na voltametria de onda quadrada, deve ser conseguido um compromisso entre a sensibilidade e a seletividade, isto por que normalmente um aumento da amplitude do potencial gera um aumento na sensibilidade da técnica, porém, em detrimento da seletividade <sup>78</sup>.

Nesse ponto, a realização do estudo da influência da amplitude só levou em conta a sensibilidade do sinal, pois a resposta analítica para cada composto estava sendo estudado independentemente um do outro. Assim o resultado da Figura 39 permitiu a escolha dos valores de amplitude de 250 mV para a azoxistrobina e 150 mV para a dimoxistrobina.



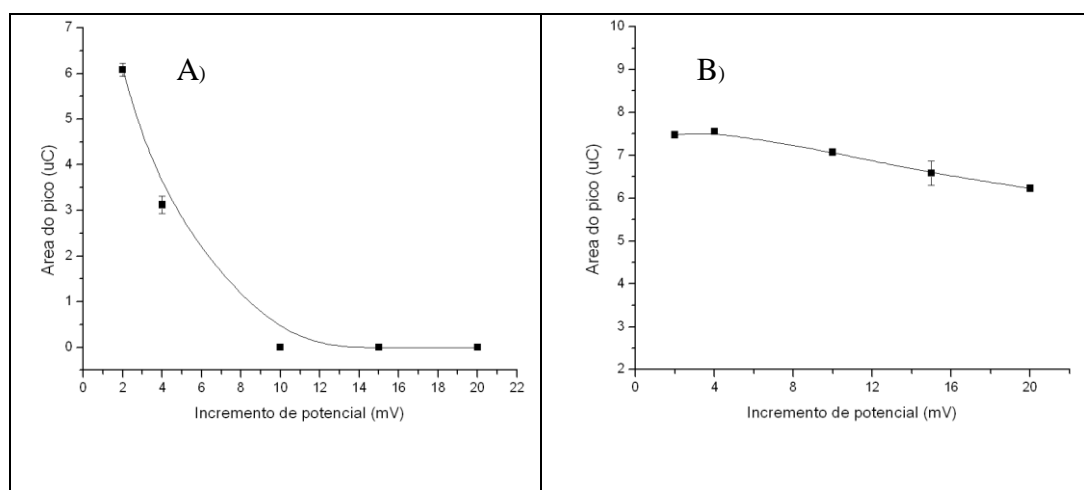
**Figura 39 – Influencia da amplitude do potencial sobre o sinal analítico da A) azoxistrobina e B) dimoxistrobina.**

#### 5.1.5. Estudo da velocidade de varredura.

Uma das grandes vantagens da técnica voltametria de onda quadrada sobre outras técnicas de pulso (como pulso diferencial) é que a sua forma de

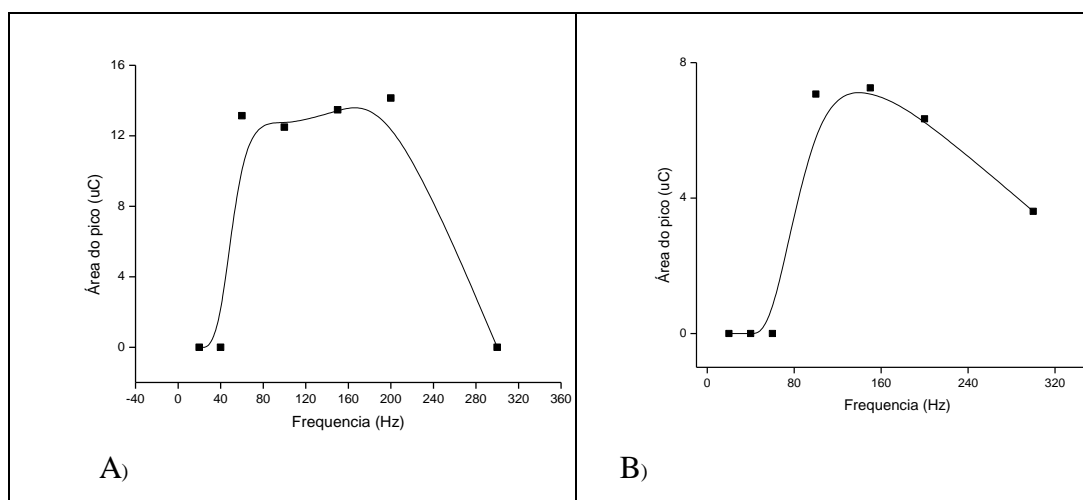
amostragem da corrente além de resultar em valores mais sensíveis (por fazer medição da corrente direta e reversa, minimizando a contribuição da corrente capacitiva, privilegiando a corrente faradaica) também permite a aplicação de maiores velocidades de análise. Enquanto que para as técnicas de pulso as velocidades máximas são  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , na voltametria de onda quadrada pode-se aplicar velocidades de até  $1 \text{ Vs}^{-1}$ . A velocidade de aplicação do pulso é controlada por dois parâmetros, a frequência (Hz) e o incremento de potencial (mV). O produto destas variáveis é a velocidade (em  $\text{mV s}^{-1}$ ).

Ao se observar a Figura 8, estes parâmetros podem ser melhores compreendidos, em especial na etapa 2, A frequência pode ser entendida como o inverso do dobro do parâmetro  $\tau$ , ou seja, base da rampa de potencial, enquanto que o incremento de potencial é a altura desta mesma rampa ( $\Delta E_s$ ). Estes valores costumam ser otimizados independentemente um do outro.



**Figura 40 – Influência do incremento de potencial sobre o sinal analítico para A) azoxistrobina e B) dimoxistrobina**

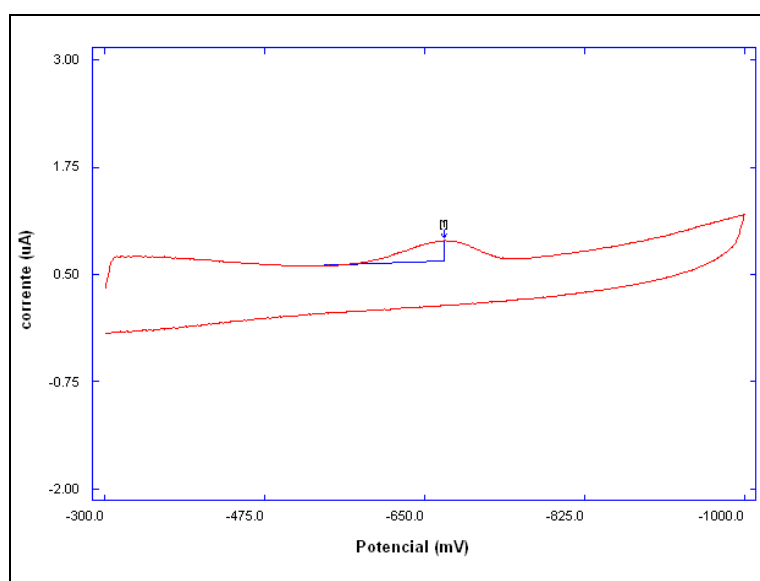
Tanto pelo critério da maior sensibilidade, quanto pela menor largura do pico (maior definição) os melhores valores de incremento de potencial foram 2 mV para azoxistrobina e 4 mV para dimoxistrobina, como pode ser observado pela Figura 40. Já o comportamento do sinal analítico (área do pico) em função da frequência de aplicação do pulso de potencial indicou uma faixa praticamente constante entre 60 a 200 Hz para azoxistrobina, enquanto que para a dimoxistrobina um máximo de sinal foi observado em 100 Hz (Figura 41).



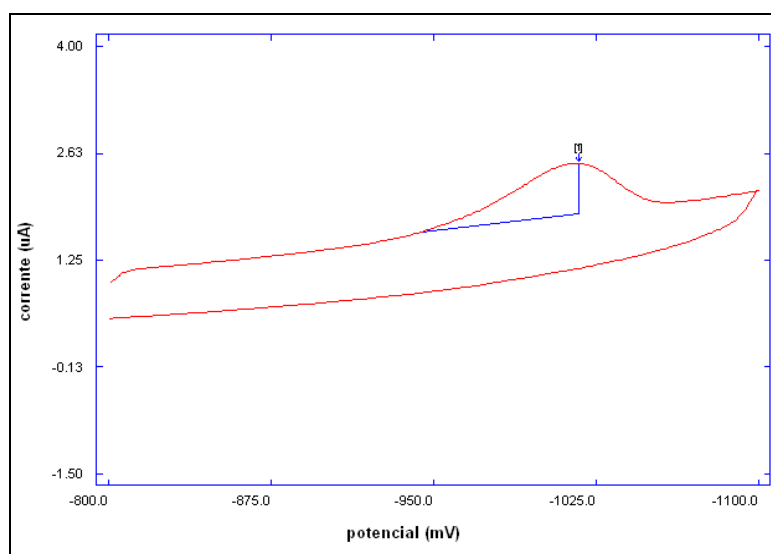
**Figura 41 – Influência da frequência de aplicação do potencial sobre o sinal analítico para A) azoxistrobina e B) dimoxistrobina**

## 5.2. Voltametria cíclica e mecanismo redox.

Os voltamogramas cíclicos para soluções de dimoxistrobina (Figura 42) e azoxistrobina (Figura 43) apresentaram apenas a presença de um pico no sentido catódico. A ausência de um pico de oxidação indica um comportamento irreversível ou quase-reversível para o sistema.

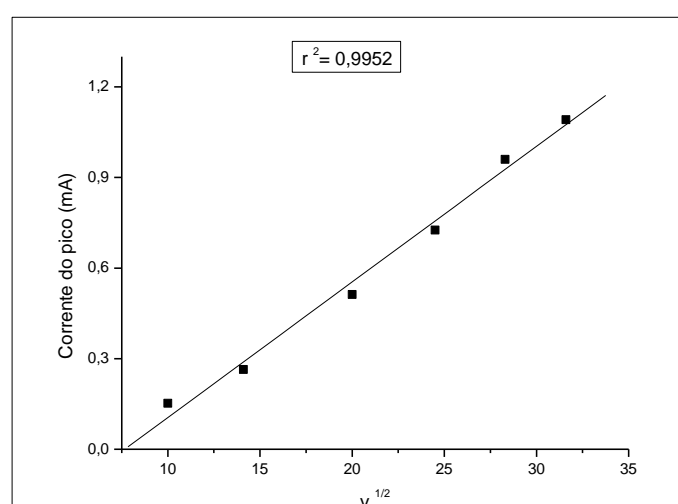


**Figura 42 – Voltamograma cíclico de uma solução  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L $^{-1}$  de dimoxistrobina, velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .**



**Figura 43 – Voltamograma cíclico de uma solução  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L $^{-1}$  de azoxistrobina, velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .**

No sentido de elucidar o mecanismo e verificar se o sistema era irreversível ou quase-reversível, foram registrados voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (entre  $100$  a  $1000 \text{ mVs}^{-1}$ ). Para sistemas irreversíveis, existe uma relação linear entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura, semelhante à relação encontrada para a dimoxistrobina (Figura 44).

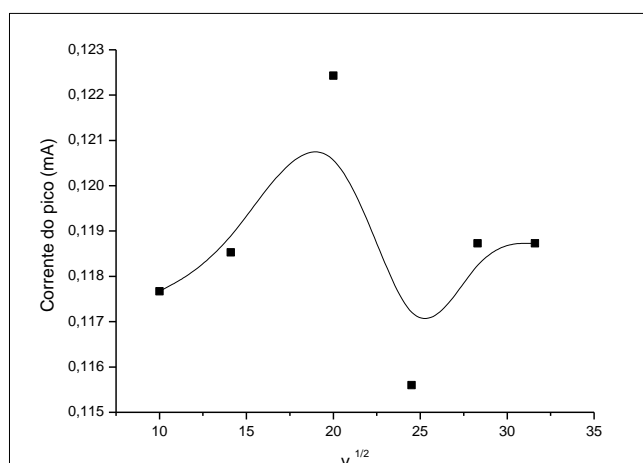


**Figura 44 - Relação entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura cíclica para a dimoxistrobina.**

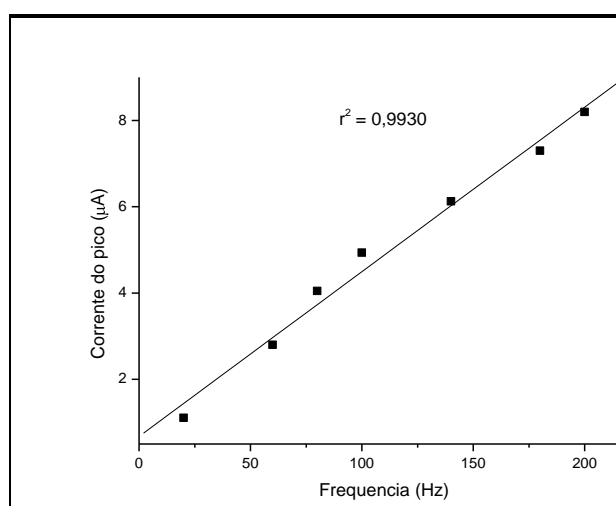


Nos sistemas quase-reversíveis, a relação entre o aumento da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade não é linear. Comportamento este identificado para a azoxistrobina (Figura 45).

O estudo da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais também apresenta algumas informações sobre o mecanismo redox<sup>79</sup>. Um sistema totalmente irreversível apresenta uma relação linear entre a frequência de aplicação de pulsos potenciais e a corrente do pico, como a que pode ser observada na Figura 46 para a dimoxistrobina.

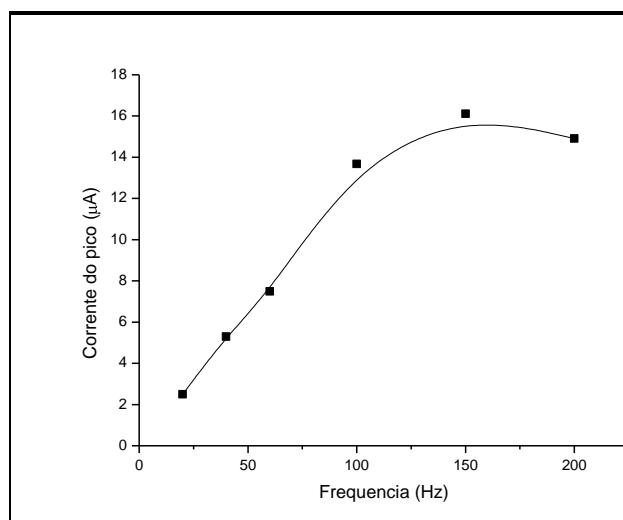


**Figura 45 - Relação entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura cíclica para a azoxistrobina**



**Figura 46 – Relação entre a corrente de pico e a frequência de aplicação de potencial para a dimoxistrobina.**

Já em um composto que apresenta um comportamento quase-reversível, não existe uma relação linear entre a corrente de pico e a frequência de aplicação do potencial, como o comportamento apresentado pela azoxistrobina (Figura 47).



**Figura 47 – Relação entre a corrente de pico e a frequência de aplicação de potencial para a azoxistrobina.**

Em sistemas irreversíveis, a largura de pico a meia altura ( $\Delta E_{p/2}$ ) é descrita pela seguinte equação:

$$\Delta E_{p/2} = \frac{(63,5 \pm 0,5)}{\alpha n} \quad (\text{Equação 15})$$

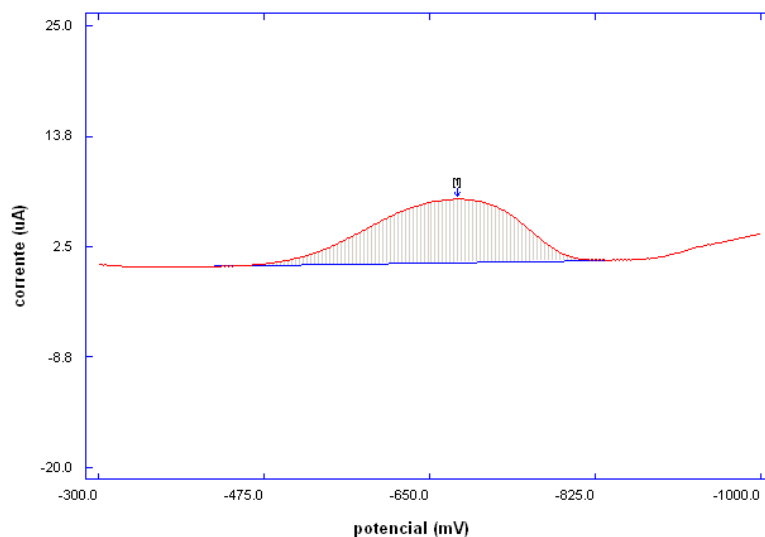
Sendo  $n$  o número de elétrons envolvidos no processo redox e  $\alpha$  o coeficiente de transferência eletrônico. De modo que para sistemas no qual o valor de  $\alpha$  for igual a 0,5 o valor de  $\Delta E_{p/2}$  é igual a  $127/n$ . Além disso, um valor de  $\Delta E_{p/2}$  maior que 20 mV sugere adsorção de reagente e  $\Delta E_{p/2}$  maior que 40 mV sugere adsorção de reagente e produto.

A Figura 48 apresenta um voltamograma de onda quadrada para uma solução de dimoxistrobina, por ela pode se calcular o valor da largura a meia altura do pico (162 mV), valor que indica ocorrência de adsorção do reagente e do produto. Além disso, esse  $\Delta E_{p/2}$  sugere uma reação envolvendo 1 elétron, com  $\alpha$  igual a 0,5.

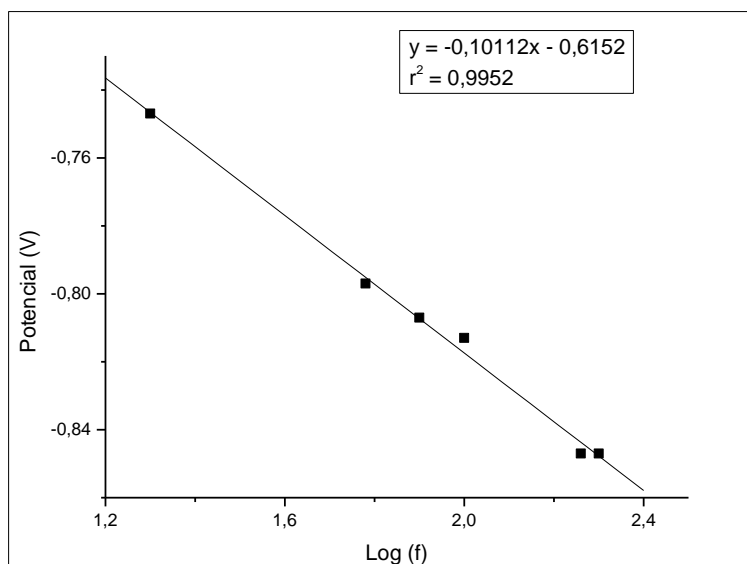
Ainda no caso de sistemas irreversíveis, outra forma de se encontrar o produto  $\alpha n$  é através da relação:

$$\frac{\Delta E}{\Delta \text{Log}(f)} = -\frac{2,3RT}{\alpha nF} \quad (\text{Equação 16})$$

Esta relação está representada no gráfico entre Log f versus potencial (Figura 49). Aqui, novamente, chega-se a uma relação entre  $\alpha$  e  $n$  onde  $\alpha n = 0,55$



**Figura 48 – Voltamograma de onda quadrada para uma solução  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de dimoxistrobina.**

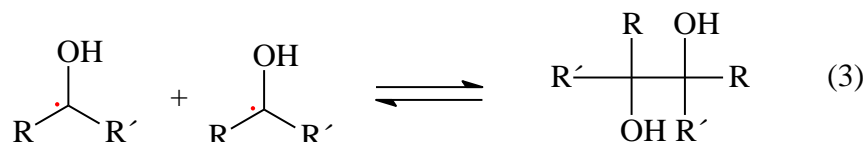
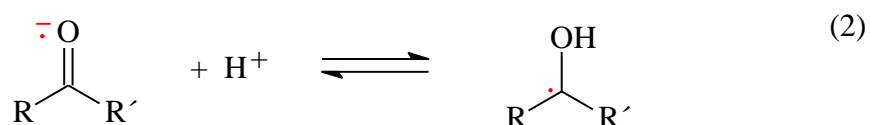
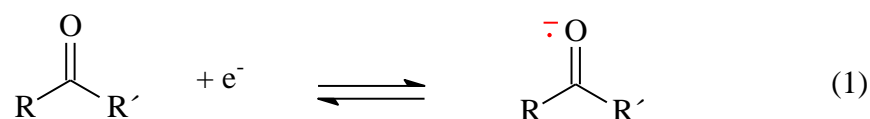


**Figura 49 – Relação entre o potencial do pico e a frequência.**

Outra informação relevante para o mecanismo redox destas estrobilurinas vem do fato de que só é observada a presença de pico voltamétrico em meio

ácido, o que indica a existência de alguma reação de protonação indispensável à redução.

De posse dessas informações, foi sugerido que o mecanismo para redução destes compostos consiste na redução da carbonila pela adição de 1 elétron seguido de protonação, um mecanismo geral para este tipo de redução esta<sup>80</sup> está representado a seguir.



O radical formado na etapa (2) pode reagir com outro radical idêntico formando um glicol (3), ou mesmo se ligando a alguma insaturação da molécula. Seja como for, esta última etapa que seria responsável pela ausência de um pico de oxidação nos voltamogramas cíclicos.

### 5.3. Parâmetros analíticos de mérito

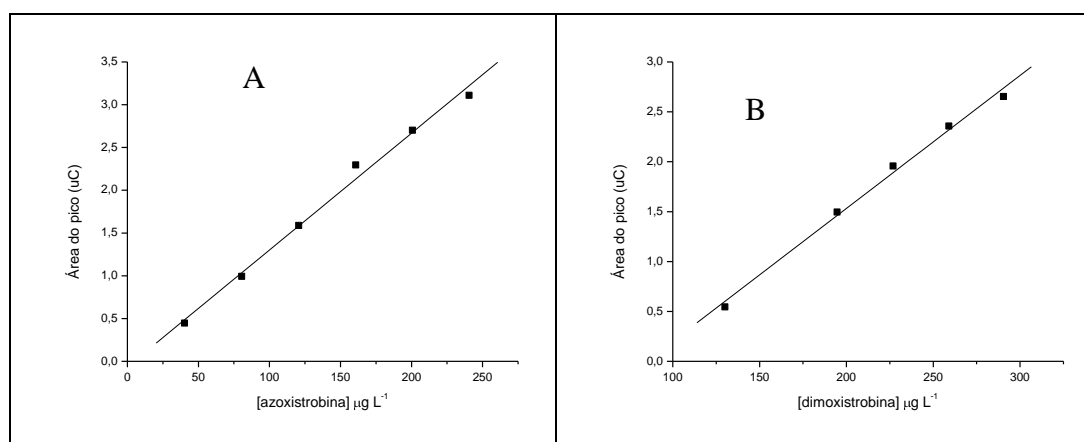
Tendo sido estabelecidas as melhores condições instrumentais para a determinação de cada uma das estrobilurinas separadamente, a próxima etapa foi estabelecer uma condição para a determinação simultânea dos dois compostos. Buscou-se condições de compromisso que permitissem boa sensibilidade na determinação de ambas estrobilurinas. Tal condição pode ser conseguida pela avaliação dos resultados dos estudos univariados. Na escolha, levou-se também em consideração a seletividade, ou seja, uma condição em que o alargamento dos picos fosse minimizado, diminuindo a possibilidade de sobreposição parcial dos picos das estrobilurinas, ou mesmo diminuindo a probabilidade da influência de picos de alguma substância concomitante nas matrizes a serem estudadas.

Levando em consideração estes requisitos, foi obtida a condição de trabalho que é indicada na Tabela 14, onde é possível encontrar também as condições ótimas para determinação para cada um dos compostos, no caso de se querer quantificar apenas um deles.

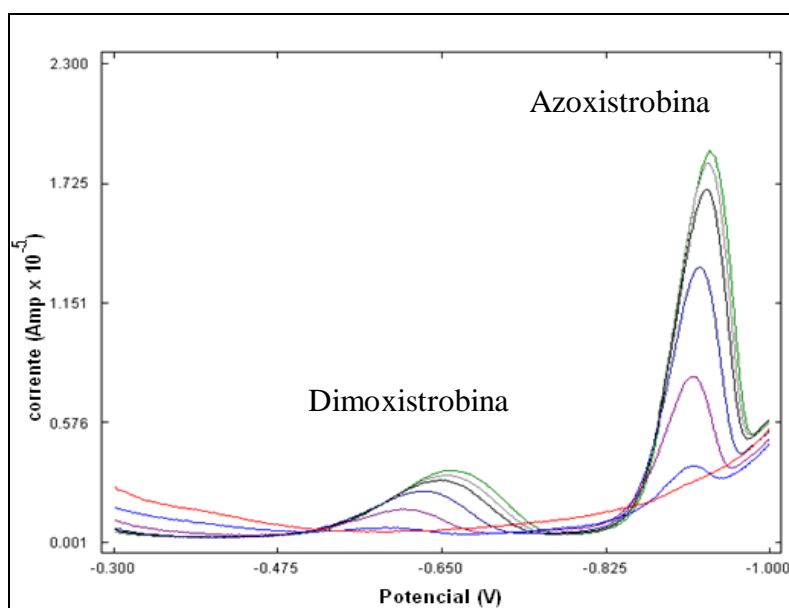
**Tabela 14 – Condições instrumentais e experimentais de compromisso para azoxistrobina e dimoxistrobina.**

Parâmetro	Azoxistrobina	Dimoxistrobina	Compromisso
Eletrólito suporte	HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>
Potencial inicial (mV)	-300	-400	-300
Tempo de deposição (s)	30	30	30
Incremento de potencial (mV)	2	4	2
Frequência (Hz)	200	150	150
Amplitude (mV)	250	150	150

Nestas condições, a dimoxistrobina apresenta pico de redissolução catódico em -630 mV e a azoxistrobina em -1020 mV como mostrado na Figura 51. Com base nesta condição de compromisso foi montada uma curva analítica para azoxistrobina e dimoxistrobina e os parâmetros analíticos de mérito foram obtidos desta curva. A relação entre área do pico e concentração para cada um destes compostos esta representada na Figura 50 e os voltamogramas utilizados para fazer estas curvas estão apresentados na Figura 51.



**Figura 50 – Curva analítica para (A) azoxistrobina e (B) dimoxistrobina.**



**Figura 51 – Voltamogramas para concentrações sucessivas de dimoxistrobina e azoxistrobina (  $5,0 \times 10^{-8}$ ,  $3,0 \times 10^{-7}$ ,  $5,0 \times 10^{-7}$ ,  $7,0 \times 10^{-7}$ ,  $9,0 \times 10^{-7}$  e  $1,1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> )**

Foi encontrada uma relação matemática que relaciona a concentração de azoxistrobina (em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e a área do pico de redissolução igual a:  $y = (0,013659 \pm 0,001732)x - 0,0642 \pm 0,2708$  enquanto que para a dimoxistrobina esta relação foi:  $y = (0,013322 \pm 0,001963)x - 1,1319 \pm 0,44572$ , ambos para um limite de confiança de 95%. Esta relação linear se manteve até o valor de  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  para azoxistrobina  $320 \mu\text{g L}^{-1}$  para dimoxistrobina. A linearidade foi verificada pelos conceitos de  $r$ ,  $r^2$ , teste F e teste t. O resumo dos resultados de regressão linear e análise de variância estão expostos na Tabela 15.

**Tabela 15 – Resumo dos resultados da regressão linear e análise de variância para azoxistrobina e dimoxistrobina.**

	Azoxistrobina	Dimoxistrobina
r	0,995855	0,9968
r <sup>2</sup>	0,991727	0,993609
erro padrão	0,104529	0,076238
observações	6	5
Coef angular	$0,013659 \pm 0,001732$	$0,013322 \pm 0,001963$
Coef linear	$-0,0642 \pm 0,2708$	$-1,1319 \pm 0,44572$
F	479,4797	466,44
F critico	$2,57 \times 10^{-05}$	0,000217
t	21,89	21,59
t critico	2,5706	2,4469

Os valores dos limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) foram determinados segundo o critério  $3s_b/a$  e  $10 s_b/a$  sendo  $s_b$  o desvio padrão de sete medições de sinal no branco e “a” o valor do coeficiente angular da reta. Quando já compensados pelo fator de diluição (100 vezes na cela), estes valores foram respectivamente iguais a  $140 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $480 \mu\text{g L}^{-1}$  para azoxistrobina e  $230 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,783 \mu\text{g mL}^{-1}$  para dimoxistrobina.

A precisão foi avaliada através do estudo da repetitividade e da precisão intermediária (analistas diferentes e dias diferentes) através de sete medições de solução de estrobilurinas na concentração  $130 \mu\text{g L}^{-1}$ . O estudo da precisão intermediária inclui a preparação de solução feita por cada um dos analistas. Os resultados encontrados foram 0,9% e 2,5% para a azoxistrobina e 1,2% e 2,3% para dimoxistrobina.

A seletividade foi avaliada tanto pelos testes de recuperação (que avaliam a interferência de concomitantes na matriz) como pela adição as soluções padrões de soluções de outras estrobilurinas (piraxistrobina e picoxistrobina). Foi identificado um sinal voltamétrico pouco sensível para a picoxistrobina em -1050 mV e não foi observado sinal voltamétrico nas condições usadas para piraxistrobina. No entanto, foi observado que nenhum dos dois compostos causa qualquer tipo de interferência sobre o sinal da azoxistrobina e da dimoxistrobina.

#### 5.4.

#### **Aplicação da metodologia para a determinação de azoxistrobina e de dimoxistrobina em alimentos.**

Para testar a aplicabilidade da metodologia, amostras de alimentos (batata e uva) foram lavadas, trituradas. Alíquotas de cada amostra foram pesadas e a elas foram adicionadas  $100 \mu\text{L}$  de solução de dimoxistrobina e azoxistrobina  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de modo a se fortificar e realizar ensaio de recuperação.

No caso das amostras que foram diretamente adicionadas à cela de trabalho, observou-se fortes interferências de matriz, o que impediu a determinação direta destes compostos. Foi necessário então desenvolver uma metodologia para minimizar estas interferências de matriz como descrito no item 3.4.2. A determinação das estrobilurinas foi possível após a combinação de um procedimento de extração sólido-líquido com extração em coluna C-18, como descrito no item 3.5.2.

Vale ressaltar que o resultado deste procedimento foi uma minimização da interferência de matriz, pois ao se fazer a leitura voltamétrica não se pode adicionar volumes superiores a 100 µl da amostra tratada, pois a partir deste valor a matéria orgânica presente irá suprimir completamente o sinal analítico das estrobilurinas

Este procedimento foi aplicado para amostras de uva e batata e os resultados das determinações estão expostos na Tabela 16.

Para a aplicação da metodologia para amostras de água de rio e de suco de fruta industrial, nenhuma etapa de preparo da amostra foi necessária. As amostras foram enriquecidas com diferentes quantidades de estrobilurinas e determinadas após introdução direta (10 µL) na cela de trabalho.

Para se realizar os testes de recuperação, as amostras foram enriquecidas com quantidades conhecidas de estrobilurinas, submetidas às etapas de pré-tratamento (no caso das amostras de extrato de batata e extrato de uva) e adicionadas às celas voltamétricas contendo o eletrólito suporte. Para o caso das amostras de alimentos foi feita adição de 100 µL de amostra, e para o caso das amostras de água do rio e de suco foram adicionados apenas 10 µL.

As determinações foram feitas por interpolação da curva analítica, preparada em cada dia. O resultado destas determinações esta exposto também na Tabela 16.

**Tabela 16 – Resultado para os testes de recuperação em diferentes matrizes.**

amostra	dia	azoxistrobina			dimoxistrobina		
batata	1	98	103	106	88	104	98
	2	83	96	78	63	76	78
	3	93	102	89	91	92	105
uva	1	74	93	78	91	99	95
	2	102	76	106	103	91	92
	3	103	64	95	87	95	105
água de rio	1	105	96	90	99	98	93
	2	85	90	102	91	105	95
	3	102	91	85	100	92	91
suco	1	82	107	93	89	105	94
	2	105	98	95	92	91	98
	3	93	101	88	89	102	91

Resultados expressos em % recuperado.

Concentrações iniciais de 4,0 µg mL<sup>-1</sup> para azoxistrobina e 3,3 µg mL<sup>-1</sup> para dimoxistrobina.